Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie

Studijní obor:
Genetika, molekulární biologie a virologie

Bc. Eliška Šťovíčková

Detekce hypoxických markerů v nádorech hlavy a krku

The detection of hypoxic markers in head and neck tumours

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jana Šmahelová

Konzultanti: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D., Mgr. Barbora Pokrývková

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.08.2022

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Šmahelové za všechny cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Děkuji i RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za konzultace během sepisování diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Barboře Pokrývkové za velkou metodickou pomoc i za praktické rady. Děkuji rovněž celému týmu Laboratoře molekulární a nádorové virologie. V neposlední řadě děkuji svému manželovi a rodičům i zbytku rodiny za podporu během celé doby studia.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT České republiky LTAUSA18003 (program Inter-Excellence).

Abstrakt

Nádory hlavy a krku (HNSCC) jsou vysoce heterogenní skupinou nádorů. Rizikovými faktory jsou zejména kouření a konzumace alkoholu. Část těchto nádorů je spojena s infekcí lidským papilomavirem (HPV), která významným pozitivním prognostickým faktorem. Tyto nádory se od nádorů negativních na HPV liší klinickopatologickými charakteristikami, nádorovým mikroprostředím i odpovědí na léčbu. Hypoxie je jevem běžně se vyskytujícím v nádorech včetně HNSCC a je považována za významný prognostický a prediktivní faktor. Objasnění míry hypoxie v souvislosti s infekcí HPV by mohlo částečně vysvětlit rozdíly v prognóze těchto pacientů a také umožnit vhodnější volbu terapie. Významným negativním prognostickým faktorem řady nádorů je také aspartát-β-hydroxyláza, jejíž role v HNSCC ale zatím zkoumána nebyla.

Ve své práci jsem se zaměřila na detekci exprese hypoxických markerů a aspartát-β-hydroxylázy ve vzorcích od pacientů s HNSCC na úrovni mRNA pomocí kvantitativní PCR a na úrovni proteinu metodou multispektrální imunohistochemie. Míru exprese těchto markerů jsem porovnávala u nádorů rozdělených dle virové etiologie i jiných charakteristik jako je kouření, lokalizace nebo stádium nádoru. Nejvyšší vliv na expresi těchto markerů měla infekce HPV, ale na základě dosavadních výsledků nelze jednoznačně ukázat na vyšší míru hypoxie u jedné z těchto skupin nádorů. Tato práce rozšiřuje poznání o expresi hypoxických markerů u HNSCC různé etiologie.

Klíčová slova

nádory hlavy a krku, hypoxie, papilomavirus, prognóza, aspartát-β-hydroxyláza, HIF1α, VEGFa

Abstract

Head and neck cancers (HNSCC) are heterogeneous group of tumours. Risk factors are mainly smoking and alcohol consumption. Some of these tumours are associated with human papillomavirus (HPV) infection, which is a significant positive prognostic factor. These tumours differ from HPV-negative tumours in clinicopathological characteristics, tumour microenvironment and response to treatment. Hypoxia is commonly found in tumors including HNSCC and is a significant prognostic and predictive factor. Elucidating the degree of hypoxia in relation to HPV infection could partly explain the differences in prognosis of these patients and allow more appropriate choice of therapy. Aspartate-β-hydroxylase is also a significant negative prognostic factor in a number of tumours, but its role in HNSCC has not yet been investigated.

I focused on the detection of hypoxic markers and aspartate-β-hydroxylase expression in samples from HNSCC patients at the mRNA level by quantitative PCR and at the protein level by multispectral immunohistochemistry. The expression levels of these markers were compared in tumors stratified according to viral etiology and other characteristics such as smoking, localization or tumor stage. HPV infection had the highest impact on the expression of these markers, but the results cannot point to a higher level of hypoxia in one of these tumor groups. This work expands the knowledge of hypoxic markers expression in HNSCC of different etiologies.

Keywords

head and neck tumours, hypoxia, papillomavirus, prognosis, aspartate-β-hydroxylase, HIF1α, VEGFa

Obsah

Abstrakt 3

Klíčová slova 3

Abstract 4

Keywords 4

Seznam zkratek 8

1 Úvod 10

2 Cíle práce 11

3 Přehled literatury 12

3.1 Hypoxie 12

3.1.1 Nádory a hypoxie 14

3.1.1.1 Aspartát β-hydroxyláza 15

3.2 Lidský papilomavirus 18

3.2.1 Životní cyklus HPV 18

3.2.2 Nádorová transformace vyvolaná HPV 19

3.2.3 Detekce HPV v nádorech 20

3.3 Nádory hlavy a krku 21

3.3.1 Rizikové faktory vzniku HNSCC 22

3.3.2 Epidemiologie HNSCC indukovaných HPV 23

3.3.3 Charakteristika HNSCC pozitivních a negativních na HPV 24

3.3.3.1 HNSCC a hypoxie 26

4 Materiál a metody 30

4.1 Materiál 30

4.1.1 Buněčné linie 30

4.1.2 Klinické vzorky 30

4.1.3 Histologické řezy 31

4.2 Charakterizace vzorků ... 31
4.2.1 Izolace DNA a RNA z buněk ... 31
4.2.2 Kontrola kvality a určení koncentrace nukleových kyselin ... 32
4.2.2.1 Nanodrop ... 32
4.2.2.2 Experion ... 32
4.2.3 Kontrola izolace, detekce virové DNA a určení typu HPV ... 33
4.2.3.1 β-globin PCR ... 33
4.2.3.2 HPV L1 PCR a RLB ... 34
4.2.4 Reverzní transkripce ... 34
4.2.5 Kontrola reverzní transkripce – HPRT PCR ... 35
4.2.6 HPV E6 PCR ... 36
4.3 qPCR ... 38
4.3.1 Zpracování výsledků ... 39
4.4 Multispektrální imunohistochemie ... 40
4.4.1 Analýza vzorků ... 42
4.4.2 Zpracování výsledků ... 43
4.5 Statistická analýza ... 44
5 Výsledky ... 45
5.1 Epidemiologické charakteristiky pacientů ... 45
5.2 Izolace DNA a RNA ... 46
5.3 Určení HPV statusu vzorků ... 49
5.3.1 Detekce HPV DNA a určení typu HPV ... 49
5.3.2 Reverzní transkripce ... 49
5.3.3 HPV E6 PCR ... 50
5.4 qPCR ... 52
5.4.1 Testování primerů a tvorba standartních křivek ... 52

5.4.2 Analýza exprese mRNA vybraných hypoxických markerů 55

5.4.2.1 Zpracování dat a statistická analýza 55

5.5 IHC-P 61

5.5.1 Testování a optimalizace protilátek 61

5.5.2 Tvorba a optimalizace multiplexového panelu 63

5.5.3 Kontroly pro IHC-P 68

5.5.4 Analýza výsledků 70

6 Diskuse 77

7 Souhrn 83

8 Seznam použité literatury 84

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický význam	Český význam
ACTb	Beta-actin	Beta-aktin
AKT	Ak strain transforming	-
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	-
ASPH	Aspartate beta-hydroxylase	Aspartát beta-hydroxyláza
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosin trifosfát
bp	Base pair	Pár bazí
CA9	Carbonic anhydrase 9	Karbonanhydráza 9
CBP	CREB-binding protein	CREB-vázající protein
Ct	Cycle treshold	-
DSB	Double-strand break	Dvouvláknový zlom
EGF	Epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor
FADH	Flavin adenine dinucleotide	Flavinadenindinukleotid
FIH	Factor inhibiting HIF	Faktor inhibující HIF
FN	-	Fakultní nemocnice
GLUT	Glucose transporter	Transportér glukózy
GUSb	Glucuronidase Beta	Beta glukoronidáza
HIF	Hypoxia inducible factor	Faktor indukovaný hypoxií
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma	Dlaždicobuněčný nádor hlavy a krku
HPV	Human papillomavirus	Lidský papilomavirus
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HRE	Hypoxia response element	-
HRP	Horseradish peroxidase	Křenová peroxidáza
IHC	Imunohistochemistry	Imunohistochemie
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus	Virus myší leukemie
MMPs	Matrix metalloproteinases	Matrixové metaloproteinázy
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NBF	Neutral buffered formalin	-
NK	-	Nukleová kyselina
NRL PV	-	Národní referenční laboratoř pro papilomaviry a polyomaviry

OVN	Overnight	Přes noc
PBS	Phosphate-buffered saline	-
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	Kináza pyruvátdehydrogenázy
PHD	Prolyl hydroxylase domain	Prolylhydroxyláza
pRb	Retinoblastoma protein	Retinoblastomový protein
pTNM	pathologic tumor – node – metastasis	
qPCR	Quantitative PCR	Kvantitativní PCR
RLB	Reverse line blotting	-
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
RQI	RNA quality index	-
RT	Reverse transcription	Reverzní transkripce
siRNA	Small interfering RNA	-
TCGA	The Cancer genome atlas	-
ÚHKT	-	Ústav hematologie a krevní transfuze
VEGF	Vascular endotelilal growth factor	Vaskulární endotelový růstový faktor
VHL	Von Hippel Lindau	-

1 Úvod

Hypoxií rozumíme snížený parciální tlak kyslíku v tkáních. Fyziologicky se vyskytuje například ve svalech při fyzické námaze, je ale i častým jevem nádorech. Příčinou hypoxie v nádorech může být nedostatečné cévní zásobení následkem rychlého růstu nádoru nebo jeho cévní abnormality. Hypoxie je v nádorech negativním prognostickým a prediktivním faktorem. Za poslední roky byla vyvinuta řada metod umožňující detekci hypoxie v nádorech a zároveň jsou zkoumány látky, jejichž podání zlepšuje zásobení buněk kyslíkem či zvyšuje citlivost hypoxických buněk k radioterapii.

Významným negativním prognostickým faktorem pro řadu nádorů je také aspartát-β-hydroxyláza, která by mohla sloužit jako terapeutický cíl. Zároveň bylo pozorováno, že může být ovlivňována faktory reagujícími na hypoxii. Její role v HNSCC ale zatím zkoumána nebyla.

Nádory hlavy a krku (HNSCC, z angl. head and neck squamous cell carcinoma) jsou vysoce heterogenní skupinou nádorů. Jsou etiologicky spojeny s kouřením a konzumací alkoholu. Část HNSCC, zejména v oblasti orofaryngu, je indukována lidskými papillomaviry (HPV). HPV jsou malé neobalené DNA viry infikující epiteliální buňky. Vyskytují se běžně v lidské populaci a většinou nevyvolávají žádné klinické příznaky. Některé typy jsou ale původci bradavic a další tzv. vysoce rizikové typy mohou indukovat vznik nádorů. Hlavní roli během nádorové transformace hostitelských buněk hrají virové onkoproteiny E6 a E7 navozující jejich nekontrolované dělení. HPV jsou v HNSCC významným pozitivním prognostickým a prediktivním faktorem. Nádory pozitivní na HPV se od nádorů negativních na HPV liší v klinicko-patologických charakteristikách pacientů i v nádorovém mikroprostředí. Byly také pozorovány rozdíly v míře hypoxie mezi těmito dvěma skupinami nádorů bez jednoznačného závěru. Některé studie dokumentují změnu exprese virových proteinů v hypoxickém prostředí, a proto je objasnění míry hypoxie u nádorů hlavy krku a její souvislosti s virovou etiologií nádorů důležité pro případnou individualizaci terapie pro pacienty trpící těmito nádory.

2 Cíle práce

Cílem této práce je potvrdit či vyvrátit hypotézu “Nádory hlavy a krku indukované HPV mají rozdílnou expresi markerů hypoxie ve srovnání s nádory hlavy a krku negativními na HPV.“.

Dílčí cíle práce jsou:

- charakterizace vzorků nádorů pacientů s nádory hlavy a krku – izolace nukleových kyselin, určení jejich kvality a HPV statusu
- optimalizace metody kvantitativní PCR pro detekci aspartát-β-hydroxylázy a hypoxických markerů a stanovení jejich relativní exprese na úrovni mRNA
- optimalizace multispektrální imunohistochemie na modelových systémech nádorů hlavy a krku a následná detekce aspartát-β-hydroxylázy a hypoxických markerů na úrovni exprese proteinů
- korelace výsledků s klinickopatologickými charakteristikami a virovou etiologií nádorů

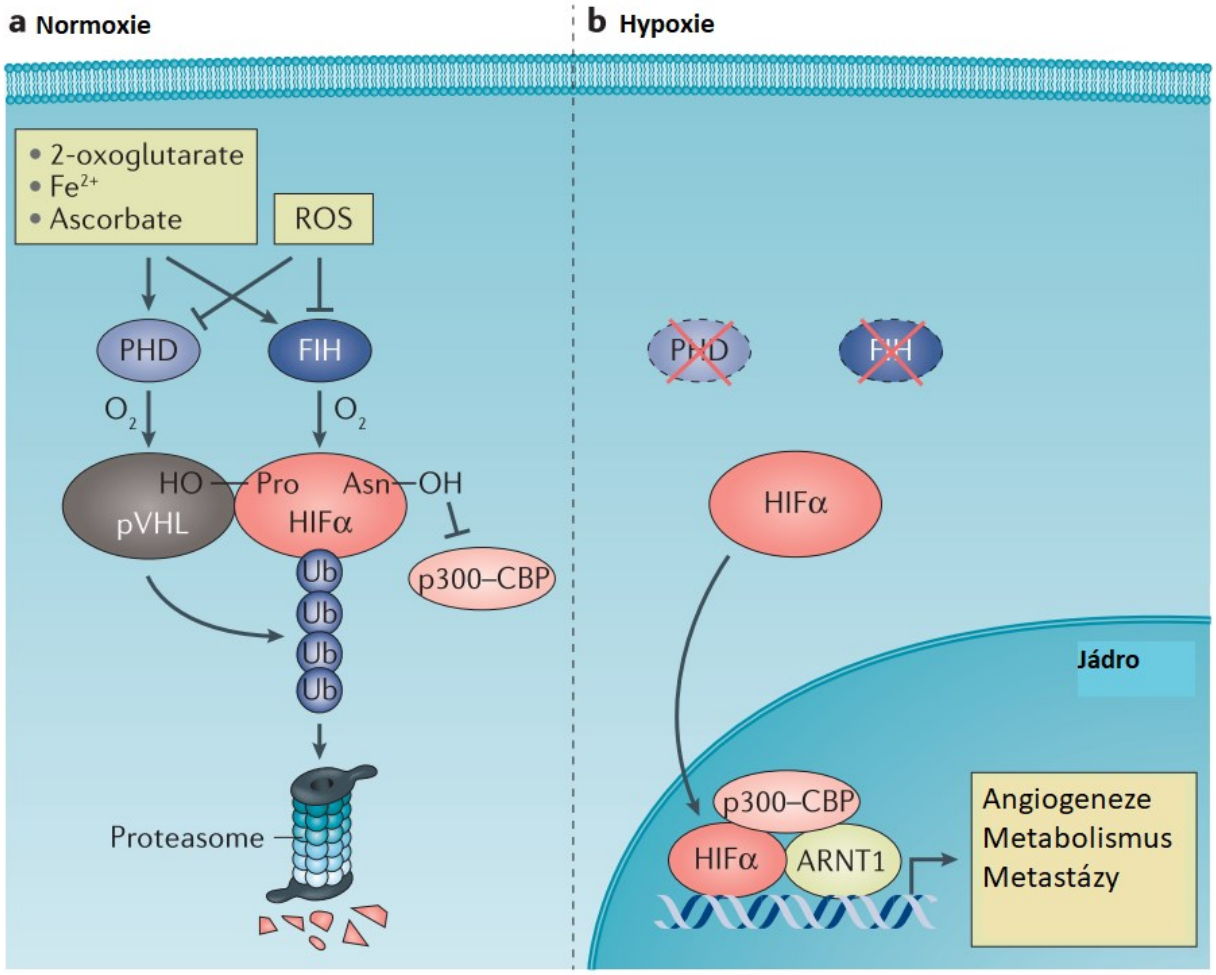
3 Přehled literatury

3.1 Hypoxie

Hypoxií rozumíme snížený parciální tlak kyslíku v tkáních. Fyziologicky se vyskytuje například ve svalech při fyzické námaze a hraje roli i během embryonálního vývoje (Chen, Fujinaga and Giaccia, 1999). Hypoxii způsobuje i řada patologických stavů, jako jsou poruchy oběhového systému nebo srdeční a plicní onemocnění. Hypoxie se také běžně vyskytuje v nádorech.

Hlavním regulátorem buněčné odpovědi na změny hladiny kyslíku je transkripční faktor **HIF1** (z angl. hypoxia inducible factor 1)(Wang and Semenza, 1995; Semenza, 2000). Jedná se o dimer podjednotek α a β a jeho funkce je regulována na úrovni stability podjednotky HIF1α (Nakazawa, Keith and Simon, 2016). Podjednotka HIF1β je produktem genu *ARNT1* (z angl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) a je konstitutivně přítomna v jádře. Za normoxie (běžné hladiny kyslíku) je podjednotka HIF1α hydroxylována na prolylových a asparaginylových zbytcích (Obrázek č. 1). Prolylové zbytky hydroxyluje enzym prolylhydroxyláza (PHD, z angl. prolyl hydroxylase domain). Hydroxylované zbytky rozeznává protein VHL (Von Hippel Lindau), který je součástí komplexu E3 ubikvitin ligázy. Následná ubikvitinylace označí podjednotku k degradaci v proteazomu. Hydroxylace asparaginylu hydroxylázou FIH (z angl. factor inhibiting HIF) inhibuje navázání koaktivátoru p300-CBP (z angl. CREB-binding protein) a tak zabraňuje aktivaci HIF1α. Jako koenzym hydroxyláz slouží kyslík, během hypoxie tedy k hydroxylaci nedochází. Podjednotka α přechází do jádra, tvoří dimer s podjednotkou β a v této aktivní formě nasedá na tzv. HRE (z angl. hypoxia response element) v promotorech cílových genů a aktivuje jejich transkripci. Tím umožňuje buňce se přizpůsobit snížené hladině kyslíku. Mezi geny regulované HIF1 patří ty, jejichž produktem jsou proteiny ovlivňující metabolismus, zejména glykolýzu, nebo proteiny podporující zásobení buněk kyslíkem. Obdobným způsobem jako HIF1 jsou regulovány faktory HIF2 a 3. HIF1 je exprimován ve všech tkáních, oproti tomu je HIF2 exprimován zejména v endotelu, ale i v makrofázích, hepatocytech nebo ve fibroblastech ledvin. HIF2 má řadu funkcí společnou s HIF1. Reguluje buněčnou odpověď na změny hladiny kyslíku, ale na rozdíl od HIF1 většinou nereguluje glykolytické enzymy, a liší se i role těchto dvou transkripčních faktorů během embryogeneze nebo tumorigneze (Tian, McKnight and Russell, 1997; Hu *et al.*, 2003; Loboda, Jozkowicz and Dulak, 2010). HIF3 je exprimován v plicích, mozku, srdci, ledvinách nebo brzlíku (Gu *et al.*, 1998). V porovnání s HIF 1 a 2 má HIF3 duální funkci.

Jednak reguluje HIF 1 a 2 kompetitivní inhibicí, ale také reguluje transkripci vlastních cílových genů i některých genů regulovaných HIF1 (Zhang *et al.*, 2014).



Obrázek č. 1 – Regulace HIF1α, převzato a upraveno podle (Nakazawa, Keith and Simon, 2016). ROS (reactive oxygen species), PHD (prolyl hydroxylase domain), FIH (factor inhibiting HIF), pVHL (Von Hippel Lindau protein), HIF1 (hypoxia inducible factor 1), CBP (CREB-binding protein), ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).

Jedním z cílů HIF1 je gen *SLC2A1* který kóduje přenašeč glukózy **GLUT1** (z angl. glucose transporter). Faktor HIF1 reguluje i expresi genu pro jiný typ přenašeče glukózy, GLUT3 (Maxwell *et al.*, 1997). Zvýšení příjmu glukózy buňkami během hypoxie umožňuje intenzivnější glykolýzu a překonání nepříznivých podmínek.

HIF1 také aktivuje expresi genu pro kinázu **PDK1** (z angl. pyruvate dehydrogenase kinase 1) (Papandreou *et al.*, 2006), která fosforyluje a tím inaktivuje pyruvát dehydrogenázu. Zvýšením aktivity PDK1 dochází ke snížení přeměny pyruvátu na acetyl koenzym A. Následkem je zpomalení Krebsova cyklu, kde dochází k produkci NADH (z angl. nicotinamide

adenine dinucleotide) a $FADH_2$ (z angl. flavine adenine dinucleotide phosphate), a nižší hladina oxidativní fosforylace, což vede ke snížení spotřeby kyslíku buňkami.

Dalším z genů jejichž exprese je ovlivněna HIF1 je gen pro jednu z isoforem karbonanhydráz, **CA9** (z angl. carbonic anhydrase 9) (Wykoff *et al.*, 2000). Transmembránový protein CA9 se podílí na udržování acidobazické rovnováhy reverzibilní hydratací oxidu uhličitého. Tím může hypoxickým buňkám se zvýšenou produkcí laktátu umožnit překonání nepříznivých podmínek.

Příčinou hypoxie je často nedostatečné cévní zásobení tkáně. Hlavním růstovým faktorem podporujícím tvorbu nových cév je **VEGF** (z angl. vascular endotelilal growth factor) a jeho exprese je rovněž regulována HIF1 (Forsythe *et al.*, 1996). Působení VEGF má za následek lepší prokrvení tkáně a snížení hypoxie.

3.1.1 Nádory a hypoxie

Hypoxie je v nádorech běžným jevem. Příčinou může být nedostatečné cévní zásobení následkem rychlého růstu nádoru nebo jeho cévní abnormality. Pro nádorové buňky je typický tzv. Warburgův efekt neboli aerobní glykolýza. Tento efekt pozorujeme, když buňky za normoxie upřednostňují glykolýzu a následnou fermentaci pyruvátu na laktát oproti Krebsovu cyklu a oxidativní fosforylaci. Ačkoliv je tato metabolická cesta méně výhodná z hlediska produkce ATP (z angl. adenosine triphosphate), tak kompenzuje nádorovým buňkám tuto nevýhodu poskytnutím jiných molekul umožňujících jejich intenzivní růst a proliferaci, například NADPH (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), nebo uhlík využitelný pro syntézu organických molekul, například nukleotidů (Heiden, Cantley and Thompson, 2009).

Byla rovněž vyvinuta řada invazivních i neinvazivních metod pro detekci nádorové hypoxie. Často využívanou metodou je pozitronová emisní tomografie (PET) za použití markerů založených na značeném 2-nitroimidazolu. Další možností detekce hypoxie v nádorech je využití tzv. endogenních markerů. Tyto markery lze detekovat na úrovni proteinu nebo mRNA. Patří mezi ně například HIF1 nebo jeho cílové geny (Horsman *et al.*, 2012). Ačkoliv je exprese těchto markerů pouze nepřímým důkazem o míře hypoxického prostředí, bylo na základě analýz dat z databází navrhnuto několik skupin genů, které by na základě své funkce a zvýšené exprese během hypoxie mohly sloužit jako markery nádorové hypoxie (Lendahl *et al.*, 2009; Toustrup *et al.*, 2011; Eustace *et al.*, 2013). Pro tyto znaky byl u pacientů s nádory

hlavy a krku (HNSCC, z angl. head and neck squamous cell carcinoma), kterými se ve své práci zabývám, potvrzen jejich negativní prognostický význam (Toustrup a kol., Lendahl a kol.). Kombinace genů podle Eustace a kol. měly prognostický význam pouze u pacientů s HNSCC léčených radioterapií. Jediným markerem společným pro tyto tři skupiny je **P4HA1** (z angl. prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1), enzym klíčový pro syntézu kolagenu. Při porovnání těchto tří panelů hypoxických markerů bylo ukázáno, že P4HA1 může sloužit jako nezávislý prognostický faktor HNSCC, a tedy nezávislý marker hypoxie (Tawk *et al.*, 2016).

Hypoxie je v nádorech negativním prognostickým faktorem (Vaupel, 2008). Hypoxické nádory také hůře reagují na radioterapii. V posledních dekádách byly zkoumány látky, jejichž podání pacientům by zlepšilo zásobení buněk kyslíkem, zvýšilo citlivost hypoxických nádorů k radiaci, anebo cíleně likvidovalo hypoxické buňky. Ze všech pre-klinicky a klinicky testovaných preparátů se do klinické praxe dostal pouze tzv. modifikátor hypoxie, nimorazol. Nimorazol na molekulární úrovni mimikuje kyslík a bylo zaznamenáno, že zvyšuje citlivost nádorů hlavy a krku k radioterapii (Sørensen and Horsman, 2020).

3.1.1.1 Aspartát β-hydroxyláza

Aspartát β-hydroxyláza neboli **ASPH** (z angl. aspartate beta-hydroxylase) patří do rodiny 2-oxoglutarát-dependentních hydroxyláz, které mohou v buňce sloužit jako sensor hladiny kyslíku (Chang, Forde and Lai, 2019). Bylo také pozorováno, že inhibice HIF1 pomocí siRNA (z angl. small interfering RNA) vedla k nižší expresi mRNA ASPH (Lawton *et al.*, 2010). Tyto výsledky naznačují, že hypoxie pravděpodobně zvyšuje transkripci ASPH prostřednictvím transkripčního faktoru HIF1. Přehled zapojení ASPH do signálních drah souvisejících s hypoxií z kapitoly 3.1.1 se nachází na Obrázku č. 2.

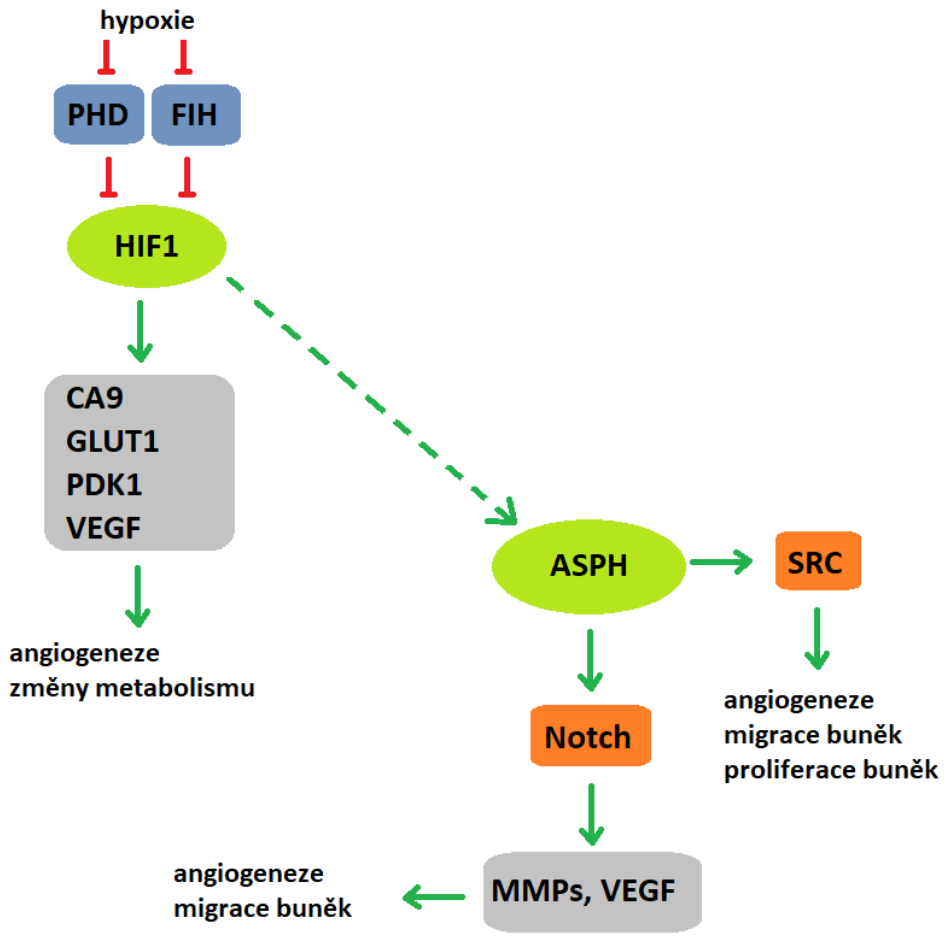
ASPH je vysoce exprimovaná v trofoblastu nebo v děložních žlázkách a hraje pravděpodobně roli během vývoje zárodku. V normálních tkáních dospělého organismu bývá ale její exprese nízká, avšak častá je vysoká aktivace ASPH během tumorigeneze. Vysoká exprese mRNA i proteinu ASPH je v nádorech spojena s invazivitou a tvorbou metastáz, zvýšenou angiogenezí nebo potlačením imunitní odpovědi (Kanwal *et al.*, 2020).

ASPH je významným negativním prognostickým faktorem řady nádorů. Ve studii zabývající se mimo jiné rolí ASPH a HIF1 jako prognostických faktorů pro gliomy (Sturla *et al.*, 2016) autoři pozorovali, že nejvyšší hladiny těchto proteinů byly v nádorech nejpokročilejšího stádia a

v invazivnějších typech nádorů. HIF1 i ASPH byly rovněž více přítomny v hypoxických oblastech nádorů. Další studie potvrdila prognostickou roli ASPH v hepatocelulárním karcinomu (Zou *et al.*, 2018). Aktivita ASPH měla za následek agresivnější fenotyp nádoru a tvorbu metastáz mechanismem epitelo-mezenchymální tranzice.

ASPH hydroxyluje proteiny v konsenzus sekvenci, která se nachází v EGF-podobných doménách (z angl. epidermal growth factor) (Kanwal *et al.*, 2020). Mezi proteiny s těmito doménami patří také ligandy a receptory **Notch** (Wharton *et al.*, 1985). Fyziologická Notch signalizace nejčastěji vede k diferenciaci buněk. V hepatocelulárním karcinomu byla pozorována souvislost zvýšené exprese ASPH se zvýšenou hladinou Notch a koimunoprecipitace těchto dvou proteinů potvrdila jejich přímou interakci (Chiara Cantarini *et al.*, 2006). Jedním z možných mechanismů, jak aktivace ASPH podporuje migraci buněk, je právě interakce s Notch receptorem a jeho ligandy. V různých typech nádorů bylo pozorováno, že signalizace Notch a s ní související dráhy podporovaly kancerogenezi (Dang *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006), angiogenezi (Zeng *et al.*, 2005) nebo tvorbu metastáz (Zavadil *et al.*, 2004; Sonoshita *et al.*, 2011). Jedním z možných mechanismů, jak Notch signalizace podporuje tvorbu metastáz je aktivace endopeptidáz podílejících se na degradaci extracelulární matrix, **MMPs** (z angl. matrix metalloproteinases). Notch také může aktivovat transkripci genu kódujícího VEGF, což dále podporuje kancerogenezi tvorbou nových cév v nádoru (Kanwal *et al.*, 2020).

Další z drah, které zprostředkují účinky ASPH je dráha protoonkogenu **Src.** Src je nereceptorová tyrosinkináza a její dráha ovlivňuje embryonální vývoj a růst buněk, a také hraje roli během migrace buněk nebo angiogeneze. ASPH aktivuje Src kaskádu přímou interakcí, což má za následek například tvorbu invadopodií, jak bylo pozorováno u adenokarcinomů slinivky břišní (Ogawa *et al.*, 2019). Invadopodia jsou výčnělky buněk podepřené aktinovou sítí, které umožňují buňce intenzivnější interakci s extracelulární matrix. V nádorech byla spojena tvorba invadopodií nádorových buněk s tvorbou metastáz (Weaver, 2006).



Obrázek č. 2 – Regulační dráhy zahrnující ASPH a HIF1, upraveno podle (Kanwal *et al.*, 2020). PHD (prolyl hydroxylase domain), FIH (factor inhibiting HIF), HIF1 (hypoxia inducible factor 1), CA9 (carbonic anhydrase 9), GLUT1 (glucose transporter 1), PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), VEGF (vascular endotelilal growth factor), ASPH (aspartate beta-hydroxylase), MMPs (matrix metalloproteinases).

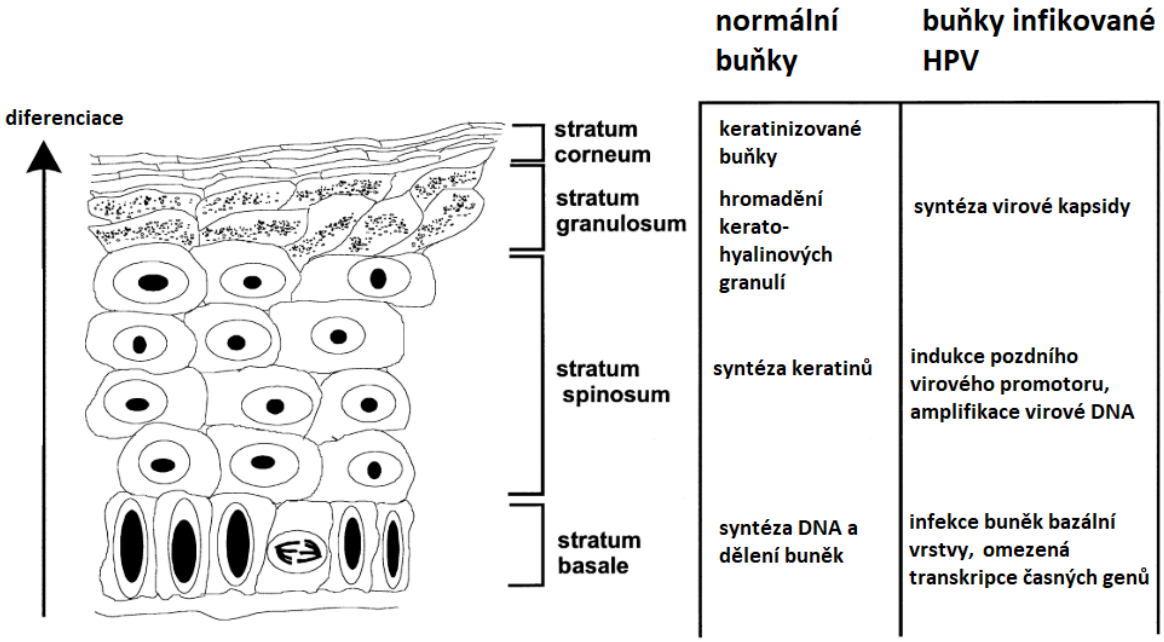
3.2 Lidský papilomavirus

Lidské papilomaviry (HPV, z angl. human papillomavirus) jsou viry patřící do čeledi *Papillomaviridae.* Jedná se o malé neobalené DNA viry s kapsidou o průměru přibližně 55 nm. Genom HPV o velikosti téměř 8000 bp (z angl. base pair) tvoří cirkulární dvouvláknová DNA, kterou lze rozčlenit na časnou (geny E1, 2, 4, 5, 6 a 7) a pozdní oblast (geny L1 a 2). Časné geny řídí replikaci a transkripci virové DNA, uvolnění virové kapsidy z hostitelské buňky a také se účastní transformace hostitelských buněk. Pozdní geny kódují proteiny kapsidy.

Mezi lidské papilomaviry patří více než 200 typů virů infikujících epiteliální buňky – sliznice a kůži. Tyto viry se běžně vyskytují v lidské populaci a většina z nich nevyvolává žádné klinické příznaky. Některé kožní typy jsou ale původci bradavic (například HPV 1-4), a další typy jsou spojeny se vznikem nádorů (Brentjens *et al.*, 2002). Podle schopnosti vyvolat nádorové bujení dělíme HPV na nízce rizikové (například HPV 6, 11), které indukují benigní bujení a vznik kondylomat. Naopak vysoce rizikové (zejména HPV 16, 18) jsou spojeny s karcinomem děložního čípku, celosvětově druhým nejčastějším nádorem u žen (Petry, 2014). HPV mohou také indukovat další nádory v anogenitální oblasti, část nádorů v oblasti hlavy a krku a nebo kožní nádory u pacientů trpících genetickou poruchou epidermodysplasia verruciformis (HPV 5 a 8) (Gillison, 2000; Klozar *et al.*, 2010; Haedicke and Iftner, 2013; Chiantore *et al.*, 2020).

3.2.1 Životní cyklus HPV

HPV infikují dělící se buňky v bazální vrstvě epitelu. Produktivní životní cyklus HPV je závislý na diferenciaci epiteliálních buněk, kdy dochází ke změnám hladiny exprese hostitelských genů a s tím se mění i exprese genů HPV. V časných fázích infekce, v bazálních epiteliálních buňkách, je virová DNA udržována v nízkém počtu kopií v epizomální formě, a může se zde tvořit rezervoár viru. Transkripce je v této fázi pod kontrolou časného proteinu E2, který funguje jako transkripční faktor. Během diferenciace se buňky přesouvají do vyšších vrstev epitelu. U diferenciovaných buněk v horních vrstvách epitelu dochází k aktivaci exprese genů *L1* a *L2* a k tvorbě nových virionů (Graham, 2017). Děje závislé na diferenciaci v normálních epiteliálních buňkách a v epiteliálních buňkách infikovaných HPV porovnává Obrázek č. 3.



Obrázek č. 3 – Děje závislé na diferenciaci buněk v normálních epiteliálních buňkách a v epiteliálních buňkách infikovaných HPV, převzato a upraveno podle (Stubenrauch and Laimins, 1999). HPV (human papillomavirus).

3.2.2 Nádorová transformace vyvolaná HPV

Hlavní roli během nádorové transformace hostitelských buněk mají virové onkoproteiny E6 a E7, které navozují neregulované dělení buněk. Onkoprotein E7 inaktivuje retinoblastomový protein (pRb). pRb běžně váže a tím inhibuje transkripční faktor E2F, který stimuluje expresi genů regulujících buněčný cyklus, jako jsou například cykliny. Inaktivací pRB je E2F uvolněn, čímž je umožněn postup buněčného cyklu (Stubenrauch and Laimins, 1999). Důsledkem inaktivace pRb je také zvýšená transkripce genu kódujícího inhibitor cyklin-dependentních kináz p16. To odlišuje nádory indukované HPV od jiných typů nádorů, kde je exprese proteinu p16 častěji utlumena (Sritippho, Chotjumlong and Iamaroon, 2015). Onkoprotein E6 nepřímo označuje svou vazbou nádorový supresor p53 k degradaci v proteasomu, čímž inhibuje jeho aktivitu (Scheffner *et al.*, 1990). Tento protein působí jako transkripční faktor pro geny regulující apoptózu, dělení buněk, nebo například angiogenezi.

Vysoce rizikové HPV mají také schopnost integrace svého genomu do hostitelského. Integrace virové DNA není běžnou součásti životního cyklu viru a přispívá k procesu karcinogeneze. Během integrace je často narušen gen pro protein E2, který má funkci i jako represor onkogenů E6 a E7 (McBride and Warburton, 2017). Byly popsány i alternativní cesty kancerogeneze vyvolané HPV bez integrace do hostitelského chromozomu, kdy je genom

HPV v buňce přítomen v epizomální formě. Tento typ kancerogeneze je spojen s vysokou expresí genů kódujících proteiny E2, E4 a E5 a je také, částečně, závislý na inaktivaci genu p53 (Ren *et al.*, 2020).

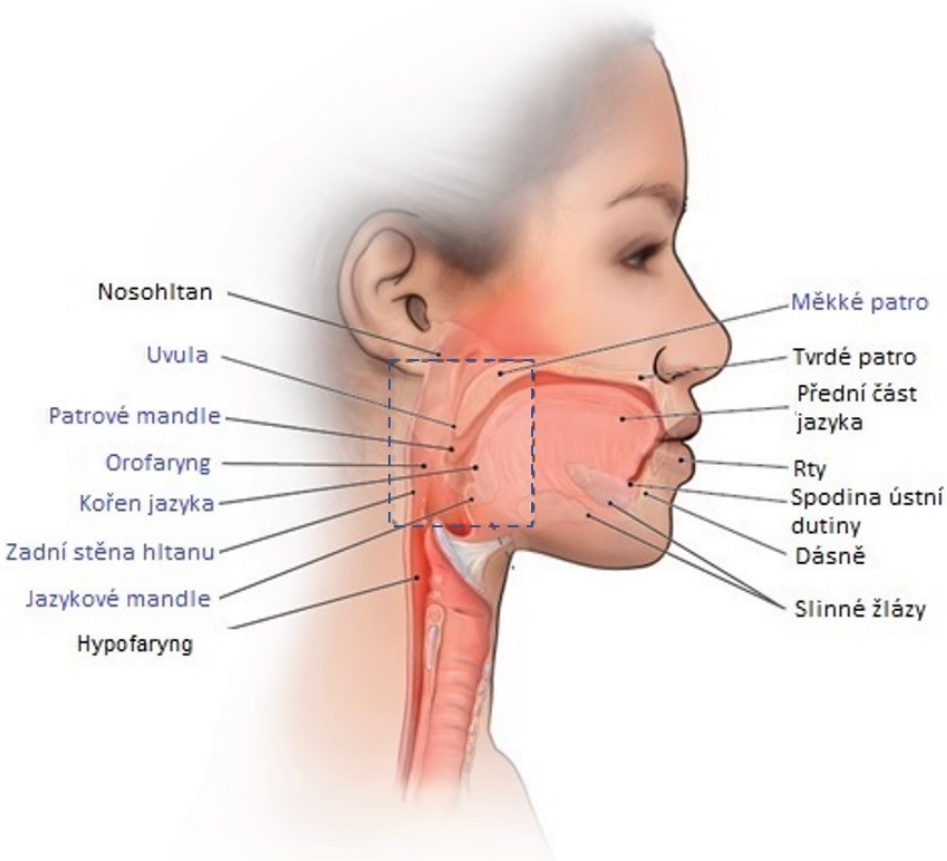
3.2.3 Detekce HPV v nádorech

Často používanou metodou pro průkaz infekce HPV v nádorech je detekce HPV DNA. Pozitivní výsledek detekce HPV DNA může ale indikovat pouze latentní infekci, kdy je exprese virových genů značně omezena. Latentní infekce může být vyvolána imunitní odpovědí hostitele proti viru, nebo také infekcí nízkým množstvím viru (Doorbar, 2013). HPV DNA může být ve vzorku detekována také následkem náhodné kontaminace, protože HPV jsou běžnou součástí mikrobiomu pokožky nebo například dutiny ústní (Ma *et al.*, 2014). Naopak detekce virové mRNA (nejčastěji mRNA E6) umožňuje prokázat aktivní virovou infekci, během které dochází k transkripci virové DNA (Smeets *et al.*, 2007).

Nepřímým markerem nádorů, ve kterých se na onkogenezi podílejí HPV je již zmíněná zvýšená exprese proteinu p16 (Stephen *et al.*, 2013) (kapitola 3.2.2), což může být v kombinaci s průkazem HPV DNA využito ke spolehlivější detekci HPV infekce. Rozdíl mezi metodami detekce HPV v nádorech ukazuje například studie, ve které detekovali HPV DNA u 271/1090 (25 %) nádorů orofaryngu, mRNA E6 byla detekována u 235 (22 %) nádorů a p16 byl detekován pouze u 207 (19 %) nádorů (Castellsagué *et al.*, 2016). K obdobným výsledkům dospěla i studie z České republiky na nádorech hlavy a krku. Z celkem 45 nádorů bylo 29 (65 %) pozitivních na HPV DNA, 27 (60 %) na mRNA proteinu E6 a p16 byl detekován rovněž u 27 (60 %) vzorků (Rotnáglová *et al.*, 2011). Vyšší podíl pozitivních nádorů v této studii byl ovlivněný anatomickou lokalizací nádorů, které jsou častěji asociovány s HPV infekcí. Další výzkum ukázal, že pozorované zlepšené celkové přežívání pacientů s nádory asociovanými s HPV se týká nádorů s aktivní virovou infekcí detekovanou expresí HPV mRNA nebo proteinu p16 oproti nádorům pozitivním pouze na HPV DNA (Jung *et al.*, 2010; Rotnáglová *et al.*, 2011; Janecka-Widła *et al.*, 2020).

3.3 Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku představují vysoce heterogenní skupinu nádorů. Patří mezi ně nádory dutiny ústní, rtů, nosohltanu, hypofaryngu a také nádory orofaryngu, mezi které řadíme zejména nádory patrových mandlí, kořene jazyka a měkkého patra (Obrázek č. 4). Většina těchto nádorů je odvozena od slizničního epitelu a nazýváme je souhrnně dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku (HNSCC).



Obrázek č. 4 – Lokalizace nádorů hlavy a krku, oblast orofaryngu zvýrazněna modře. Převzato a upraveno podle www.cdc.gov/cancer/headneck [cit. 16.7.2022].

Celosvětově přibylo za rok 2020 téměř 750 000 nových případů a 367 000 úmrtí ve spojení s nádory hlavy a krku (Tabulka č. 1) (Sung *et al.*, 2021).

Tabulka č. 1 - celosvětová incidence a úmrtnost nádorů hlavy a krku za rok 2020, v závorkách uveden procentuální podíl na celkové incidenci všech typů nádorů podle (Sung et al., 2021).

Lokalizace	Incidence počet n (%)	Úmrtnost počet n (%)
Ret, ústní dutina	377 713 (2,0)	177 757 (1,8)
Nosohltan	133 354 (0,7)	80 008 (0,8)
Orofaryng	98 412 (0,5)	48 143 (0,5)
Hypofaryng	84 254 (0,4)	38 599 (0,4)
Slinné žlázy	53 583 (0,3)	22 778 (0,2)
Celkem	**747 316 (3,9)**	**367 285 (3,7)**

V České republice se za rok 2020 vyskytlo 1 854 nových případů nádorů hlavy a krku (9,1 % z incidence všech typů nádorů v ČR) ([cit. 16.7.2022], dostupné z: https://www.svod.cz/). Nádorů hypofaryngu bylo nově diagnostikováno 128 (0,7 %), nádorů orofaryngu 108 (0,6 %). Nádory dutiny ústní, do kterých byly zahrnuty nádory ústní spodiny, jazyka, slinných žláz, rtů, dásní a patra se vyskytly v 1071 případech (5,1 %).

3.3.1 Rizikové faktory vzniku HNSCC

Rizikovými faktory vzniku HNSCC jsou zejména užívání tabákových výrobků a konzumace alkoholu. Jejich souvislost se zvýšeným rizikem HNSCC byla pozorována již v padesátých letech minulého století (Wynder, Bross and Feldman, 1957). V roce 1988 byl v USA u více než 1 000 pacientů pozorován výskyt HNSCC v souvislosti s kouřením nebo s konzumací alkoholu (Blot *et al.*, 1988) a tato souvislost byla potvrzena i dalšími studiemi (León *et al.*, 2009; Hashibe *et al.*, 2013; Wyss *et al.*, 2013). Riziko významně zvyšuje i množství vykouřených cigaret a vypitých alkoholických nápojů. Riziko vzniku HNSCC bylo také u kuřáků dýmek a doutníků vyšší než u kuřáků cigaret a kuřáci, kteří byli zároveň konzumenty alkoholu byli vystaveni nejvyššímu riziku (Blot *et al.*, 1988; Franceschi *et al.*, 1990).

Mezi další významné rizikové faktory vzniku HNSCC patří virové infekce, zejména infekce HPV. Dle systematického přehledu, do kterého bylo celkem zahrnuto 5 046 případů ze 60

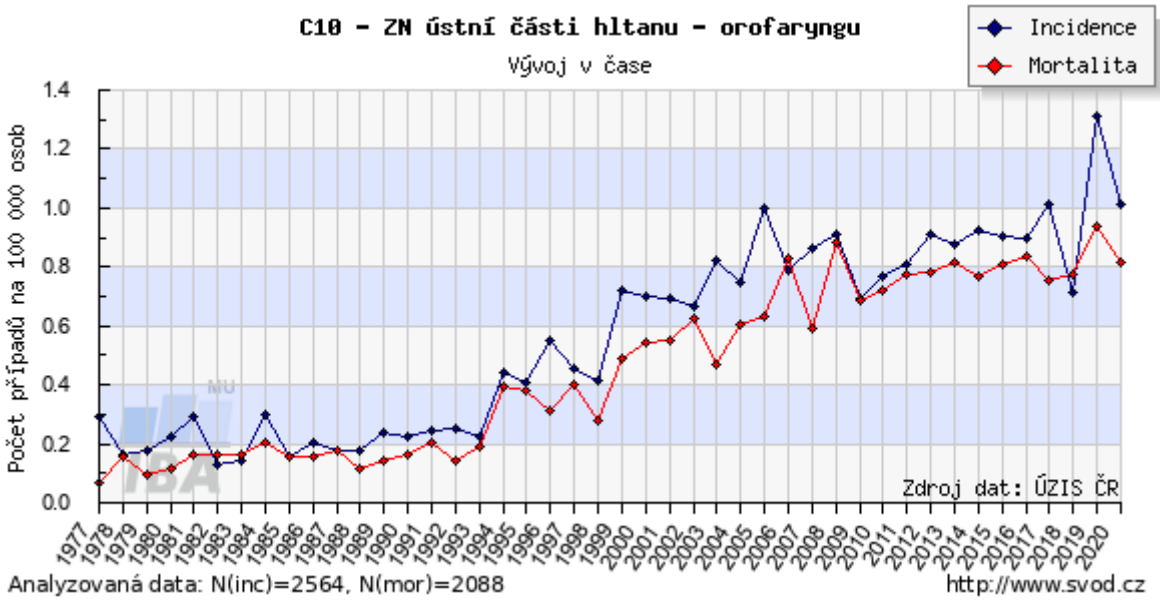
studií z Evropy, Ameriky, Asie i Afriky, byla v 26 % nádorů hlavy a krku detekována HPV DNA (Kreimer, Clifford, Boyle, & Franceschi, 2005). Metaanalýza zahrnující 62 studií dohromady o 4 852 případech HNSCC rovněž z Evropy, Ameriky, Asie i Afriky uvádí podíl HNSCC pozitivních na HPV DNA 35 % (Termine et al., 2008). Tento rozdíl by dle autorů mohl být způsoben zahrnutím HNSCC z různých lokalizací.

Mezi další nádory hlavy a krku, které jsou indukovány virovou infekcí patří nádory nosohltanu, které jsou spojeny s infekcí virem Epsteina a Barrové (Chien *et al.*, 2001; Mirzamani *et al.*, 2006).

3.3.2 Epidemiologie HNSCC indukovaných HPV

Nádory indukované HPV se nachází nejčastěji v oblasti orofaryngu, přičemž zastoupení nádorů pozitivních na HPV DNA a/nebo p16 se pohybuje mezi 21 až 85 % (Kreimer *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2016; Carlander *et al.*, 2021). Oproti tomu jen 7,4 % nádorů dutiny ústní a 5,7 % nádoru laryngu je pozitivních na HPV DNA (Castellsagué *et al.*, 2016).

V posledních letech vzrůstá incidence HNSCC pozitivních na HPV (HPV+), naopak incidence HNSCC spojených s kouřením se snižuje. Tento trend byl pozorován zejména mezi muži ve vyspělých státech jako je USA, Austrálie, Kanada nebo Japonsko v souvislosti se snižujícím se užíváním tabáku (Chaturvedi *et al.*, 2013; Gillison *et al.*, 2015; Aupérin, 2020). Mezi lety 1995 a 2012 byl naopak v retrospektivní studii pozorován zvyšující se výskyt HPV+ nádorů orofaryngu u obou pohlaví pacientů, nárůst byl ale i v této studii výraznější u mužů (D'Souza *et al.*, 2017). Ve Spojených státech dokonce celkové počty diagnostikovaných nádorů orofaryngu překročily mezi lety 2014 a 2018 počty nádorů děložního čípku ([cit. 16.7.2022], dostupné z: https://www.cdc.gov/cancer/uscs/about/data-briefs/no26-hpv-assoc-cancers-UnitedStates-2014-2018.htm). Tento trend je pravděpodobně také výsledkem úspěšné vakcinace proti HPV. Zvyšující se incidenci nádorů orofaryngu lze v posledních dekádách pozorovat i na datech z České republiky (graf na Obrázku č. 5).



Obrázek č. 5– Incidence a mortalita nádorů orofaryngu v České republice mezi lety 1977 a 2020, převzato z http://www.svod.cz [cit. 16.7.2022].

Řada studií ukazuje, že nejčastějším typem HPV v HNSCC je HPV16, dále zde byly detekovány typy HPV33, 51, 45 nebo 18 (Gillison *et al.*, 2000; Kreimer *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2016). Stejné typy HPV byly v HNSCC detekovány i v České republice (Tachezy *et al.*, 2009; Koslabova *et al.*, 2013).

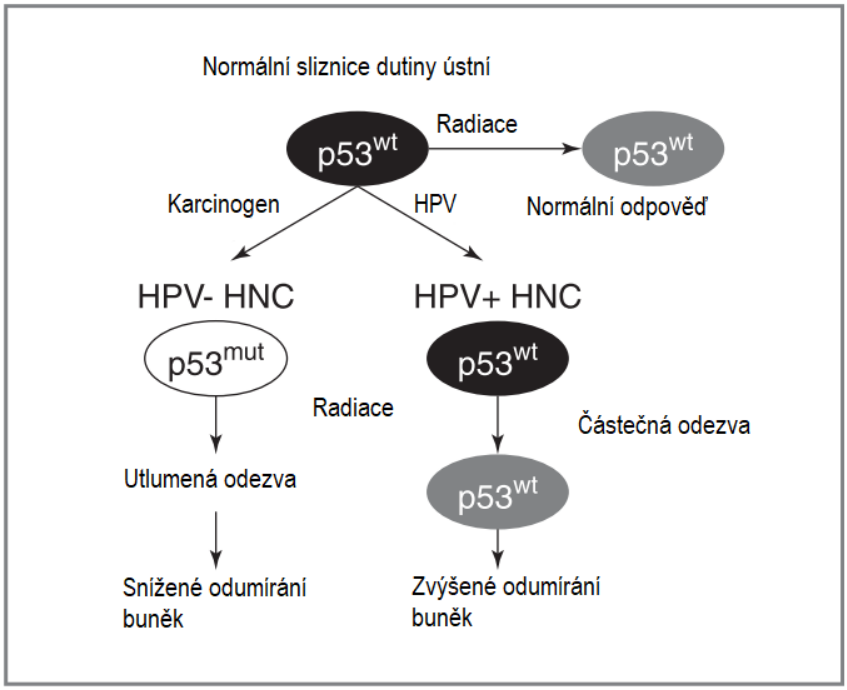
3.3.3 Charakteristika HNSCC pozitivních a negativních na HPV

Jak již bylo zmíněno, HNSCC pozitivní a negativní na HPV (HPV-) se liší rizikovými faktory a typickou lokalizací. HPV+ HNSCC se ve srovnání s HPV- většinou vyskytují v mladším věku, převážně u mužů a bývají diagnostikovány v pozdějších stádiích nádoru a častěji metastazují (Chaturvedi *et al.*, 2013).

Navzdory tomu pacienti s HPV+ HNSCC mají lepší prognózu, která byla již mnohokrát potvrzena. V rozsáhle studii pacientů s nádory orofaryngu měli pacienti s HPV+ nádory až o 26,9 % vyšší šanci na celkové přežití oproti pacientům s HPV- nádory (Li *et al.*, 2018). Lepší prognózu pacientů s HNSCC asociovanými s HPV podporují i data z České republiky. Ve studii zahrnující 109 pacientů s nádory tonsil (Rotnáglová *et al.*, 2011) bylo pozorováno zvýšené specifické přežívání pacientů s nádory pozitivními na HPV DNA. Podle další studie na 142 pacientech s HNSCC měli pacienti s nádory negativními na HPV DNA 3× vyšší riziko celkového úmrtí a 6× vyšší riziko opětovného výskytu onemocnění (Koslabova *et al.*, 2013). Z těchto výsledků vyplývá, že infekce HPV je u HNSCC významným prognostickým faktorem.

V rozdílném přežívání pacientů s HPV+ a HPV- HNSCC by mohla hrát roli řada faktorů, protože se ukazuje, že se tyto dvě skupiny nádorů liší v mnoha dalších charakteristikách. Při porovnání 516 HNSCC z databáze TCGA (z angl. The Cancer genome atlas) se exprese mRNA lišila mezi skupinou HPV+ a HPV- nádorů celkem u 1 673 genů (Chen *et al.*, 2018). Produkty genů s vyšší expresí v HPV+ HNSCC se často podílely na funkci imunitního systému, byly exprimované například v T-lymfocytech, B-lymfocytech nebo M1 makrofázích. Autoři vyslovili hypotézu, že by zvýšená aktivace imunitního systému u HPV+ HNSCC mohla být způsobena expresí virových antigenů HPV. Odlišnou aktivaci buněk imunitního systému u HNSCC různé virové etiologie potvrzují i výsledky z naší laboratoře, kde bylo v HNSCC negativní virové etiologie ve srovnání s HPV+ HNSCC detekováno na úrovni exprese proteinu i mRNA více pronádorových makrofágů M2 (Pokrývková *et al.*, 2021).

Nádory pozitivní a negativní na HPV se liší také v odpovědi na léčbu. HPV+ HNSCC odpovídají lépe na radioterapii. Jedním z možných důvodů lepší odpovědi HPV+ HNSCC na léčbu je opožděná oprava dvouvláknových zlomů DNA, která byla pozorována u HPV+ buněčných linií i v myším modelu (Park *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2015). Ve studii, kde byla zároveň potvrzena až 2,7× větší citlivost HPV+ nádorových buněk k radioterapii, autoři navrhují, že za tento efekt zodpovídá jiný mechanismus (Obrázek č. 6) založený na skutečnosti, že HPV- nádory mají často mutaci v genu pro nádorový supresor p53 nebo pro jeho efektory (Kimple *et al.*, 2013). Nefunkční p53 má za následek sníženou odpověď HPV- HNSCC na poškození DNA způsobené radiací. V HPV+ nádorech bývá funkce p53 utlumena virovým onkoproteinem E6, může ale stále přetrvávat nízká hladina normálně fungujícího p53. Ten je během vystavení buňky stresu, jako je ozáření, aktivován a může způsobit zvýšené odumírání buněk.



Obrázek č. 6– Navrhovaný mechanismus zodpovědný za zvýšenou citlivost k radiaci u HNSCC pozitivních na HPV, převzato a upraveno podle (Kimple *et al.*, 2013). HPV (human papillomavirus).

HNSCC pozitivní a negativní na HPV se také liší v metabolismu. U HPV+ HNSCC orofaryngu byla prokázána zvýšená úroveň proteinů podílejících se na respiraci a na transportu metabolitů, například GLUT1 (Krupar et al., 2014). Krupar a kol. ve stejné studii prokázali vyšší hromadění laktátu v extracelulárním prostoru HPV- buněčných linií. HPV+ linie se lépe přizpůsobovaly laktátové acidóze, což naznačuje schopnost metabolizovat laktát. Jiné studie dospěly k odlišným závěrům. Fleming a kol. (2019) potvrdili sice u HPV- HNSCC vyšší expresi mRNA genů souvisejících s glykolýzou i oxidativní fosforylací, ale například pro GLUT1 signifikantní rozdíl pozorován nebyl.

3.3.3.1 HNSCC a hypoxie

Bylo prokázáno, že onkoproteiny HPV mají vliv na expresi genů indukovaných hypoxií. Přímou interakci HPV proteinu E6 s α podjednotkou faktoru HIF1 pomocí koimunoprecipitace prokázali Guo a kol. (Guo *et al.*, 2014a). Protein E6 měl vliv na zvýšení aktivity HIF1 a zároveň ukázali, že E6 stabilizuje podjednotku HIF1α snížením její interakce s proteinem VHL, který běžně směřuje HIF1α k degradaci v proteasomu. Nepřímo podporuje tyto výsledky i studie, ve které byla detekována vyšší aktivace podjednotky HIF1α v HPV+ buněčných liniích HNSCC (Knuth *et al.*, 2017). V rozporu s tímto pozorováním jsou výsledky studie na buněčných liniích z HPV- HNSCC, kde byla detekována vyšší exprese mRNA

hypoxických znaků HIF1α i CA9 a PDK. Buněčné linie z HPV- HNSCC vykazovaly intenzivnější glykolýzu a produkci laktátu, HPV+ buňky měly zvýšenou spotřebu kyslíku a využívaly tedy více aerobní respiraci (Jung *et al.*, 2017). V jiné studii ale rozdíl v množství proteinu HIF1α mezi HPV+ a HPV- nádory orofaryngu pozorován nebyl (Hong *et al.*, 2013). Závěry studií nejsou zatím jednoznačné, neukazují na vyšší míru hypoxie u HPV+ nebo HPV- HNSCC.

Vedle aktivní infekce HPV je také hypoxie v HNSCC významným prognostickým a prediktivním faktorem. Vliv zvýšené exprese proteinů HIF1α i HIF2α na horší prognózu pacientů s HNSCC byl pozorován v řadě studií (Gong et al., 2013). V HNSCC byla také na proteinové úrovni pozorována vyšší exprese markeru hypoxie GLUT1 v souvislosti s pokročilejším stadiem nádoru (Li *et al.*, 2008). Dále byl u HNSCC pozorován prognostický význam PDK1. V HNSCC může být PDK1 aktivována i epidermálním růstovým faktorem, který je jedním z hlavních příčin tvorby metastáz u HNSCC (Hsu *et al.*, 2017). Autoři také pozorovali sníženou migraci a invazivitu buněk následkem inhibice aktivity PDK1. Tento jev by mohl být způsoben změnou aktivity **MMPs**, protože inhibice PDK1 vedla ke snížení exprese mRNA pro MMP1, 2, 3 a 9. MMPs jsou v nádorech často vysoce aktivní, jedná se o sekretované, případně membránové proteiny. Štěpí zejména kolagen a hrají roli během buněčné proliferace, migrace nebo během angiogeneze. Jednotlivé druhy MMPs se mezi sebou liší štěpenými substráty, nebo například tkáňově specifickou expresí (Cui, Hu and Khalil, 2017). Ve vzorcích HNSCC byla pozorována zvýšená exprese mRNA 8 typů MMPs oproti zdravé tkáni. Vyšší exprese mRNA pro MMP1 a 9 souvisela s pokročilejším stádiem nádoru a pro MMP9 byla rovněž pozorována souvislost s intenzivnější infiltrací nádorových buněk do ostatních tkání (O-charoenrat, Rhys-Evans and Eccles, 2001). Roli MMPs jako prognostického faktoru HNSCC potvrdili autoři další studie, kteří pozorovali souvislost vyšší exprese proteinu MMP9 se zkráceným pětiletým přežíváním pacientů a se zvýšeným rizikem relapsu (Ruokolainen, Pääkkö and Turpeenniemi-Hujanen, 2004).

V metaanalýze zabývající se expresí CA9, dalšího z endogenních markerů hypoxie, v 842 vzorcích HNSCC bylo 61 % nádorů pozitivních na CA9. Autoři pozorovali souvislost přítomnosti CA9 se sníženým celkovým přežíváním pacientů (Peridis *et al.*, 2011). Nádorové buňky, i obecně buňky hypoxické, často produkují laktát. CA9 by tedy jakožto regulátor pH mohla podporovat jejich přežívání předcházením jejich překyselení.

Vliv na prognózu HNSCC může mít i krevní zásobení nádoru. Vyšší exprese proteinu VEGFa byla u pacientů s HNSCC spojena se zhoršeným celkovým přežíváním pacientů společně s pokročilejším stádiem nádoru. (Kyzas *et al.*, 2005). VEGFa je u HNSCC také možným terapeutickým cílem. Využití tzv. anti-angiogenní terapie zlepšovalo u pacientů výsledky léčby. Ačkoliv by se dalo očekávat, že inhibice VEGF faktorů by mohla vést ke zvýšení hypoxie a tedy k radiorezistenci nádorů, tento efekt pozorován nebyl. Byla vyslovena hypotéza, že příliš vysoká exprese VEGF v nádorech vede ke tvorbě abnormální vaskulatury, a jeho inhibice má za následek obnovení běžného zásobení kyslíkem, což zlepšuje výsledky chemoterapie i radioterapie (Seiwert and Cohen, 2008).

Výsledky těchto studií potvrzují roli exprese markerů hypoxie jako prognostických faktorů HNSCC. Prediktivní roli hypoxie v HNSCC potvrzují i výsledky metaanalýzy která shrnovala výsledky 32 klinických zkoušek zahrnující celkem 4 805 pacientů s HNSCC léčených radioterapií (Overgaard, 2011). Část pacientů současně užívala léky snižující hypoxii nádoru, což mělo vliv na zlepšení výsledků radioterapie, ať už se jednalo o celkové přežívání pacientů, sníženou tvorbu metastáz nebo nižší míru komplikací během léčby.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.3, HPV+ a HPV- HNSCC se mezi sebou liší mimo jiné rozdílnou odpovědí na léčbu, zejména radioterapii. Jedním z možných důvodů by mohla být právě rozdílná míra hypoxie mezi těmito dvěma skupinami nádorů. Tuto hypotézu potvrzují i výsledky studie zabývající se účinností radioterapie za využití modifikátorů hypoxie. V této studii byla potvrzena lepší odpověď na radioterapii HPV+ HNSCC Užívání modifikátoru hypoxie, nimorazolu, mělo pozitivní efekt na výsledek léčby pouze u HPV- pacientů. Pro HPV+ pacienty byl účinek nimorazolu srovnatelný s placebem (Lassen *et al.*, 2010). Tyto výsledky naznačují, že radiorezistence vyvolaná hypoxií se u HPV+ HNSCC nevyskytuje. V souladu s těmito výsledky je i pozorování u pacientů s HPV- HNSCC s vysokou expresí 15 markerů hypoxie podle Toustrup a kol. (kap. 3.1.1), kteří měli častější rekurence nádorů po radioterapii (Linge *et al.*, 2016).

Dalším mechanismem, který by mohl ovlivňovat odpověď na léčbu HPV+ HNSCC je navození dormantního stádia HPV v hypoxii. Následkem hypoxie je u těchto nádorů potlačena exprese onkogenů E6 a E7, což může vést k navození dormance, která trvá až do obnovení normoxie (Hoppe-Seyler *et al.*, 2017). Buňky s hypoxicky navozeným dormantním stádiem mají

sníženou citlivost k léčbě a vzhledem k reaktivaci HPV onkogenů v normoxii by se z nich za těchto podmínek mohl obnovit růst nádoru. Bylo ukázáno, že v hypoxii dochází k omezené represi transkripce HPV onkogenů a tato represe je závislá na signalizaci AKT kinázy (z angl. Ak strain transforming)(Bossler *et al.*, 2019).

HPV + a HPV- HNSCC se liší v klinickopatologických charakteristikách pacientů i nádorovém mikroprostředí. Infekce HPV je v HNSCC významným prognostickým a prediktivním faktorem, ale další faktory, mezi které patří i přítomnost hypoxie v nádorech, prognózu a odpověď na léčbu výrazně ovlivňují. Právě výzkum propojení vlivu jednotlivých významných rizikových faktorů by mohl vysvětlit rozdíly v prognóze těchto pacientů a umožnit vhodnější volbu terapie. Rozdíly mezi HPV+ a HPV- HNSCC shrnuje Tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 – Srovnání nádorů hlavy a krku pozitivních na HPV s negativními na HPV. HPV (human papillomavirus).

	HPV+ HNSCC	**HPV- HNSCC**
Rizikové faktory	Infekce HPV	Kouření, konzumace alkoholu
Lokalizace	Zejména orofaryng (tonsily, kořen jazyka)	Mimo orofaryng – např. dutina ústní, nosohltan
Věk v čase diagnózy	Mladší (<50 let)	Starší (>50 let)
Šance na celkové přežití pacientů	Vyšší (až o 26,9 %)	Nižší
Citlivost nádorových buněk k radioterapii	Vyšší (až 2,7×)	Nižší
Aktivace imunitního systému	Silnější – aktivace T- a B-buněk, M1 makrofágů	Slabší
Míra hypoxie	Výsledky studií nejednoznačné	

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné linie

Buněčné linie, které jsou dostupné v naší laboratoři, jsem používala jako modelový systém pro testování párů primerů pro RT-qPCR (z angl. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction), pro sestavování standartních křivek a jako pozitivní kontroly reakcí. Přehled použitých buněčných linií včetně jejich původu a HPV statusu uvádím v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 – Přehled použitých buněčných linií.

Název	HPV status	Původ
SiHa	HPV16	Karcinom děložního čípku
HeLa	HPV18	Karcinom děložního čípku
CaSki	HPV16	Karcinom děložního čípku
CRL3240	HPV16	Karcinom hypofaryngu
HTB31	Negativní	Karcinom děložního čípku
CCL138	Negativní	Plicní metastáza karcinomu faryngu
HTB43	Negativní	Karcinom faryngu
HaCaT	Negativní	Imortalizované lidské keratinocyty

4.1.2 Klinické vzorky

Vzorky nádorů hlavy a krku byly shromažďovány v rámci studie probíhající v naší laboratoři ve spolupráci s Klinikou otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice (FN) Motol – AZV 17-28055A „Stanovení fenotypu a funkce imunitních buněk jakožto prediktorů odpovědi na léčbu u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku“. Tato studie byla schválena etickou komisí FN Motol a Přírodovědecké fakulty UK. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas a vyplnili dotazník týkající se rizikových faktorů pro infekci HPV a indukci nádorů hlavy a krku.

Po chirurgickém odstranění nádoru byla část fixována v 10% neutrálním formalínu a zalita do parafínu (FFPE, z angl. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) a druhá část byla po potvrzení přítomnosti nádorové tkáně patologem bezprostředně převezena do laboratoře v médiu

RPMI (Sigma-Aldrich, USA) při teplotě 4°C. Z nádoru byly ihned laborantkami izolovány buňky systém gentleMACS (Miltenyi Biotec, USA) a primárně použity pro jiné laboratorní účely. Zbylá buněčná suspenze byla uchovávána ve stabilizačním roztoku RNAlater® (Life Technologies, USA) při -80 °C.

4.1.3 Histologické řezy

Ze vzorků fixovaných ve formalínu byly ve FN Motol připraveny řezy o tloušťce 2 µm na podložní skla SuperFrost® Plus (VWR, Belgie) pro imunohistochemické barvení. Pro optimalizaci postupu a nastavení panelů jednotlivých protilátek jsem využila FFPE řezy tkání tonsil, jater, a jaterního nádoru.

4.2 Charakterizace vzorků

4.2.1 Izolace DNA a RNA z buněk

Před izolací nukleových kyselin (NK) bylo třeba nejdříve odstranit médium RNAlater® (Life Technologies, USA), ve kterém byly buňky uchovávány. Ke vzorku ve zkumavce jsem přidala přibližně polovinu objemu daného vzorku fosfátového pufru (PBS, z angl. Phosphate Buffered Saline). Centrifugovala jsem 1 min při pokojové teplotě (RT, z angl. room temperature) a otáčkách 5000 × g a opatrně pipetou odsála supernatant.

Izolaci NK z buněk nádoru a z buněk infiltrujících nádor jsem prováděla za pomoci kitu NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set (Macherey-Nagel, Německo) dle protokolu výrobce (Macherey-Nagel NucleoSpin RNA protokol) při RT. K buněčnému peletu jsem přidala 350 µl lyzačního pufru RA1 a 3,5 µl β-merkaptoethanolu. Lyzát jsem homogenizovala opakovaným nasátím injekční stříkačkou o průměru 0,9 mm. Poté jsem lyzát přenesla na kolonku NucleoSpin s fialovým pruhem a centrifugovala 1 minutu při 11000 × g. Kolonku jsem odstranila, do sběrné zkumavky jsem přidala 350 µl 70% ethanolu a lyzát promíchala pipetováním. Dále jsem lyzát přenesla do sběrné zkumavky s NucleoSpin RNA Column s modrým pruhem a centrifugovala 1 minutu při 11000 × g.

Následovala izolace DNA. Kolonku jsem dvakrát promyla 500 µl pufru DNA Wash – vždy jsem centrifugovala 1 minutu při 11000 × g. Poté jsem otevřela víčko kolonky a nechala inkubovat 3 minuty při RT pro kompletní odpaření ethanolu. DNA jsem eluovala přidáním 60–100 µl (podle množství vstupního materiálu) elučního pufru DNA přímo na membránu kolonky. Po

inkubaci 1 minutu jsem centrifugovala 1 minutu při 11000 × g. Vyizolovanou DNA jsem uchovávala v mrazáku při -20°C.

Dále jsem pokračovala izolací RNA. Nejprve jsem odstranila zbytkovou DNA přidáním reakční směsi s DNAsou (Macherey-Nagel, Německo) (10 µl DNAsy a 90 µl reakčního pufru pro DNAsu/jeden vzorek) na membránu kolonky a inkubovala 15 minut. Kolonku jsem poté promyla 200 µl pufru RAW2 který inaktivuje DNasu a centrifugovala jsem 1 minutu a 11000 × g. Následovalo 2× promytí pufrem RA3, poprvé v objemu 600 µl, podruhé 250 µl. Poprvé jsem centrifugovala 1 minutu na 11000 × g, podruhé 2 minuty při stejných otáčkách. Eluce RNA proběhla podle množství vstupního materiálu přidáním 30–60 µl vody prosté RNas a centrifugací 1 minutu a 11000 × g. RNA jsem do dalšího použití uchovávala při -80 °C.

Vždy jsem k izolaci přidávala i negativní kontrolu, ve které jsem místo buněčné suspenze přidala vodu prostou RNas.

4.2.2 Kontrola kvality a určení koncentrace nukleových kyselin

4.2.2.1 Nanodrop

Koncentraci a čistotu vyizolované DNA a RNA jsem měřila na přístroji NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Čistota je určována poměrem absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Čistá DNA by měla mít tento poměr $A_{260/280}$= 1,8, a pro čistou RNA se $A_{260/280}$= 2.

4.2.2.2 Experion

Kvalitu RNA jsem stanovovala na přístroji Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, USA) dle protokolu výrobce (Experion™ RNA StdSens Analysis Kit). Tento systém pracuje na principu kapilární elektroforézy a kvalitu RNA určuje algoritmus zejména poměrem 18S s 28S rRNA, do výpočtu jsou ale zahrnuty i další oblasti RNA. Výstupem analýzy je hodnota RQI 1–10 (z angl. RNA quality index), která reprezentuje integritu RNA (Mueller, 2004).

Pro analýzu je ideální použít intaktní RNA, nebo alespoň co nejméně degradovanou RNA (RQI> 8). Použití degradované RNA může ovlivnit výsledky následných pokusů (Fleige *et al.*, 2006).

4.2.3 Kontrola izolace, detekce virové DNA a určení typu HPV

4.2.3.1 β-globin PCR

Pro ověření dostatečného množství a koncentrace vyizolované DNA a nepřítomnosti inhibitorů PCR jsem využila PCR reakci amplifikující část genu pro lidský β-globin. Tuto reakci jsem použila i pro ověření negativních kontrol izolací. Pro negativní kontroly izolací by neměl být přítomný žádný produkt PCR reakce, protože jsem do těchto kontrol izolace přidala místo buněčné suspenze vodu prostou RNAs. Složení PCR reakce je uvedeno v Tabulce č. 4. Pro pozitivní kontrolu jsem přidala DNA z buněčné linie SiHa nebo HaCaT, a pro negativní kontrolu vodu prostou RNas.

Tabulka č. 4 – Složení PCR reakce pro β-globin.

Složka reakční směsi (výrobce)	**Zásobní koncentrace**	**Objem/1 vzorek (µl)**
Pufr AmpliTaq Gold s (NH4)2SO4 (Thermo Fisher Scientific, USA)	10×	2,5
MgCl2 (Thermo Fisher Scientific, USA)	25 µM	4
dNTPs (New England Biolabs, USA)	10 mM	0,5
Směs primerů (IDT**)**	10×	2,5
AmpliTaq Gold DNA Pol (Thermo Fisher Scientific, USA)	5 U/µl	0,125
ddH_2O		14,375
DNA		1

PCR reakce proběhla v cykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada), za těchto teplotních podmínek: počáteční denaturace (5 min při 94 °C), 40 cyklů skládajících se z denaturace (1 min při 94 °C), nasedání primerů (2 min při 55 °C) a elongace řetězce (2 min při 72 °C), na závěr byla zařazena fáze elongace 3 minuty při 72 °C.

Pro detekci produktů PCR reakcí jsem využila gelovou elektroforézu. 2% gel jsem připravila z 0,8 g agarózy Ultra Pure Agarose Electrophoresis Grade (LifeTechnologies, Skotsko), kterou jsem v 40 ml TBE pufru rozvařila v mikrovlnné troubě. Přidala jsem 2 µl barvy GelRed™ (Biotium, USA). Do první pozice na gelu jsem nanesla 5 µl žebříčku GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Produkty PCR jsem nanášela v objemu 10 µl s 2 µl nanášecí barvy 6× loading buffer/dye (Thermo Fisher Scientific, USA). Elektroforéza trvala 30 minut při 110 V. Pro vizualizaci výsledků elektroforézy jsem použila přístroj InGenius3 (Syngene, UK) detekující fluorescenci.

4.2.3.2 HPV L1 PCR a RLB

Z důvodu protiepidemických opatření byla detekce HPV DNA pro určení HPV statusu vzorků i určení typu HPV provedeno v rámci rutinního provozu v Národní referenční laboratoři pro papilomaviry a polyomaviry (NRL PV) v Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT).

HPV DNA byla detekována pomocí PCR reakce detekující část virového pozdního genu L1 s primery značenými biotinem na 5´konci. Produkty PCR byly dále použity k určení typu HPV metodou reverzní hybridizace RLB (z angl. reverse line blotting). Tato metoda umožňuje rozlišit až 37 typů HPV a spočívá v hybridizaci produktů PCR reakce k próbám, které jsou kovalentně navázané na membráně a jsou specifické pro jednotlivé typy HPV. Výhodou této metody je možnost zpracování většího množství vzorků najednou, vysoká specificita a možnost detekce multiplicitní infekce (Van den Brule *et al.*, 2002). Membrána byla po hybridizaci PCR produktů označených biotinem inkubována s konjugátem streptavidinu s křenovou peroxidázou. Konjugát byl vizualizován pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu. Následně byla membrána exponována na film a odečteny pozitivní signály.

4.2.4 Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci jsem použila RNA vyizolovanou z buněk (kap. 4.2.1). Vzorky jsem uchovávala na ledu a RNA jsem naředila na 500 ng v objemu 8 µl. RNA, která nedosahovala potřebné koncentrace, jsem do reakce přidala v původní koncentraci v objemu 8 µl. Prvním krokem bylo ošetření vzorků DNAsou pro odstranění zbytkové DNA. Ke každému vzorku jsem přidala 2 µl směsi skládající se pro každý vzorek z 1 µl 10× koncentrovaného pufru (Jena Bioscience), 0,5 µl DNAsy o zásobní koncentraci 2U/ml (Jena Bioscience) a 0,5 µl vody prosté RNas. Vzorky jsem promíchala pipetováním. Dále jsem inkubovala v termobloku Accublock (Labnet International, USA) 30 minut při teplotě 37 °C a poté 10 minut při teplotě 65 °C pro inaktivaci DNAsy. Po inkubaci jsem vzorky krátce stočila a uchovávala na ledu.

Následovala samotná reverzní transkripce. Zkumavky jsem krátce stočila a ke každému vzorku přidala 10 µl směsi obsahující 4 µl reakčního pufru (Promega, USA), 1 µl 10mM dNTPs, 2 µl 50mM směsi náhodných hexamerů (Random Hexamer) (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5 µl RNAsinu 40 U/ µl (Promega, USA) a 0,25 µl reverzní transkriptázy viru myší leukémie 200 U/ µl (MMLV z angl. Moloney Murine Leukemia Virus) (Promega, USA) a 2,25

µl vody prosté RNas. Po promíchání jsem vzorky inkubovala v termobloku 1 hodinu při 37°C. Vzniklou cDNA jsem uchovávala v mrazáku do dalšího použití při –80 °C.

Vždy jsem zařazovala také negativní kontrolu DNasování obsahující 8 µl vody prosté RNas místo RNA, negativní kontrolu reverzní transkripce obsahující 10 µl směsi pro reverzní transkripci a 10 µl vody, a pozitivní kontrolu, pro kterou jsem použila 500 ng RNA vyizolované z buněčné linie SiHa.

4.2.5 Kontrola reverzní transkripce – HPRT PCR

Kontrolu reverzní transkripce a získání cDNA jsem provedla pomocí PCR amplifikující úsek cDNA pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu (HPRT). Dle dostupnosti reagencií jsem využívala 2 různé polymerázy, složení reakcí se nachází v tabulkách 5 a 6.

Pro ověření účinnosti DNAsování jsem několikrát zařadila PCR i po počátečním působení DNAsy. Jako pozitivní kontrolu jsem použila cDNA vyizolovanou z buněčné linie SiHa nebo HaCaT. Pro negativní kontrolu jsem místo cDNA přidala vodu prostou RNas.

Tabulka č. 5 – Složení PCR reakce pro HPRT. F (forward), R (reverse).

Složka reakční směsi (výrobce)	Zásobní koncentrace	Objem/1 vzorek (µl)
10× pufr Standard Taq Reaction (New England Biolabs, USA)	10×	2,5
Primer F (IDT, USA)	25 µM	0,5
Primer R (IDT, USA)	25 µM	0,5
dNTPs (New England Biolabs, USA)	10 mM	0,5
Hot Start Taq DNA polymeráza (New England Biolabs, USA)	5 U/µl	0,1
ddH_2O		19,9
cDNA		1

PCR reakce probíhaly vždy v cykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada), za teplotních podmínek specifikovaných pro každou z reakcí níže.

Amplifikace proběhla za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 30s, 39 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 30s, nasedání primerů při 64 °C po dobu 30s a amplifikace při 68 °C po dobu 30s, a závěrečné fáze amplifikace při 68 °C po dobu 5 minut.

Tabulka č. 6 – Složení PCR reakce pro HPRT. F (forward), R (reverse).

Složka reakční směsi (výrobce)	Zásobní koncentrace	Objem/1 vzorek (µl)
Pufr AmpliTaq Gold s (NH4)2SO4 (Thermo Fisher Scientific, USA)	10×	2,5
$MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific, USA)	25 µM	4
Primer F (IDT, USA)	25 µM	2,5
Primer R (IDT, USA)	25 µM	2,5
dNTPs (New England Biolabs, USA)	10 mM	0,5
TaqPol AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA)	5 U/µl	0,25
ddH_2O		12,25
cDNA		0,5

Amplifikace proběhla za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 10 minut, 39 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 1 minuty, nasedání primerů při 55 °C po dobu 1 minuty a amplifikace při 72 °C po dobu 1 minuty, a závěrečné fáze amplifikace při 72 °C po dobu 4 minut.

Detekci produktů PCR jsem provedla způsobem popsaným v kapitole 4.2.3.1.

4.2.6 HPV E6 PCR

Pozitivní výsledek detekce HPV DNA L1 není průkazem aktivní virové infekce. Pro prokázání aktivní virové infekce jsem využila detekci virové mRNA onkogenu E6. Na cDNA vzniklé reverzní transkripcí jsem provedla PCR amplifikující úsek genu pro protein E6 z HPV16 (Smeets *et al.*, 2007). V případě detekce jiného typu HPV metodou RLB byly dostupné i primery pro E6 jiných typů HPV, vzorky, pro které jsem E6 PCR zpracovávala já byly ale vždy typu HPV16. Složení reakce se nachází v Tabulce č. 7. Jako pozitivní kontrolu jsem použila cDNA vyizolovanou z buněčné linie SiHa nebo HaCaT. Pro negativní kontrolu jsem místo cDNA přidala vodu prostou RNas.

Tabulka č. 7 – Složení PCR reakce pro HPV E6. F (forward), R (reverse).

Složka reakční směsi (výrobce)	Zásobní koncentrace	Objem/1 vzorek (µl)
Pufr Standard Taq Reaction (New England Biolabs, USA)	10×	2,5
Primer F (Invitrogen, USA)	25 µM	0,5
Primer R (Invitrogen, USA)	25 µM	0,5
dNTPs (New England Biolabs, USA)	10 mM	0,5
Hot Start Taq DNA polymeráza (New England Biolabs, USA)	5 U/µl	0,1
ddH_2O		18,9
cDNA		2,5

Amplifikace proběhla v cykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 30 s, 39 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 30 s, nasedání primerů při 55 °C po dobu 30 s a amplifikace při 68 °C po dobu 30 s, a závěrečné fáze amplifikace při 68 °C po dobu 5 minut.

Detekci produktů PCR jsem provedla způsobem popsaným v kapitole 4.2.3.1.

Přehled primerů použitých pro PCR reakce z kapitoly 4.2.3, 4.2.5 a 4.2.6 se nachází v Tabulce č. 8.

Tabulka č .8 – Primery použité pro PCR. F (forward), R (reverse).

Cílový gen	Název primeru	Sekvence 5´-3´	Délka produktu
β -globin	GH20-F	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	DNA 268 pb
	PC04-R	CAACTTCATCCACGTTCACC	
HPRT	HPRT-F	CACTGGCAAAACAATGCAGACT	cDNA 117 bp
	HPRT-R	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT	
HPV16 E6	E6fwSmeets	TTACTGCGACGTGAGGTGTA	DNA 248 pb / cDNA 86 bp
	E6rvSmeets	GGAATCTTTGCTTTTTGTCC	

4.3 qPCR

Pro stanovení exprese vybraných hypoxických markerů na úrovni exprese mRNA (cDNA) jsem využila kvantitativní qPCR.

Pro všechny qPCR jsem použila reakční pufr Xceed qPCR SG 2× mix Lo-ROX (IAB, Česká republika) s barvivem SYBR Green. Pracovala jsem v částečné tmě. Nejprve jsem si připravila směsi pro požadovaný počet reakcí podle následujícího rozpisu pro 1 reakci: 5 µl 2× koncentrovaného reakčního pufru Xceed, 0,4 µl směsi forward a reverse primerů pro sledovaný marker o 10µM koncentraci a 2,6 µl vody prosté RNas. Směs jsem rozpipetovala po 8 µl do jamek na 96jamkové destičce Multiplate PCR Plate 96-well white (Biorad, USA) a ke každému vzorku jsem přidala 2 µl 4× ředěné cDNA z reverzní transkripce. Pro negativní kontroly jsem přidala 2 µl vody prosté RNas. Destičku jsem zalepila fólií a umístila do cykleru CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA). Amplifikační program se skládal z následujících částí: iniciační fáze denaturace (3 minuty při 95 °C), 40 cyklů amplifikace (10 s při 95 °C a 30 s při 60 °C), a na konci byla zařazena analýza křivek tání (melting analýza). Fluorescence byla odečítána v kanálu SYBR green.

Páry primerů pro qPCR byly navrženy v BIOCEV (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci) – Gene Core a jejich přehled se nachází v Tabulce č. 9

Tabulka č.9 – Primery použité pro qPCR. Templátová mRNA dostupná dle uvedeného čísla na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ [cit. 29.7.2022].

Cílový gen	Název primeru	Sekvence 5´-3´	Velikost amplikonu (bp)	Templátová mRNA
HIF1a	hHIF1A_F	ACCCATTCCTCACCCATCAAA	134	NM_001243084.1
	hHIF1A_R	GTTCTTCTGGCTCATATCCCATC		
NOTCH1	hNOTCH1_F	CAGCCCCTCGCCCTG	143	NM_017617.5
	hNOTCH1_R	CCCCGTTCTTGCAGTTGTTT		
GLUT1	hSCL2A1_F	TGGCTACAACACTGGAGTCATC	128	NM_006516.4
	hSCL2A1_R	CTGAGAGGGACCAGAGCGTG		
P4HA1	hP4HA1_F	AGTACATGACCCTGAGACTGGA	84	NM_000917.3
	hP4HA1_R	GGATTTTCATAGCCAGAGAGCC		
VEGFA	hVEGFA_F	GCTGTCTTGGGTGCATTGG	69	(Nayak *et al.*, 2012)
	hVEGFA_R	GCAGCCTGGGACCACTTG		

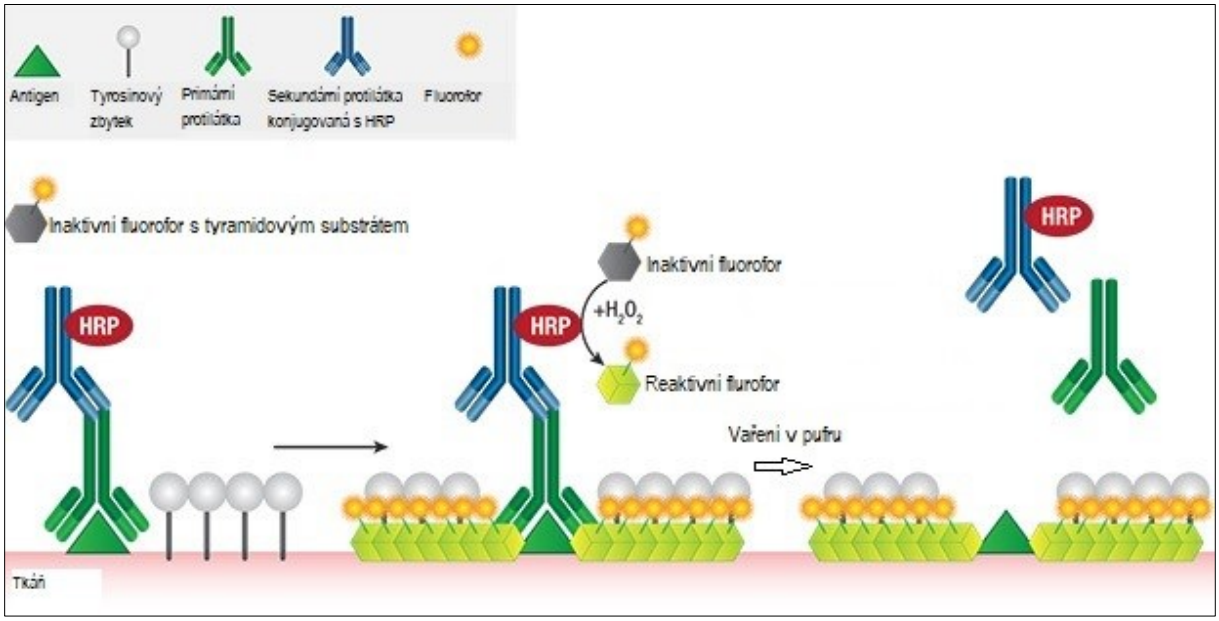
CA9	hCA9_F	TTCACCTCAGCACCGCCTTT	136	NM_001216.3
	hCA9_R	TCTTCCAAGCGAGACAGCAAC		
PDK1	hPDK1_F	CTCAGGACACCATCCGTTCA	146	NM_001278549.2
	hPDK1_R	CATAAACTAGAGACCTGCAACCA		
HIF2	hEPAS1_F	TCAAAGGGCCACAGCGACAA	131	NM_001430.5
	hEPAS1_R	CCAGCTCATAGAACACCTCCGT		
HPRT	HPRT-F	CACTGGCAAAACAATGCAGACT	117	(Dalewská, 2020)
	HPRT-R	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT		
GUSb	GUS-F	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	101	(Dalewská, 2020)
	GUS-R	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA		
ACTb	hACTB-F	CCACGAAACTACCTTCAACTCCA	132	(Dalewská, 2020)
	hACTB-R	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC		

4.3.1 Zpracování výsledků

V programu BioradCFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, USA) jsem kontrolovala specifitu primerů na křivkách tání produktů qPCR reakce, vytvořila standartní křivky, provedla kontrolu účinnosti amplifikace a nastavení tresholdu (prahové hodnoty) pro odečet hodnot Ct (z angl. cycle treshold). Na základě Ct jsem pro všechny vzorky a reakce vytvořila tabulku v programu Excel (verze 2206), kterou jsem dále zpracovávala v programu GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko). Pro výsledná data jsem provedla relativní kvantifikaci normalizovanou na dva referenční geny ΔΔCt metodou.

4.4 Multispektrální imunohistochemie

Multispektrální imunohistochemie (IHC, z angl. immunohistochemistry) je metoda vhodná mimo jiné pro detailní analýzu nádorového mikroprostředí. Umožnuje nám rozlišit nádorové stroma a parenchym, a detekovat více různých znaků na jednom řezu. Princip multiplexového barvení poskytovaného firmou Akoya Biosciences spočívá ve značení primární protilátkou, která se váže na sledovaný epitop, s následným navázáním sekundární protilátky konjugované s HRP (z angl. horseradish peroxidase). HRP následně katalyzuje přeměnu tyramidu Opal fluoroforu do aktivní formy. Takto aktivovaný reaktivní tyramid se kovalentně váže na tyrosinové zbytky nacházející se v oblasti epitopu. Během následného vaření v pufru je odstraněn komplex primární a sekundární protilátky, ale kovalentně navázaný fluorofor zůstává v epitopu – Obrázek č. 7.



Obrázek č. 7 – Princip multispektrální imunohistochemie, převzato a upraveno podle https://www.cellsignal.at/applications/immunohistochemistry/fluoresence-mihc [cit. 29.7.2022]. HRP (horseradish peroxidase).

Hlavním omezením této metody jsou možné překryvy spekter jednotlivých fluoroforů, jsou tedy zapotřebí důsledné kontroly a optimalizace.

Prvním krokem byla deparafinizace a hydratace FFPE řezů tkáně. Sklíčka jsem nechala 60-120 minut v hybridizační peci při 60 °C pro rozpuštění parafínu. Poté jsem je promyla v xylenu pro odstranění zbytků parafínu, 3× po 10 minutách Následovalo zavodnění v sestupné řadě

alkoholů – promytí 5 minut ve 100% EtOH, 5 minut v 96% EtOH a 2 minuty v 70% EtOH. Nakonec jsem sklíčka promyla 2 minuty v destilované vodě.

Fixace řezů probíhala ve 10% formalínu (NBF, z angl. neutral buffered formalin) po dobu 20 minut, následovalo opět promytí 2 minuty v destilované vodě, a poté 2 minuty v TBST (Tris buffered Saline-Tween). Pufr TBST se skládá z 0,1 M TRIS-HCl o pH 7,5, 0,15 M NaCl a 0,05 % detergentu Tween20. Sklíčka jsem přemístila do polyethylenové kyvety se 140 ml pufru o pH 6 (ředěno 10× z AR6 10× buffer, PerkinElmer) nebo 9 (ředěno 10× z HIER T-EDTA 10× pH 9 buffer, Zytomed) – dle výsledků optimalizací pro jednotlivé protilátky a vařila v mikrovlnné troubě 15–45 minut (dle výsledků optimalizací). Formalín způsobuje zesíťovaní tkáně, vařením v pufru je umožněno odhalení antigenů. Po vaření jsem sklíčka nechala v kyvetě chladnout 15 minut a potom je promyla 2 minuty v destilované vodě a 2 minuty v TBST.

Vzorek tkáně na sklíčku jsem ohraničila hydrofobním perem (Elite PAP pen, DiagnosticBioSystems, USA), nanesla na vzorek 2 kapky (100 µl) roztoku pro ředění protilátek a blokování (Antibody Diluent/Block, Akoya Biosciences, USA) a nechala blokovat ve vlhké komůrce při pokojové teplotě 10 minut. Po 10 minutách jsem roztok slila a nanesla jsem 100 µl protilátky, dle optimalizačního protokolu, ředěné v roztoku pro ředění protilátek a blokování. Seznam všech použitých primárních protilátek se nachází v Tabulce č. 10. Inkubace probíhala buďto 1 hodinu při pokojové teplotě, nebo přes noc v lednici (4 °C), opět dle protokolu pro konkrétní protilátku. Po inkubaci s primární protilátkou následovalo promytí v TBST, 3× 2 minuty. Na vzorek jsem nanesla dvě kapky sekundární protilátky, HRP polymeru (Opal Polymer HRP Ms+Rb, Akoya Biosciences, USA) a inkubovala ve vlhké komůrce při pokojové teplotě 10 minut. Dále jsem sklíčka promyla v TBST 3× 2 minuty a nanesla 100 µl Opal fluoroforu (Akoya Biosciences, USA) v ředění dle protokolu. Fluorofor jsem nechala inkubovat 10 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po dalším promytí v TBST 3× 2 minuty jsem v případě multiplexového barvení sklíčka přemístila do polyethylenové kyvety a opakovala kroky vaření v pufru, blokování, inkubace s primární protilátkou, inkubace se sekundární protilátkou a inkubace s Opal fluoroforem včetně promývání, dokud nebyly označeny všechny znaky. V případě monoplexu, nebo po obarvení všech znaků při multiplexu jsem na vzorky nanesla 100 µl DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Akoya Biosciences, USA) v ředění 6,6 µl DAPI do 100 µl TBST a inkubovala 5 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Nakonec jsem skla promyla v TBST 3× 2 minuty.

Na každý vzorek jsem nanesla 1 kapku montovacího média Fluoromount (Diagnostic BioSystems, USA) podle velikosti vzorku, a přikryla jsem ho krycím sklem, jehož okraje jsem zalakovala lakem na nehty, abych předešla vysychání vzorku během skladování.

Tabulka č. 10 – protilátky použité pro IHC-P

Cílový gen	Původ	Izotyp	Klon	Výrobce
ASPH	Myší	IgG1	sc-271391	Santa Cruz Biotechnology (USA)
ASPH	Myší	IgG1	sc-365012	Santa Cruz Biotechnology (USA)
ASPH	Králičí	IgG	5H4/5K3	Laboratoř Prof. Olsen
ASPH	Králičí	IgG	NBP1-69230	Novus Biologicals (USA)
ASPH	Králičí	IgG	NBP2-34125	Novus Biologicals (USA)
HIF1α	Myší	IgG2a	HA111	Novus Biologicals (USA)
Notch celkový	Králičí	IgG	D1E11	Cell Signaling Technology (USA)
Notch aktivovaný	Králičí	IgG	ab8925	Abcam (Velká Británie)
CA9	Králičí	IgG	D47G3	Cell Signaling Technology (USA)
GLUT	Králičí	IgG	ab115730	Abcam (Velká Británie)
VEGFa	Králičí	IgG	EP1176Y	Biocare Medical (USA)
MMP9	Myší	IgG2a	ab119906	Abcam (Velká Británie)
MMP9	Myší	IgG2a	MA-15886	Thermo Fisher Scientific (USA)
MMP13	Myší	IgG1	MA5-14238	Thermo Fisher Scientific (USA)
SRC celkový	Králičí	IgG	36D10	Cell Signaling Technology (USA)
SRC fosforylovaný	Králičí	IgG	D49G4	Cell Signaling Technology (USA)
Cytokeratin	Myší	IgG1	AE1/AE3	Thermo Fisher Scientific (USA)

4.4.1 Analýza vzorků

Ihned po dobarvení jsem řezy fotila na fluorescenčním mikroskopu OLYMPUS BX43 (Olympus Life Science, USA) za použití softwaru Mantra™ Snap 1.0.0 (Akoya Biosciences, USA). Pro každý řez jsem nastavila automaticky expoziční čas pro každý z 5 filtrů (DAPI, FITC, Cy3, Texas Red a Cy5). Pokud daný řez nebyl barven fluoroforem detekovatelným v jednom z filtrů, nastavila jsem ručně expozici na 250 ms. Fotila jsem 3–7 oblastí řezu podle velikosti a heterogenity nádoru vždy na zvětšení 20×10. Nabarvená skla jsem dále skladovala v lednici při 4°C.

4.4.2 Zpracování výsledků

K dalšímu zpracování fotografií jsem použila program InForm 2.6.0. (Akoya Biosciences, USA). Během optimalizací jsem v programu kontrolovala sílu signálu pro jednotlivé fluorofory. Pro přesnou detekci signálu každého flouroforu je možné v programu vytvořit vlastní spektrální knihovnu. Ke tvorbě spekrální knihovny jsem využila preparáty, kde jsem nabarvila pouze jeden znak příslušným flouroforem. Po vyfocení těchto preparátů jsem z nich extrahovala spektra pro jednotlivé fluorofory, které jsem využila v následných analýzách.

Pro kontrolu kvality multiplexových panelů jsem použila software Phenoptr Reports (Akoya Biosciences, USA).

Dalším krokem bylo trénování softwaru na rozlišení nádorové tkáně od stromatu, na rozlišení jednotlivých buněk a jejich fenotypů. Pracovala jsem v programu InForm 2.6.0. Pro segmentaci tkáně jsem použila signál DAPI a cytokeratinu. Oblasti tkáně značené zároveď DAPI a cytokeratinem jsem označila jako nádorovou tkáň, neboť Cytokeratin barví specificky nádorové buňky. Oblasti buněk, které nebyly značeny cytokeratinem jsem označila jako nádorové stroma a prázdné bezjaderné oblasti (místa bez DAPI signálu) jsem označila jako pozadí. Takto je možné postupnými úpravami natrénovat software, aby dle označených oblastí automaticky obrazy tkáně segmentoval. Segmentaci buněk na jádra, cytoplazmu a membránu jsem provedla pro každý panel zvlášť. Jádra program rozeznával vždy podle barvení DAPI, pro segmentaci cytoplazmy jsem využila barvení cytokeratinem, a membrána byla rozeznána podle značení protilátkou pro GLUT1 nebo HIF1α. Pro fenotypizaci jsem stanovila jednotlivé fenotypy buněk: ASPH+/-, HIF1α +/-, VEGFa+/-, GLUT1+/-, MMP13+/- a MMP9+/-. Následně jsem program trénovala označováním buněk pozitivních a negativních pro daný znak tak, aby byl schopen určit fenotypy všech buněk s co nejvyšší konfidencí. Výše zmíněné kroky (aplikace spektrálních knihoven, segmentace tkáně, buněk a fenotypizace) dohromady tvoří algoritmus, kterým jsou vyšetřeny všechny fotografie z kohorty.

Pro následné analýzy jsem rovněž využila Phenoptr Reports (Akoya Biosciences, USA) a MS Excel (verze 2206). Z programu Phenoptr Reports jsem získala počty pozitivních buněk na mm2 pro každý sledovaný marker na daném vzorku (zvlášť pro nádor a stroma). V programu

Excel jsem sečetla počty pozitivních buněk pro každou ze 3 reprezentativních oblastí a vztáhla opět na mm2.

4.5 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu a tvorbu grafů jsem použila software GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA).

Nejprve jsem použila Shapiro-Wilkův test pro určení rozložení dat.

Výsledná data z programu GenEx měla normální rozložení. Pro analýzu těchto výsledků jsem proto použila parametrický nepárový t-test. Na datech z programu GenEx jsem porovnávala relativní expresi vybraných markerů hypoxie vztaženou na 2 referenční geny. Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat z IHC jsem pro porovnání počtu pozitivních buněk na mm2 využila nepárový Mann-Whitney test. Těmito testy jsem porovnala skupiny HNSCC pozitivních na HPV a negativních na HPV a také skupiny kuřáků a nekuřáků, konzumentů alkoholu s abstinenty, nádory různých lokalizací a rovněž skupiny rozdělené podle stádia nádoru.

Pro porovnání počtu pozitivních buněk v nádorové tkáni a ve stromatu jsem využila párový Wilcoxon test. Možnou korelaci mezi výsledky RT-qPCR a IHC jsem otestovala pomocí Pearsonova korelačního koeficientu.

Hladina významnosti byla $P<0,05$.

5 Výsledky

5.1 Epidemiologické charakteristiky pacientů

Epidemiologické charakteristiky pacientů byly získány z dotazníků vyplněných pacienty v rámci studie AZV 17-28055A „Stanovení fenotypu a funkce imunitních buněk jakožto prediktorů odpovědi na léčbu u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku“.

Pro analýzy jsem celkem vybrala 40 vzorků nádorů hlavy a krku na základě jejich HPV statusu, 20 bylo pozitivních (HPV+) a 20 negativních (HPV-) na přítomnost virové mRNA HPV E6. Mezi pacienty bylo celkem 27 mužů a 13 žen. Věkové rozmezí bylo 39–86 let, průměrný věk byl 61 let. 29 nádorů bylo z oblasti orofaryngu, pod kterou spadá orofaryng, kořen jazyka, tonsily a měkké patro. Zbylých 11 nádorů bylo lokalizováno v dutině ústní, kterou rozumíme tělo jazyka, spodinu dutiny ústní nebo retromolární oblast. 30 pacientů byli současní kuřáci nebo pacienti, kteří v době vyplnění dotazníku již kouřit přestali. Stejný počet pacientů se označilo za konzumenty alkoholu. 20 nádorů bylo dle systému pro klasifikaci nádorů pTNM (z angl. pathologic tumor – node – metastasis) stádia I, 8 stádia II, 4 stádia III a 8 stádia IV. Přehled epidemiologických charakteristik pacientů se nachází v Tabulce č. 11.

Tabulka č. 11 – Epidemiologické charakteristiky pacientů.

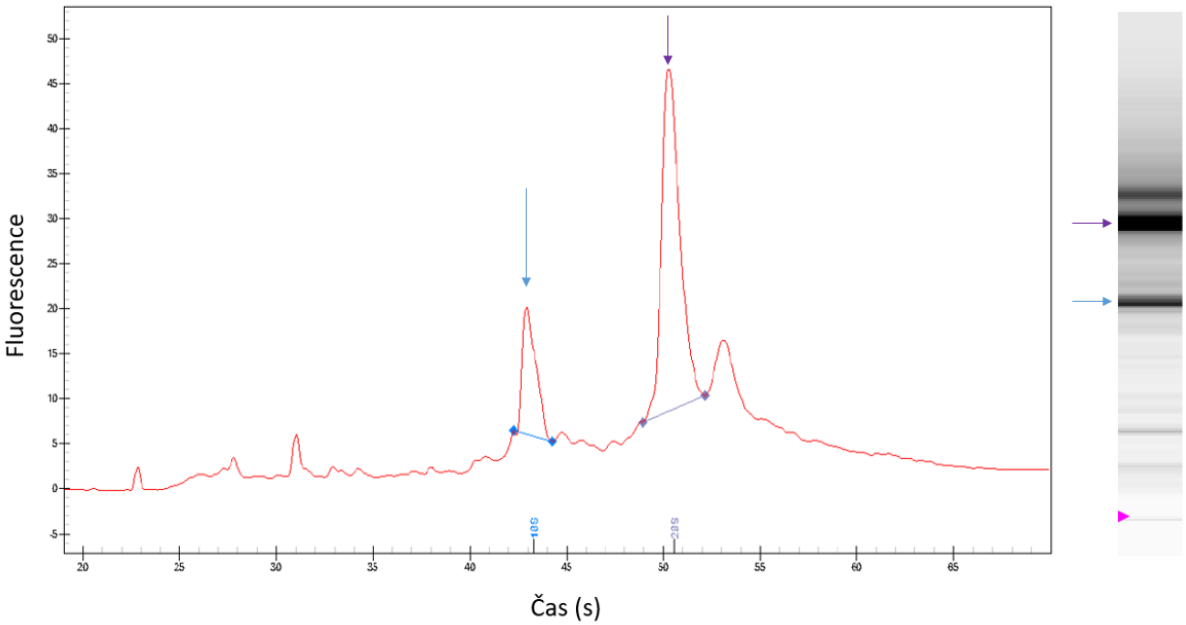
	Celkem (n=40)	HPV+ (n=20)	HPV- (n=20)
Pohlaví			
Muži	27 (68 %)	13 (65 %)	14 (70 %)
Ženy	13 (32 %)	7 (35 %)	6 (30 %)
Věk (roky)			
Průměr	61	60	62
Medián	63	61	64
Rozmezí	39-86	39-77	48-86
Lokalizace nádoru			
Orofaryng	29 (73 %)	20 (100 %)	9 (45 %)
Dutina ústní	11 (27 %)	0 (0 %)	11 (55 %)
Kouření			
Ano	30 (75 %)	13 (65 %)	17 (85 %)
Ne	10 (25 %)	7 (35 %)	3 (15 %)
Konzumenti alkoholu			
Ano	30 (75 %)	12 (60 %)	18 (90 %)
Ne	10 (25 %)	8 (40 %)	2 (10 %)
Stádium nádoru (S)			
I	20 (50 %)	17 (85 %)	3 (15 %)
II	8 (20 %)	2 (10 %)	6 (30 %)
III	4 (10 %)	1 (5 %)	3 (15 %)
IV	8 (20 %)	0 (0 %)	8 (40 %)

5.2 Izolace DNA a RNA

Pomocí kitu NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set jsem vyizolovala nukleové kyseliny celkem ze 30 zpracovaných vzorků nádorů hlavy a krku. Další vzorky byly již zpracovány dříve, vyizolovanou RNA a DNA jsem měla k dispozici. Navazovala jsem na diplomovou práci Mgr. Natálie Dalewské vypracovanou v naší laboratoři (Dalewská, 2020), která zpracovala 55 vzorků, z nichž jsem také některé vybrala pro své analýzy. Pro všechny vzorky (n=115) bylo provedeno určení kvality, koncentrace i HPV statusu. 40 vzorků pro další analýzy jsem vybrala dle HPV statusu určeného detekcí mRNA HPV E6 a dle kvality RNA. Pro HPV+ a HPV- skupinu jsem vybrala vždy 20 vzorků nejlepší možné kvality RNA. Ve výsledcích uvádím pouze těchto 40 vzorků.

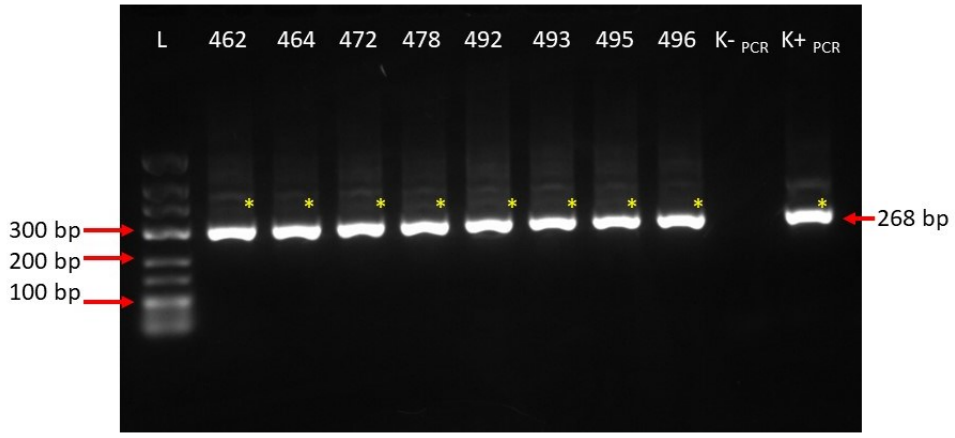
Dále jsem vyizolovala nukleové kyseliny z buněčných linií SiHa, HeLa, CaSki, CRL3240, HTB31, HaCaT, CCL138, HTB43 (kap. 4.1.1).

Pro všechny vyizolované NK jsem určila koncentraci a čistotu získané DNA a RNA a kvalitu RNA jsem zkontrolovala na přístroji Experion. Přehled vzorků NK použitých pro analýzy a jejich charakteristiky se nachází v souhrnné Tabulce č. 12 na konci kapitoly 5.3. Na Obrázku č. 8 je příklad elektroforetogramu z přístroje Experion, na kterém jsou patrné vrcholy reprezentující 18S a 28S rRNA. Z elektroforetogramu jsem rovněž odečetla velikosti fragmentů RNA. Vzhledem k malé velikosti qPCR amplikonů (69-146 bp) jsem pro analýzu mohla využít i vzorky s nižší hodnotou RQI.

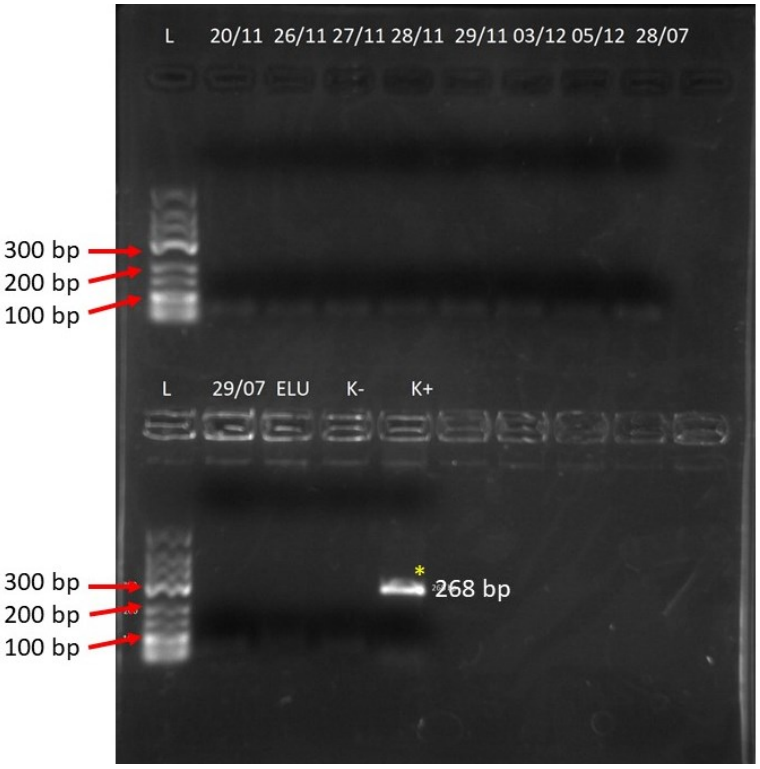


Obrázek č. 8 – Elektroforetogram z přístroje Experion pro vzorek 511. Modře 18S rRNA, fialově 28S rRNA.

PCR reakcí amplifikující část genu pro lidský β-globin (268 bp) jsem u všech vzorků ověřila nepřítomnost inhibitorů PCR. Dále jsem do stejné reakce místo vyizolované DNA přidala negativní kontroly izolace, kde byla místo buněčné suspenze použita voda prostá RNAs. Tím jsem ověřila, že během izolací nedošlo ke kontaminaci. Gel dokumentující výsledky PCR lidského β-globinu se nachází na Obrázcích č. 9 a 10.



Obrázek č. 9 – Gel po β-globin PCR pro vzorky: 462, 464, 472, 478, 492, 493, 495, 496, L = GeneRuler Low Range DNA Ladder, K+PCR=pozitivní kontrola PCR (DNA SiHa), K+PCR=pozitivní kontrola PCR (voda prostá RNAs) * označeny pozitivní výsledky, velikost produktu 268 bp.



Obrázek č. 10 – Gel po β-globin PCR pro kontroly izolace DNA, kontroly označeny datem izolace. L = GeneRuler Low Range DNA Ladder, K+ =pozitivní kontrola PCR (DNA SiHa), K- =negativní kontrola PCR (voda prostá RNAs) * označeny pozitivní výsledky, velikost produktu 268 bp.

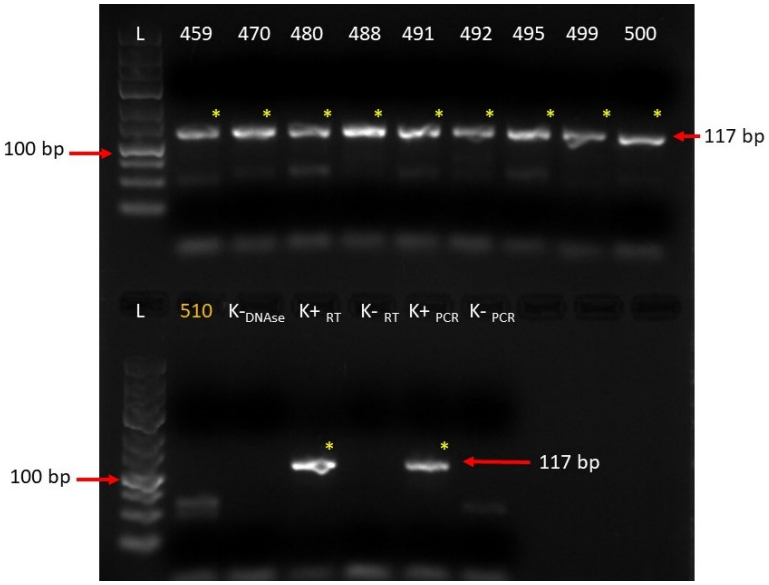
5.3 Určení HPV statusu vzorků

5.3.1 Detekce HPV DNA a určení typu HPV

Detekce HPV DNA pomocí PCR reakce amplifikující úsek genu HPV L1 a určení typu HPV metodou RLB bylo provedeno v NRL PV v ÚHKT. Výsledky se nachází v Tabulce č. 12. U 26/40 (65 %) vzorků byla detekována HPV DNA. Z toho byl u 24 (92 %) detekován HPV16, u jednoho vzorku HPV16 a zároveň HPV53 a u dalšího HPV33. Ostatní vzorky, 14/40 (35 %), byly negativní na HPV.

5.3.2 Reverzní transkripce

Dále jsem provedla reverzní transkripci na RNA všech analyzovaných vzorků (n=40) i na RNA vyizolované z buněčných linií. Získanou cDNA z buněčných linií jsem využila pro testování primerů na qPCR a konstrukci standartních křivek, cDNA ze vzorků jsem použila pro stanovení aktivní virové infekce a qPCR. Pro kontrolu reverzní transkripce jsem použila PCR amplifikující úsek cDNA pro HPRT. Příklad gelu s produkty této reakce je na obrázku č. 11 Očekávaná délka produktu byla 117 pb. Jako negativní kontrolu jsem použila vodu prostou RNAs, jako pozitivní kontrolu cDNA SiHa.



Obrázek č. 11 - Gel po HPRT PCR pro cDNA vzorků 459, 470, 480, 488, 491, 492, 495, 500, 510. L = GeneRuler Low Range DNA Ladder, K-DNAse =negativní kontrola po DNAsování (voda prostá RNAs), K+RT=pozitivní kontrola reverzní transkripce (cDNA SiHa), K-RT=negativní kontrola reverzní transkripce (voda prostá RNAs) K+PCR=pozitivní kontrola PCR (cDNA SiHa), K-PCR=negativní kontrola PCR (voda prostá RNAs) * označeny pozitivní výsledky, žlutě označen negativní výsledek, velikost produktu 117 bp.

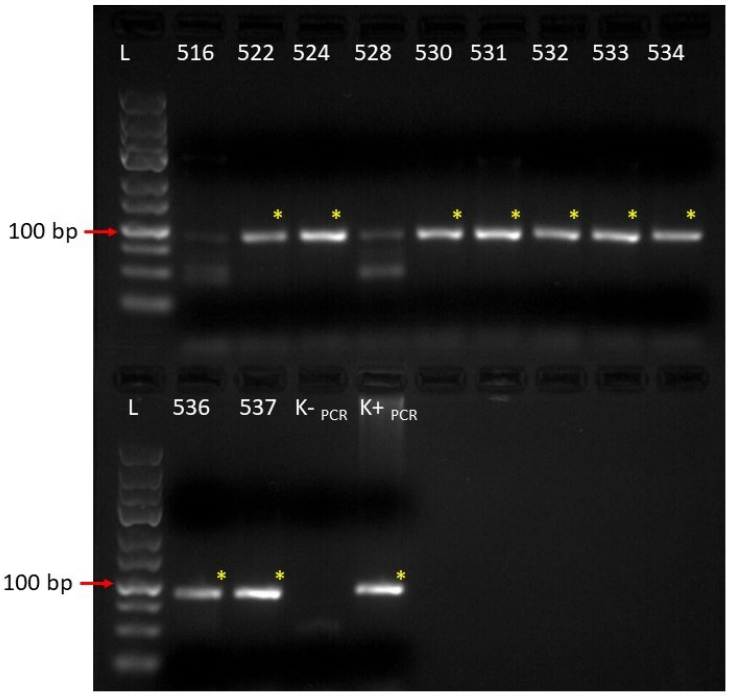
5.3.3 HPV E6 PCR

U 20/26 (77 %) vzorků u který byla detekována HPV DNA jsem potvrdila aktivní virovou infekci detekci mRNA E6. U 6/26 (23 %) vzorků jsem aktivní infekci nepotvrdila. Pro všechny vzorky byl jejich HPV status potvrzen imunohistochemickou detekcí p16, která byla provedena ve FN Motol. Vzorky pozitivní na HPV E6 a p16 byly označeny jako HPV+, zbytek HPV-. Výsledky určení HPV statusu vzorků jsou v Tabulce č. 12, gel po E6 PCR je na Obrázku č. 12. Očekávaná délka produktu byla 86 pb. Jako negativní kontrolu jsem použila vodu prostou RNAs, jako pozitivní kontrolu cDNA SiHa.

Tabulka č. 12 – Výsledky určení kvality a koncentrace nukleových kyselin a HPV statusu vzorků. Hodnoty RQI nad 7 zvýrazněny světle zeleně, RIN mezi 6,9 a 4,1 žlutě a RIN pod 4 červeně. C = koncentrace * = RQI neurčeno z důvodu nízké koncentrace. 260/280 = poměr absorbance NK v příslušných vlnových délkách měřený na přístroji Nanodrop p16 = protein 16. * = slabý signál, ** = velmi slabý signál, tmavě zeleně vzorky negativní na HPV E6 mRNA a p16, oranžově vzorky pozitivní na HPV E6mRNA a p16 (+ = pozitivní, - = negativní).

ID vzorku	DNA		RNA			Určení HPV statusu			
	C (ng/ul)	260/280	C (ng/ul)	260/280	RQI	Typ HPV	HPV E6	P16	HPV status
441	128,3	1,86	150,5	2,12	7,9	16	+	+	+
443	69,7	1,9	120,9	2,09	7,6	16	+	+	+
444	79,8	1,89	82,3	2,11	8,2	16	+	+	+
448	92,2	1,87	491	2,1	8,4	16	+	+	+
449	41	1,86	430,2	2,08	6,9	16	+	+	+
462	36,3	1,88	46,1	2,01	7,4	16	+	+	+
472	78	1,85	121,4	2,07	7,8	16	+*	+	+
478	53,5	1,89	54,1	1,99	9,6	16	+*	+	+
485	25,5	1,89	422,8	2,07	7,7	16	+*	+	+
497	89,8	1,92	99	2,09	8,4	16	+*	+	+
500	20,8	1,99	63,4	2,1	7,6	16	+	+	+
511	157,8	1,9	311,7	2,12	9,3	16	+	+	+
514	130,7	1,85	325,2	2,11	9,6	16	+	+	+
518	164,4	1,93	345,8	2,12	8,8	33	+	+	+
521	205,1	1,88	626,8	2,14	8,2	16	+	+	+
523	36,9	2	34,5	2,01	8,5	16	+	+	+
524	121,3	1,92	299,4	2,09	7,4	16	+	+	+
530	46,1	1,94	53,8	2,09	9,3	16	+	+	+
531	67,1	1,95	679,6	2,14	6,8	16	+	+	+

ID vzorku	DNA		RNA			Určení HPV statusu			
	C (ng/ul)	260/280	C (ng/ul)	260/280	RQI	Typ HPV	HPV E6	P16	HPV status
533	45,7	1,88	125,5	2,04	9,6	16	+	+	+
420	23,8	1,95	21,6	2,16	3	16	0	-	-
435	2,5	2,25	11,4	2,4	*	16, 53	0	-	-
453	13,4	2,05	10,3	2,02	4,6	16	0	-	-
455	44	1,9	13,2	2,08	3	16*	0	-	-
457	67	1,88	46,4	2,15	2,9	0	0	-	-
458	7	2,16	8,5	2,42	3,5	0	0	-	-
463	8,1	2,44	14,2	2,12	2,8	0	0	-	-
465	54,6	1,91	52	2,12	2,5	0	0	-	-
468	4,1	2,32	13,4	2,27	4,4	16*	0	-	-
471	64,4	1,9	36,8	2,08	3,2	0	0	-	-
473	5,7	1,89	3,2	2,18	*	0	0	-	-
474	61,6	1,9	92,3	2,1	7	0	0	-	-
489	4,3	2,57	5,9	2,25	*	0	0	-	-
493	26,8	1,93	15,7	1,77	3,4	0	0	-	-
501	39	1,96	39,3	2,08	9,6	16**	0	-	-
502	24,5	2	46,9	2,09	3,2	16**	0	-	-
503	60,6	1,88	72,5	1,98	3,4	0	0	-	-
519	10,1	2,28	15,6	2,01	8,4	0	0	-	-
526	158,8	1,9	440,6	2,1	9	0	0	-	-
527	9,4	2,16	12,2	1,92	9,3	0	0	-	-

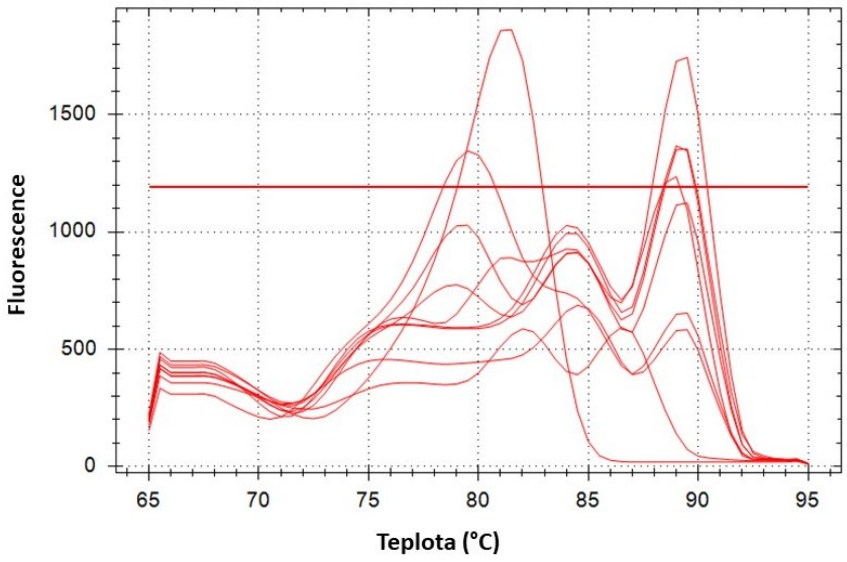


Obrázek č. 12 - Gel po E6 Smeets PCR pro vzorky: 516, 522, 524, 528, 530, 531, 533, 534, 536, 537. L = GeneRuler Low Range DNA Ladder, * označeny pozitivní výsledky, velikost produktu 86 bp.

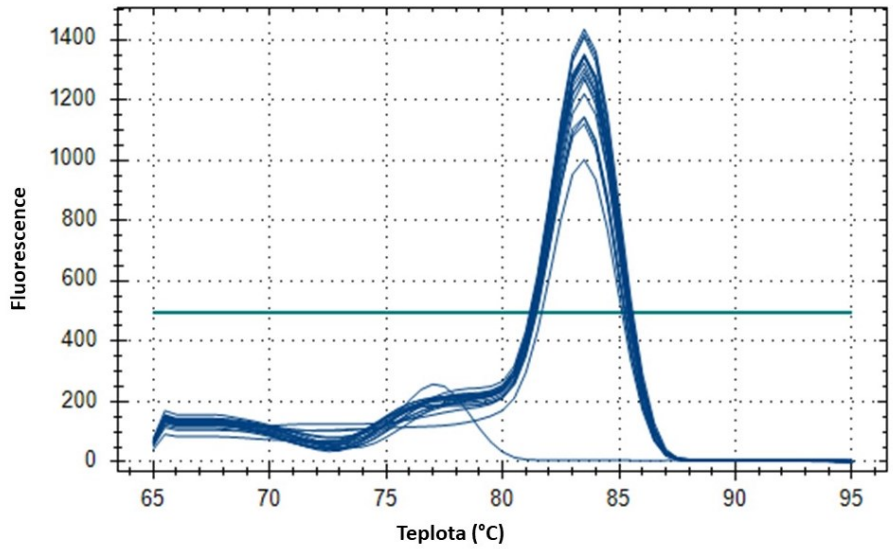
5.4 qPCR

5.4.1 Testování primerů a tvorba standartních křivek

Prvním krokem při qPCR bylo otestování párů primerů navržených pro vybrané markery na cDNA z buněčných linií. Celkem jsem otestovala 11 párů primerů specifických pro úseky mRNA těchto markerů – HIF1α, HIF2α, Notch1 (2 různé primery), P4HA1, VEGFa, CA9 (2 různé primery), PDK1 (2 různé primery) a GLUT1. Provedla jsem qPCR pro každý z párů primerů na cDNA vyizolované z 8 dostupných linií (kap. 4.1.1). Specifitu vznikajícího produktu jsem ověřila na křivce tání. Pro Notch1, CA9 a PDK1 vznikaly při použití prvního navrženého páru primerů nespecifické produkty, byly proto navrženy nové páry primerů, s jejichž použitím byla specifita vznikajících produktů qPCR vyšší. Pro další analýzy jsem proto využívala specifičtěji nasedající, nově navržené páry primerů. Křivka tání produktů qPCR reakce amplifikující mRNA Notch, kde můžeme pozorovat rozdílné teploty tání a tedy vznik nespecifických produktů je na Obrázku č. 13. Na Obrázku č. 14 je možné vidět, že při amplifikaci s párem primerů pro ASPH vznikají pouze specifické produkty.



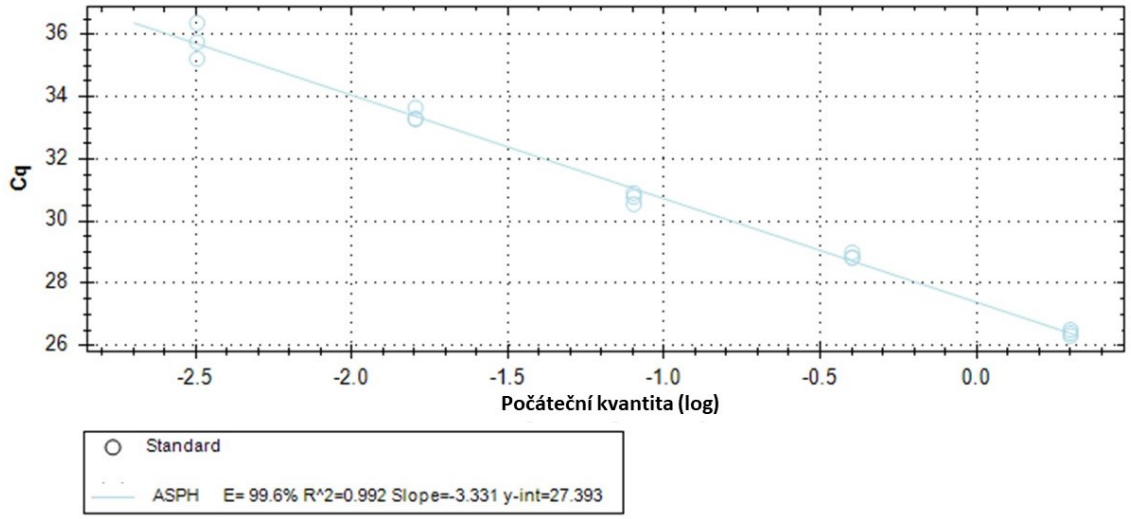
Obrázek č. 13 – Křivka tání produktů qPCR reakce amplifikující mRNA Notch na a cDNA vyizolované z buněčné linie HaCaT.



Obrázek č. 14 – Křivka tání produktů qPCR reakce amplifikující mRNA ASPH na cDNA vyizolované z buněčné linie CRL3240.

Pro konstrukci standartních křivek byly už vybrány pouze páry primerů s vysokou specifitou vznikajících produktů – ASPH, HIF1α, HIF2α, CA9, GLUT1, VEGFa, P4HA1, a PDK1. Dle míry exprese jednotlivých genů jsem zvolila vždy nejvhodnější cDNA vyizolovanou z buněčných linií pro konstrukci standartní křivky. Vzorky jsem vždy pipetovala v triplikátech v ředění 1×, 5×, 25×, 125× a 625×. Ze standartních křivek jsem zjistila účinnost amplifikace qPCR reakce, kterou jsem využila při finální analýze amplifikačních křivek. Účinnost reakce by se měla

pohybovat ideálně v rozmezí 90-110 % (The Ultimate qPCR Assay Design Guide, BioRad USA, dostupné z https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf [cit. 30.7.2022]). Na Obrázku č. 15 je standartní křivka pro ASPH s hodnotami účinnosti reakce a sklonu křivky. Hodnoty účinnosti reakce, teploty tání primerů a sklon křivky pro všechny testované páry primerů se nachází v Tabulce č. 13.



Obrázek č. 15 – Standartní křivka pro ASPH na cDNA vyizolované z buněčné linie CRL3240. Cq = Ct = cycle treshold, E(efficiency) = účinnost reakce, R^2 = korelační koeficient.

Tabulka č. 13 – Hodnoty získané ze standartních křivek. R^2 = korelační koeficient.

Gen	Účinnost (%)	R^2	Sklon křivky	Teplota tání produktů (°C)	Použitá cDNA
ASPH	99,6	0,992	-3,331	83,5	CRL3240
HIF1α	106,7	0,989	-3,170	79	HeLa
HIF2α	100,2	0,993	-3,317	86	HeLa
GLUT1	104,6	0,992	-3,216	85,5	HeLa
VEGFa	93,6	0,993	-3,486	83,5	HTB43
P4HA1	94,1	0,968	-3,472	80	CaSki
CA9	106,5	0,980	-3,174	84,5	CaSki
PDK1	87,8	0,970	-3,655	81,5	CCL138
ACTb	108,7	0,999	-3,130	85	SiHa
GUSb	91,8	0,993	-3,534	81	SiHa

Pro ACTb (beta aktin) a GUSb (beta glukoronidáza) jsem využila hodnoty účinnosti reakce a teploty tání produktů získané Mgr. Natálií Dalewskou, která ve své diplomové práci využila stejné metodické postupy (Dalewská, 2020).

Na základě testování primerů i biologického významu markerů jsme pro následné analýzy z testovaných 11 párů primerů vybrali ASPH, HIF1α, HIF2α, GLUT1, VEGFa a P4HA1. Při výběru markerů hypoxie byl zohledněn i jejich možný vztah k aspartát β-hydroxyláze (kapitola 3.1.1.1). Tento počet znaků byl rovněž zvolen z důvodu jejich možného rozložení na 96-jamkové destičce. Z hlediska spolehlivosti výsledků bylo výhodné detekovat expresi všech markerů vždy na jedné destičce.

5.4.2 Analýza exprese mRNA vybraných hypoxických markerů

Referenční geny pro zjištění relativní exprese vybraných markerů našeho zájmu jsem zvolila v souladu s diplomovou prací Mgr. Natálie Dalewské (Dalewská, 2020). Pro kontrolu jsem rovněž provedla analýzu referenčních genů metodou deNorm v programu GenEx. Na základě nejstabilnější exprese mezi všemi buněčnými liniemi (ve srovnání s expresí HPRT) byly nejvhodnějšími referenčními geny ACTb a GUSb. Dále jsem určovala relativní expresi ASPH a 5 hypoxických markerů normalizovanou na expresi těchto dvou referenčních genů.

Vzorky jsem během analýz pipetovala vždy v duplikátech. Na každou destičku jsem zařadila negativní kontrolu reakce pro každý z použitých párů primerů, kam jsem místo cDNA přidala vodu prostou RNAs, a také mezidestičkovou kontrolu kterou představovala amplifikace ACTb na linii SiHa. Po proběhnutí analýzy jsem nejprve zkontrolovala specificitu amplifikace na amplifikačních křivkách a křivkách tání.

5.4.2.1 Zpracování dat a statistická analýza

Nejprve jsem v programu BioradCFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, USA) zkontrolovala amplifikační křivky a specifitu vznikajícíh produktů na křivkách tání. Dále jsem provedla kontrolu duplikátů – rozdíl Ct hodnot mezi vzorky pro daný duplikát nesměl překročit 0,5. Duplikáty, pro které byl rozdíl větší než 0,5 jsem vyhodnotila z hlediska hodnoty Ct – hodnota vyšší než 35 naznačovala velmi malé množství vznikajícího produktu. Pro duplikáty, u kterých rozdíl Ct hodnot překročil 0,5 a zároveň tyto hodnoty nebyly vyšší než 35 jsem qPCR zopakovala. Vždy jsem zařadila i oba referenční geny.

Vstupní data (Ct hodnoty) z programu BioRad CFX Maestro jsem v tabulce exportovala do programu Excel (verze 2206). Prvním krokem bylo nahrazení chybějících Ct hodnot. Pokud jsem měla alespoň 1 Ct hodnotu v rámci duplikátu tak jsem ji použila pro celý duplikát. Tabulku jsem pro další zpracování exportovala do programu GenEx. V případě, že se mi nepodařilo získat Ct pro celý duplikát jsem předpokládala velmi nízké vstupní množství cDNA daného markeru a nahradila jsem hodnotu maximem Ct pro tento marker mezi všemi vzorky zvýšeným o 2. V GenExu jsem nejprve provedla normalizaci Ct na mezidestičkové kontroly, které představovala vždy detekce ACTb na linii SiHa. Podle standartních křivek jsem korigovala efektivitu amplifikace pro každý znak. Dalším krokem byla normalizace na expresi dvou vybraných referenčních genů, ACTb a GUSb. Poté jsem provedla zprůměrování Ct hodnoty duplikátů. V programu jsem dále převedla Ct tak, aby byly relativní k maximu pro daný marker mezi všemi analyzovanými vzorky (nejmenší Ct hodnota = 0). Hodnoty jsem nakonec převedla do logaritmické škály pro normální rozložení. Hodnoty relativní exprese vybraných markerů u analyzovaných vzorků se nachází v Tabulce č. 14.

Tabulka č. 14 – Hodnoty relativní exprese mRNA vybraných markerů u analyzovaných vzorků s vyznačením HPV statusu (+ = pozitivní na HPV, zvýrazněno zeleně, - = negativní na HPV, zvýrazněno oranžově).

Vzorek	ASPH	HIF1α	VEGFa	GLUT1	P4HA1	HIF2α	HPV status
462	3,095219	1,147189	0	1,550627	1,510156	8,115547	+
472	2,55897	5,11614	2,827303	0,676777	3,08853	8,977328	+
478	4,251494	4,646225	1,588695	4,304606	2,274824	8,318205	+
485	4,828799	5,138438	4,206936	1,662085	3,213127	10,02871	+
497	4,089714	5,724251	3,446504	2,083018	3,030984	9,278749	+
500	6,604291	5,149678	5,210223	3,902425	3,624635	8,975132	+
511	2,881895	4,716359	2,251816	1,131782	1,677736	7,49092	+
514	3,566884	4,998811	2,780605	2,268967	2,276589	8,45377	+
518	2,875928	4,202003	2,71849	2,432874	2,310099	8,345865	+
521	3,687385	5,027261	2,315099	2,31332	3,243291	8,723389	+
523	3,51646	5,369876	3,310298	0,808925	0	10,5214	+
524	4,522494	4,747679	3,976104	1,133134	3,783421	7,766388	+
530	5,724226	6,552843	4,638903	3,95331	3,525803	10,0787	+
531	2,513343	3,558038	2,440219	2,47557	2,146681	6,716131	+
533	2,38777	2,092708	2,088422	1,077648	1,581597	6,678566	+
441	4,257607	5,105905	4,082492	1,502506	3,024128	9,863539	+

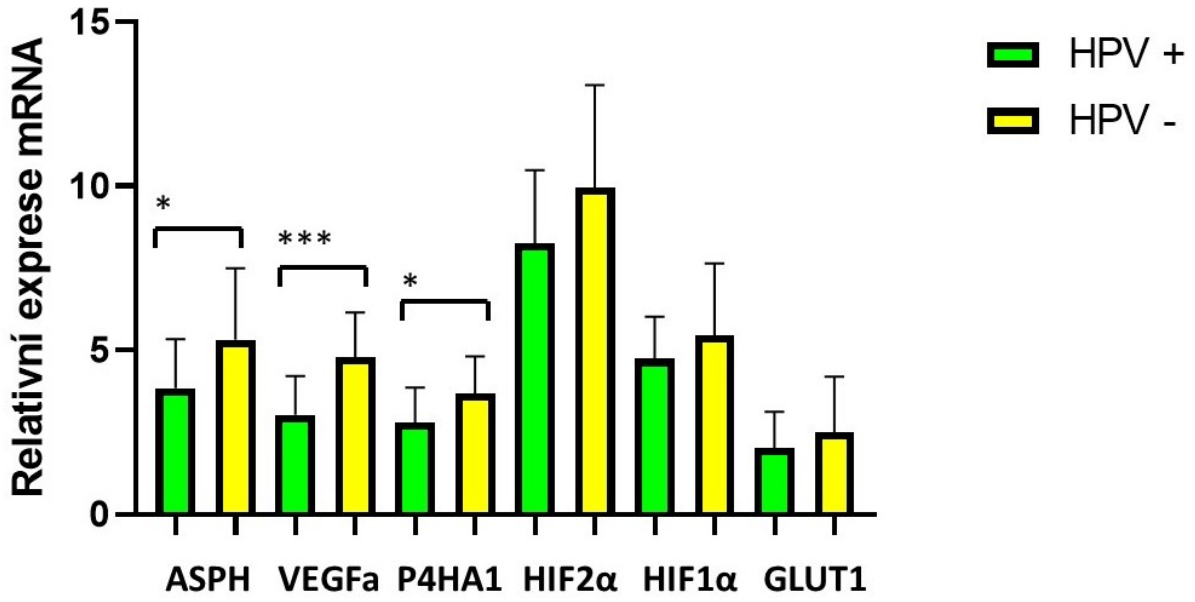
Vzorek	ASPH	HIF1α	VEGFa	GLUT1	P4HA1	HIF2α	HPV status
443	0	6,141843	2,781865	1,282131	3,929306	8,033752	+
444	5,530707	5,993085	3,922184	2,118044	4,651743	10,15375	+
448	4,280898	5,287192	2,879523	0,6856	3,029416	0	+
449	5,668169	3,806308	3,278586	3,034337	3,808584	8,509807	+
493	4,56969	3,832233	2,788078	0,912839	2,683761	9,384711	-
501	3,79623	5,247109	1,613487	0,29636	2,721056	9,69368	-
502	4,587713	6,468745	4,32315	2,149453	5,817882	9,976674	-
503	5,025256	6,22642	4,987763	1,70534	5,171028	9,501194	-
519	4,724147	6,852406	4,84789	2,034921	3,929848	10,06454	-
526	3,187307	5,269122	4,896206	1,557596	2,471964	7,821169	-
527	3,559351	6,939157	4,877711	0	2,568529	7,974343	-
420	5,771573	4,878897	3,541686	0,882005	3,847271	13,27878	-
435	6,302619	5,372581	4,940837	2,74342	2,408466	6,549316	-
453	4,97303	9,191133	3,669235	2,589278	3,735153	11,16412	-
455	11,18109	3,478176	6,264148	6,670634	4,726405	12,68214	-
457	6,369527	0	5,175003	2,817753	3,348747	13,35351	-
458	6,048828	7,856813	4,608036	4,250121	3,213622	10,47694	-
463	6,138222	3,830409	4,727288	4,54395	3,721945	12,34989	-
465	7,348496	2,88823	7,188381	3,494268	6,049678	14,47995	-
468	6,686098	6,005276	5,058247	2,333396	3,627887	11,1126	-
471	7,420546	9,578934	3,761595	2,252893	2,213756	11,08544	-
473	0	4,105528	6,127239	4,939629	3,537036	0	-
474	4,482761	5,408822	7,188349	0,522991	3,07378	8,036254	-
489	4,308486	5,738267	5,407886	3,297442	4,784052	10,23282	-

Relativní expresi mRNA vybraných markerů jsem porovnávala mezi různými skupinami pacientů, vždy jsem použila parametrický nepárový t-test.

Při porovnání relativní exprese mRNA markerů mezi HPV+ nádory (n=20) a HPV- nádory (n=20) jsem detekovala signifikantně vyšší expresi ASPH, P4HA1 a VEGF u skupiny HNSCC negativních na HPV. Rozdíl mezi expresí mRNA HIF2α u HPV+ a HPV- HNSCC se blížil hladině významnosti. Pro HIF1α a GLUT rozdíl nebyl statisticky signifikantní. U všech ostatních markerů byla vyšší exprese u nádorů negativních na HPV, jak je patrné z Tabulky č. 15 nebo z grafu na Obrázku č. 16.

Tabulka č. 15 - Průměrná relativní exprese mRNA markerů u nádorů pozitivních a negativních na HPV a příslušné p hodnoty. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti, červeně zvýrazněny p-hodnoty blížící se hladině významnosti, hladina významnosti p <0,05.

Marker	HPV+ (n=20)	HPV- (n=20)	P-hodnota
ASPH	3,842	5,324	0,0163
VEGFa	3,037	4,800	<0,0001
P4HA1	2,787	3,683	0,0139
HIF2α	8,251	9,961	0,0530
HIF1α	4,726	5,458	0,2047
GLUT1	2,020	2,500	0,2939



Obrázek č. 16 - Graf porovnávající relativní expresi mRNA markerů hypoxie mezi HPV+ a HPV- skupinou nádorů, * = p < 0,05, *** = p < 0,0001, hladina významnosti p < 0,05. Chybové úsečky – střední chyba průměru.

Relativní expresi mRNA markerů hypoxie jsem porovnala i mezi nádory rozdělenými dle lokalizace na oblast orofaryngu (n=29) a dutiny ústní (n=11). Prokázala jsem signifikantně vyšší relativní expresi mRNA pro ASPH, HIF1α, VEGFa a P4HA1 u nádorů lokalizovaných v dutině ústní. Pro HIF2α a GLUT1 nebyl rozdíl v relativní expresi signifikantní, z výsledků v Tabulce č. 16 je ale patrná vyšší exprese i těchto markerů u nádorů dutiny ústní.

Tabulka č. 16 - Průměrná relativní exprese mRNA markerů u nádorů podle jejich lokalizace a příslušné p hodnoty. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti.

Marker	Orofaryng (n=29)	Dutina ústní (n=11)	P-hodnota
ASPH	4,010	6,095	0,0020
VEGFa	3,417	5,240	0,0003
P4HA1	2,891	4,140	0,0017
HIF2α	8,599	10,44	0,0626
HIF1α	4,706	6,110	0,0265
GLUT1	2,090	2,709	0,2254

Dále jsem porovnávala relativní expresi markerů hypoxie u nádorů rozdělených do dvou skupin dle pTNM stádia. V jedné skupině byly pacienti s nádory stádia I (n=20) a ve druhé pavienti s nádory stádia II-IV (n=20). Toto rozdělení jsem zvolila z důvodu stejné velikosti skupin. Prokázala jsem signifikantně vyšší relativní expresi mRNA pro ASPH a VEGFa u skupiny pacientů s pokročilejším stádiem nádoru. Pro ostatní markery nebyl rozdíl signifikantní, výsledky v Tabulce č. 17 ale naznačují vyšší expresi všech markerů u nádorů vyššího stádia.

Tabulka č. 17 - Průměrná relativní exprese mRNA markerů u nádorů podle jejich stadia a příslušné p hodnoty. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti.

Marker	Stádium I (n=20)	Stádium II-IV (n=20)	P-hodnota
ASPH	3,731	5,435	0,0051
VEGFa	3,313	4,524	0,0103
P4HA1	2,944	3,525	0,1191
HIF2α	8,355	9,857	0,0910
HIF1α	4,931	5,253	0,5803
GLUT1	2,257	2,263	0,9887

Při porovnání nádorů kuřáků a bývalých kuřáků (n=30) s nekuřáky (n=10) jsem mezi těmito skupinami nezaznamenala signifikantní rozdíl v relativní expresi mRNA pro žádný z detekovaných markerů. V Tabulce č. 18 se nachází průměrná relativní exprese mRNA každého genu a příslušné p hodnoty.

Tabulka č. 18 - Průměrná relativní exprese mRNA markerů u nádorů kuřáků a nekuřáků a příslušné p hodnoty.

Marker	Kouření		P-hodnota
	Ano (n=30)	Ne (n=10)	
ASPH	4,735	4,129	0,4110
VEGFa	3,971	3,760	0,7111
P4HA1	3,068	3,735	0,1216
HIF2α	9,323	8,457	0,4054
HIF1α	4,898	5,675	0,2447
GLUT1	2,468	1,634	0,1108

Při porovnání relativní exprese markerů mezi nádory pacientů, kteří se označili za konzumenty alkoholu (n=30) s těmi, kteří se za konzumenty alkoholu nepovažují (n=10) jsem mezi těmito skupinami nezaznamenala signifikantní rozdíl v relativní expresi mRNA pro žádný z detekovaných markerů. Na hranici hladiny významnosti byl rozdíl pro VEGF (p = 0,0521), jehož exprese byla vyšší u konzumentů alkoholu. V Tabulce č. 19 se nachází průměrná relativní exprese mRNA každého genu a příslušné p hodnoty.

Tabulka č. 19 - Průměrná relativní exprese mRNA markerů u nádorů pacientů rozdělených dle konzumace alkoholu a příslušné p hodnoty. Červeně zvýrazněny p-hodnoty blížící se hladině významnosti.

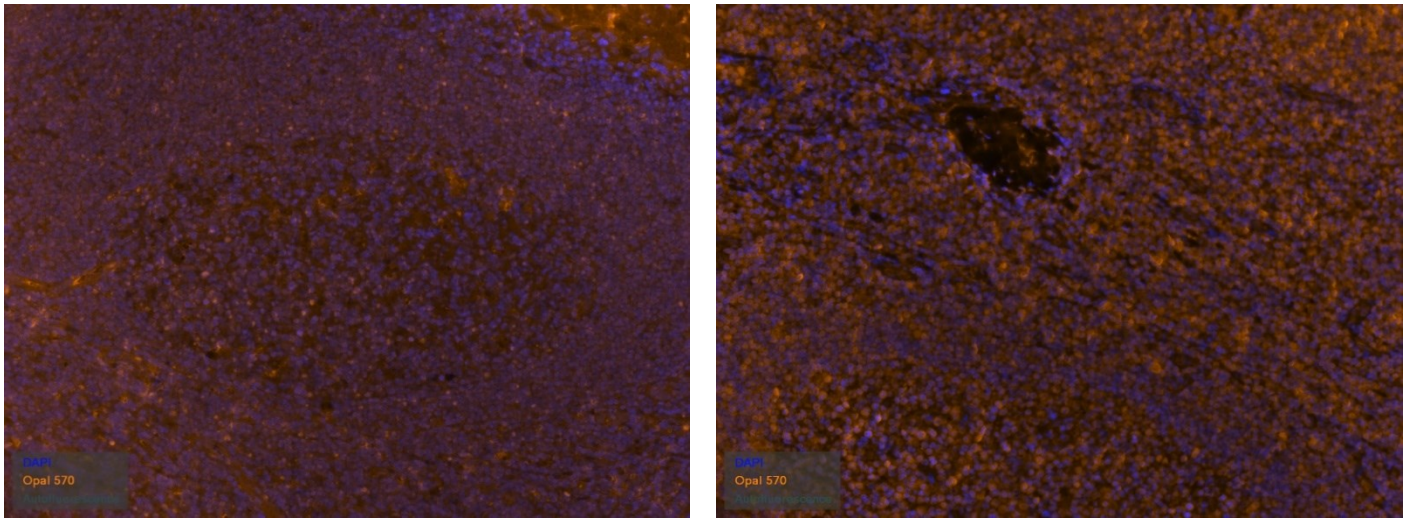
Marker	Alkohol		P-hodnota
	Ano (n=30)	Ne (n=10)	
ASPH	4,829	3,844	0,1780
VEGFa	4,188	3,109	0,0521
P4HA1	3,400	2,738	0,1243
HIF2α	8,898	9,730	0,4244
HIF1α	5,011	5,335	0,6312
GLUT1	2,363	1,951	0,4374

5.5 IHC-P

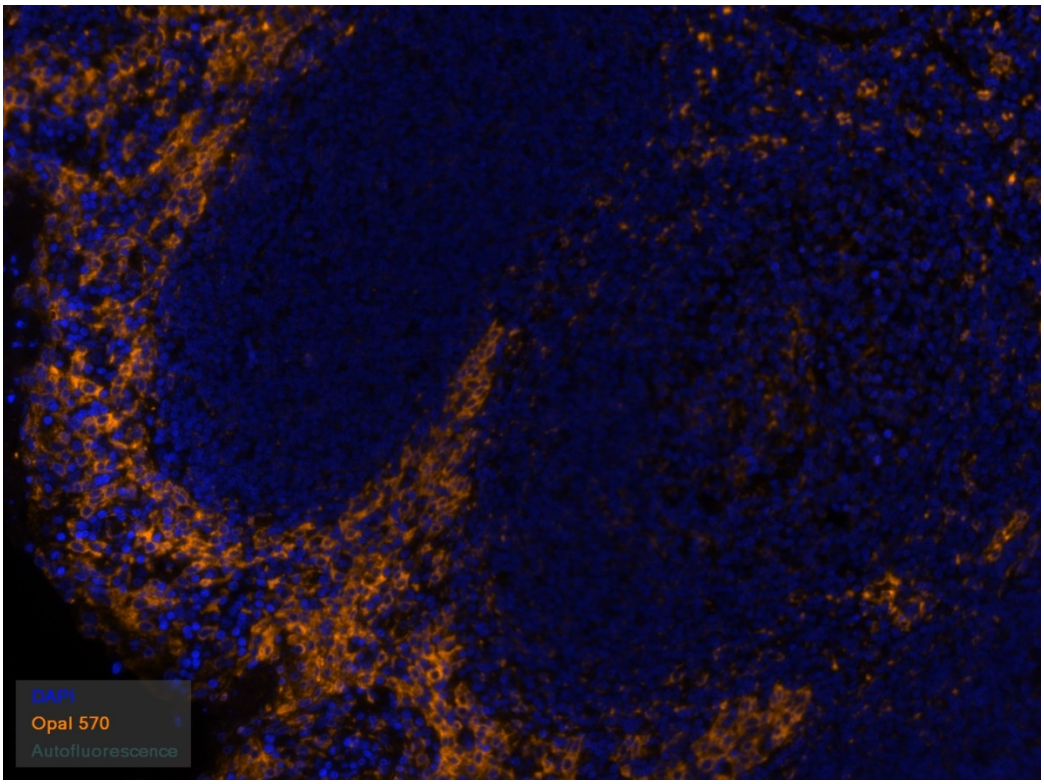
5.5.1 Testování a optimalizace protilátek

Pro otestování specificity vybraných protilátek jsem prvně využila zdravou tkáň tonsily nebo jater. Typ tkáně jsem zvolila dle míry exprese daného proteinu ve tkáních podle webu The Human Protein Atlas (dostupné z: https://www.proteinatlas.org/ [cit. 16.7.2022]). Otestovala jsem celkem 14 protilátek. Po jedné pro každý z markerů HIF1α, Notch celkový, aktivovaný Notch, CA9, GLUT1, MMP9, MMP13, SRC celkový a SRC fosforylovaný. Pro ASPH jsem otestovala celkem 5 různých protilátek. Pro protilátky VEGFa a cytokeratin jsem testování neprováděla, protože již byly rutinně používány v naší laboratoři. Protilátky značící dostatečně silně a specificky jsem dále optimalizovala na vzorcích HNSCC.

Pro nastavení prvního pokusu pro danou protilátku jsem se řídila informacemi od výrobce. U většiny protilátek bylo k dispozici doporučené ředění, případně i pufr AR6/AR9. V případě, že žádné vstupní informace nebyly k dispozici, jsem vždy volila ředění primární protilátky 1:100 a inkubaci přes noc při 4 °C. Počáteční čas vaření v pufru byl vždy nastaven na 15 minut. Pro testování a optimalizace protilátek jsem využívala Opal fluorofor 570. V případě nespecifického barvení, příliš vysokého signálu nebo pozadí jsem zkoušela různá ředění primární protilátky, Opal fluoroforu a také jsem vyzkoušela vždy oba typy pufru. Příklad nespecifického značení protilátkou Notch na tonsile je na Obrázku č. 17, příklad specifického značení protilátkou ASPH NBPII na Obrázku č. 18.



Obrázek č. 17 - Testování protilátky aktivovaný Notch, tonsila, nespecifické barvení, vlevo v pufru A9, vpravo AR6, zvětšení 10x20.



Obrázek č. 18 - Testování protilátky ASPH NBPII, tonsila, specifické značení, zvětšení 10x20.

Dalším krokem bylo otestování protilátek na nádorové tkáni jater. Toto testování jsem využila pro protilátky CA9, ASPH-F7, ASPH-CASS a ASPH-A10, jejichž specifita nebyla na zdravé tkáni optimální. Tyto proteiny mají v nádorové tkáni vyšší expresi a bylo vhodné na jednom typu tkáně porovnat jejich značení nádorové a zdravé tkáně.

Protokol pro barvení každou z vybraných primárních protilátek jsem dále optimalizovala na vzorcích HNSCC. Protilátka pro HIF1α značila specificky a silně již v počátečním ředění 1:100, otestovala jsem proto možnost inkubace primární protilátky 1 hodinu při RT. I při hodinové inkubaci byla síla signálu dostatečná. Protilátka pro celkový Notch se vázala specificky a signál byl dostatečně silný. Oproti tomu se protilátku pro aktivovaný Notch optimalizovat nepodařilo. Protilátku pro CA9 jsem na nádoru jater nedetekovala, na vzorku HNSCC barvila ale specificky a signál byl dostatečně silný. Značení protilátkou GLUT bylo specifické a silné již od prvního pokusu, úspěšně jsem otestovala i barvení při hodinové inkubaci při RT. Pro protilátku MMP9 i MMP13 se více osvědčil pufr AR9, barvení bylo také specifické a dostatečně silné. Protilátka pro celkový SRC barvila specificky při ředění 1:300. Fosforylovaný SRC se nepodařilo optimalizovat na žádném typu tkáně, změny ředění či pufru

neměly na výsledek vliv. Pro ASPH jsem z testovaných 5 protilátek pro optimalizace vybrala protilátku NBPII, protože její barvení bylo nejspecifičtější. Značila specificky v ředění 1:500.

5.5.2 Tvorba a optimalizace multiplexového panelu

Na základě biologického významu jednotlivých markerů, jejich předpokládaného vztahu k ASPH a výsledků optimalizací jsme zvolili protilátky ASPH, HIF1α, GLUT1, VEGFa a MMP13 pro zařazení do multiplexového panelu. Součástí panelu byl i cytokeratin pro odlišení nádorové tkáně a stromatu a DAPI barvící jádra. Takto bylo tedy obsazeno všech 7 možných pozic multiplexového panelu. Ke každé protilátce jsme přiřadili fluorofory dle jejich intenzity a spektra. Cílem bylo dostatečné rozlišení signálů jednotlivých protilátek tak, aby se jednotlivá spektra v maximech nepřekrývala. Počáteční nastavení multiplexového panelu se nachází v Tabulce č. 20.

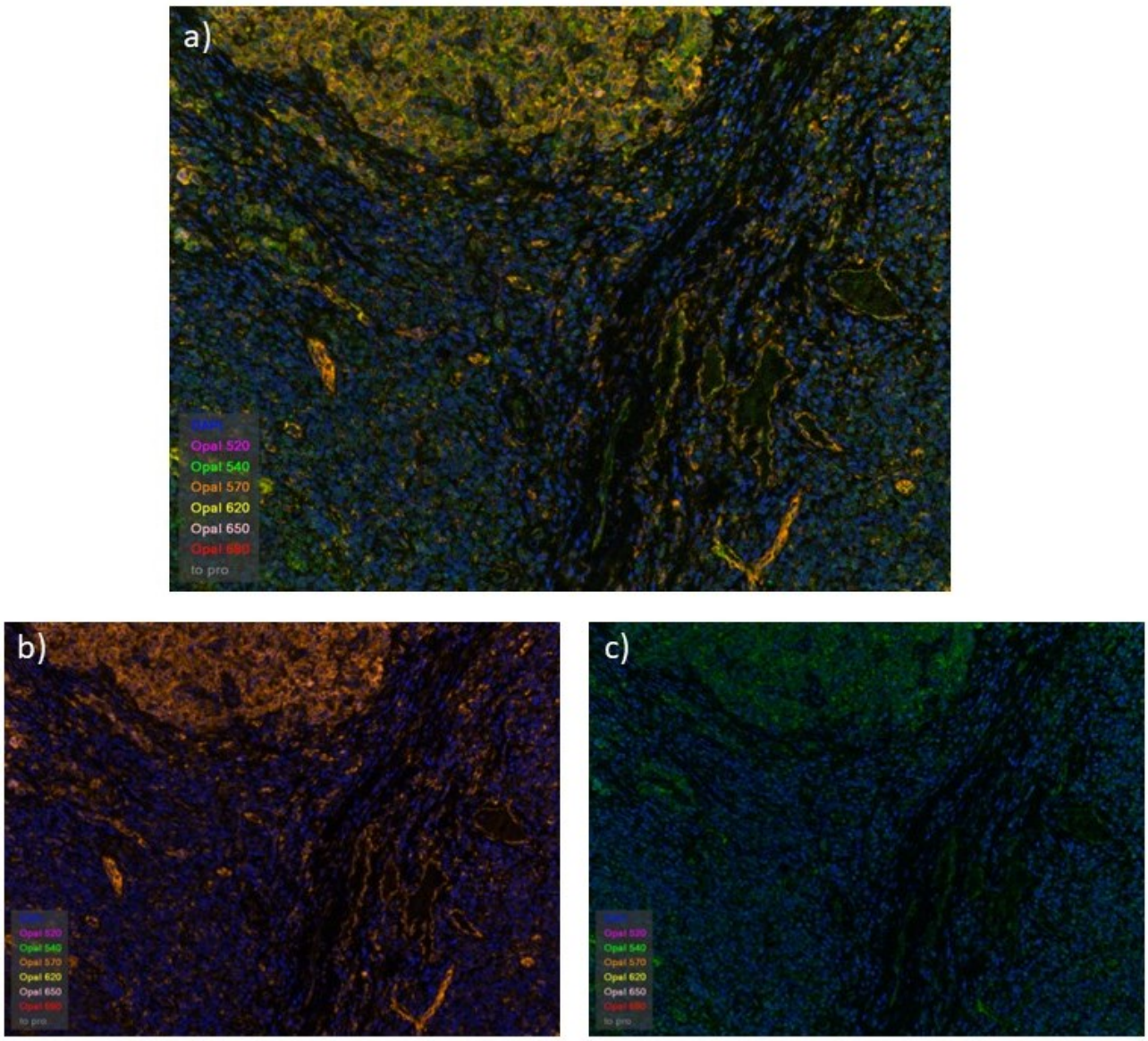
Tabulka č. 20 - Počáteční nastavení multiplexového panelu dle výsledků optimalizace jednotlivých protilátek. OVN (z angl. overnight) = přes noc, HRPpol = horseradish peroxidase polymer, RT = pokojová teplota.

Primární protilátka (ředění, inkubace)	**Pufr (čas vaření)**	**Sekundární protilátka (ředění, inkubace)**	**Opal fluorofor (ředění, inkubace)**
MMP13 (1:100, OVN, RT)	AR9 (30 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	520 (1:100, 10 min)
GLUT1 (1:500, 1 h, 4°C)	AR9 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	650 (1:150, 10 min)
VEGFa (1:100, OVN, RT)	AR9 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	540 (1:100, 10 min)
ASPH NBPII (1:500, OVN, RT)	AR6 (30 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	620 (1:100, 10 min)
HIF1α (1:300, 1 h, 4°C)	AR6 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	570 (1:100, 10 min)
Cytokeratin (1:1000, 1 h, 4°C)	AR6 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	690 (1:100, 10 min)
DAPI	-	-	-

Optimalizace multiplexového panelu jsem prováděla na vzorcích HNSCC. Vždy jsem po nabarvení vzorku všemi protilátkami zkontrolovala intenzitu a specifitu jejich signálu a případně upravila příslušné ředění. Během optimalizace se mi nepodařilo nastavit ideální podmínky pro protilátku ASPH NBPII. Vzhledem k vysoké heterogenitě signálu mezi různými vzorky HNSCC nebylo možné zvolit takové ředění protilátky, aby v nádorech se silným signálem nepřesahovala fluorescence do spektra příslušícího jiné protilátce, a zároveň abych nezískala falešně negativní výsledky pro nádory s nižším signálem. Ukázka postupných pokusů o optimalizaci protilátky ASPH v multiplexovém panelu se nachází v Tabulce č. 21, přesvit signálu fluoroforu pro ASPH do spektra jiného fluoroforu ilustruje Obrázek č. 17.

Tabulka č. 21 - Postup optimalizace protilátky ASPH v multiplexovém panelu, změny zvýrazněny oranžově. OVN (z angl. overnight) = přes noc, RT = pokojová teplota.

Pokus č.	Ředění (inkubace, teplota)	Opal fluorofor (ředění)	Pufr	Pořadí v rámci panelu	Poznámky
1	500x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	4.	
2	800x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	5.	
3	800x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	5.	Jiný vzorek
4	1000x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	5.	
5	1000x (1 h, 4°C)	620 (1:100)	AR6	-	Monoplex
6	1000x (1 h, 4°C)	620 (1:100)	AR6	-	Monoplex, jiný vzorek
7	1200x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	-	Monoplex
8	1500x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	-	Monoplex
9	1200x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	5.	
10	1000x (OVN, RT)	620 (1:100)	AR6	5.	
11	1000x (OVN, RT)	650 (1:200)	AR6	5.	
12	1000x (OVN, RT)	570 (1:100)	AR6	5.	
13	1200x (OVN, RT)	570 (1:150)	AR6	5.	



Obrázek č. 17 - Problém s optimalizací protilátky ASPH na multiplexovém panelu. Modře jádra (DAPI), zeleně Opal 540 – VEGFa, oranžově Opal 570 – ASPH NBPII. a) signály obou fluoroforů, b) signál ASPH NBPII c) signál VEGF.

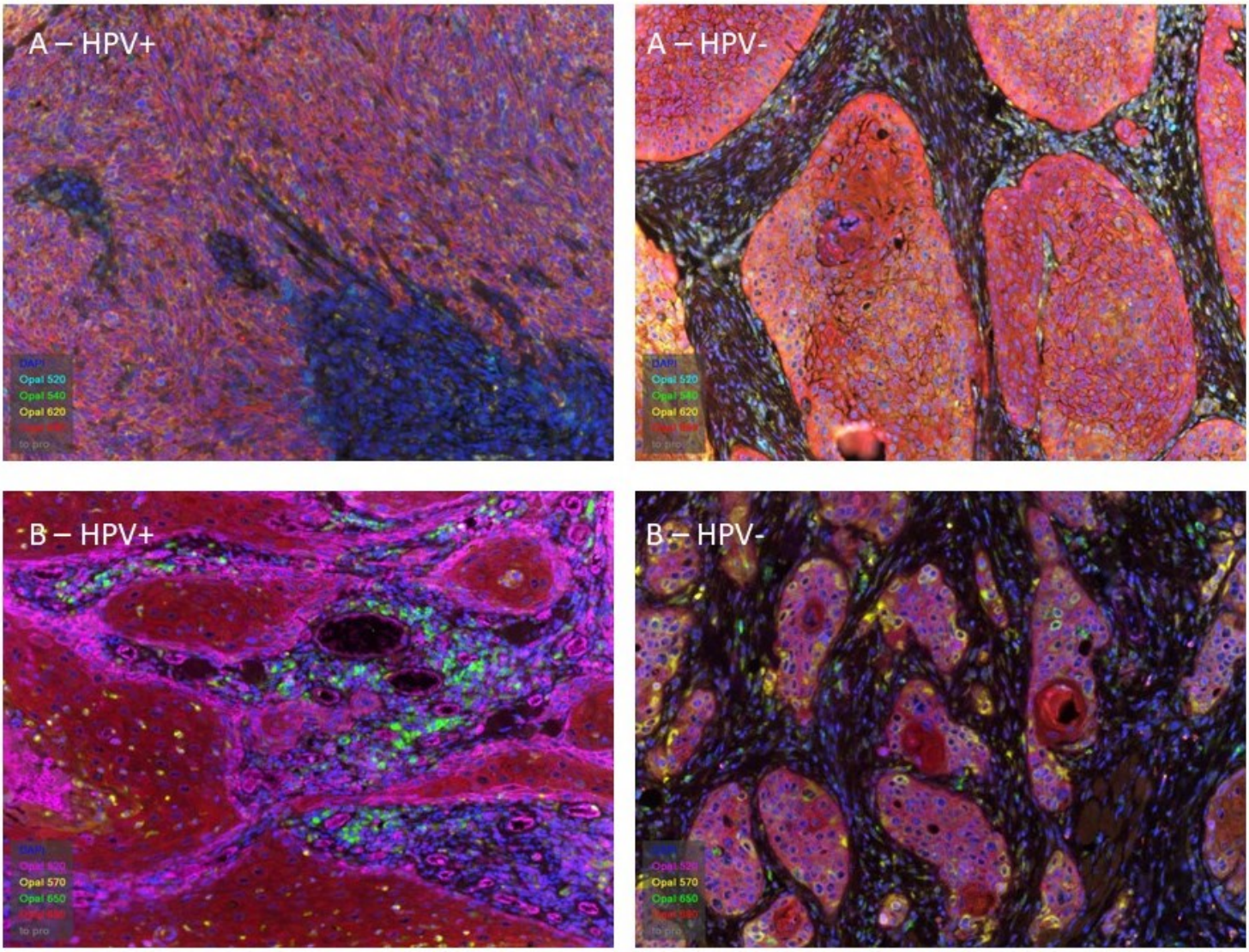
Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli pro rozdělení protilátek mezi dva panely, což nám zároveň umožnilo přidání další protilátky, MMP9. Vzhledem k možnému většímu rozdílu mezi maximy fluorescence jednotlivých Opal fluoroforů bylo možné použít protilátku ASPH NBPII, aniž by její signál zasahoval do signálu pocházejícího od jiné protilátky. Finální nastavení dvou multiplexových panelů, které jsem použila pro barvení všech vzorků analýzy se nachází v Tabulce č. 22. Protilátka MMP9 byla optimalizovaná v ředění 1:600. Během

zpracování vzorků jsem začala používat novou protilátku, která značila silněji, ředění jsem proto změnila na 1:900.

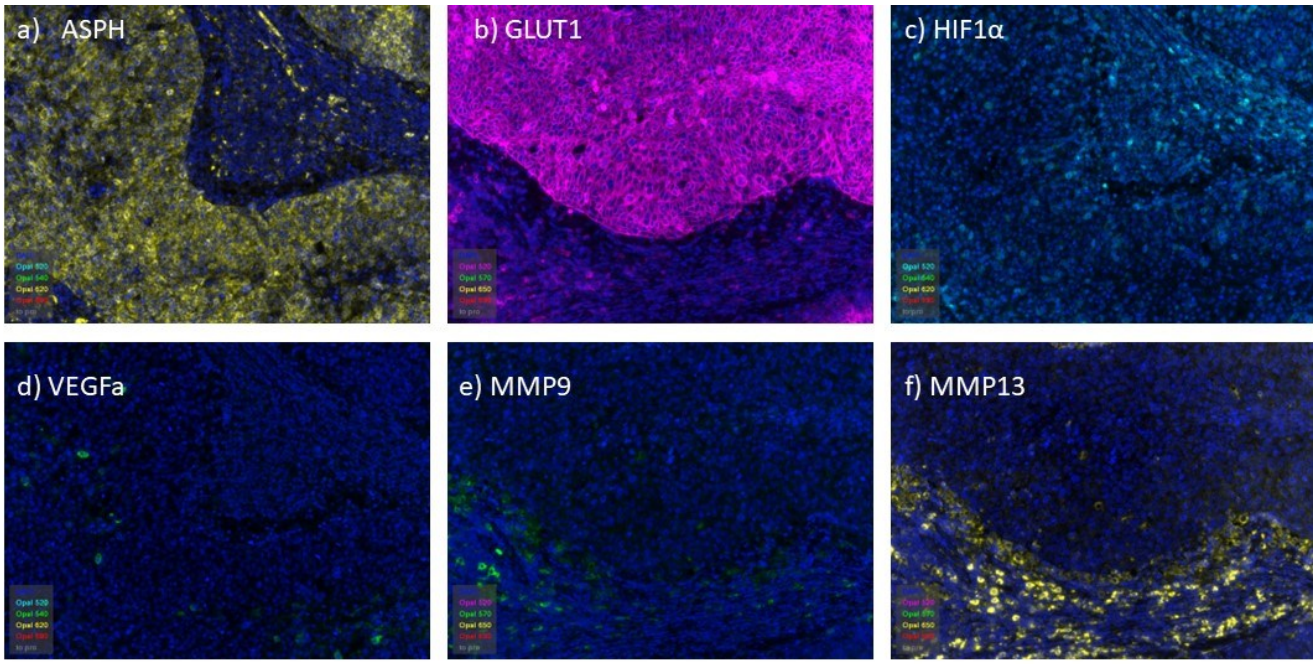
Tabulka č. 22 - Nastavení dvou multiplexových panelů pro finální analýzy. OVN (z angl. overnight) = přes noc, HRPpol = horseradish peroxidase polymer, RT (z angl. room temperature) = pokojová teplota.

Panel	**Primární protilátka (ředění, inkubace, teplota)**	**Pufr (čas vaření)**	**Sekundární protilátka (ředění, inkubace)**	**Opal fluorofor (ředění, inkubace)**
A	VEGFa (1:150, OVN, RT)	AR9 (30 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	540 (1:200, 10 min)
	HIF1α (1:200, 1 h, 4°C)	AR6 (60 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	520 (1:100, 10 min)
	ASPH (1:1200, OVN, RT)	AR6 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	620 (1:100, 10 min)
	Cytokeratin (1:1000, 1 h, 4°C)	AR6 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	690 (1:200, 10 min)
	DAPI	-	-	-
B	MMP13 (1:200, OVN, RT)	AR9 (30 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	650 (1:150, 10 min)
	GLUT1 (1:600, 1 h, 4°C)	AR9 (15 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	520 (1:150, 10 min)
	MMP9 (1:900, OVN, RT)	AR9 (25 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	570 (1:150, 10 min)
	Cytokeratin (1:1000, 1 h, 4°C)	AR6 (30 min)	HRPpol (1:100, 10 min)	690 (1:200, 10 min)
	DAPI	-	-	-

Na Obrázku č. 18 je příklad vzorku nabarveného všemi protilátkami panelu A a panelu B, vždy pro HPV- i HPV+ vzorek nádorové tkáně a na Obrázku č. 19 je ukázáno značení jednotlivými protilátkami na vzorku HNSCC.



Obrázek č. 18 - Multiplexové barvení vzorků HNSCC**,** označeno písmenem panelu a HPV statusem. Zvětšení 10x20. Červeně Opal fluorofor 690 – cytokeratin, modře DAPI – jádra, to pro = autofluorescence. Panel A: tyrkysově Opal fluorofor 520 - HIF1α, zeleně Opal fluorofor 540 – VEGFa, žlutě Opal fluorofor 620 – ASPH. Panel B: růžově Opal fluorofor 520 – GLUT1, žlutě Opal fluorofor 570 – MMP9, zeleně Opal fluorofor 650 – MMP13.

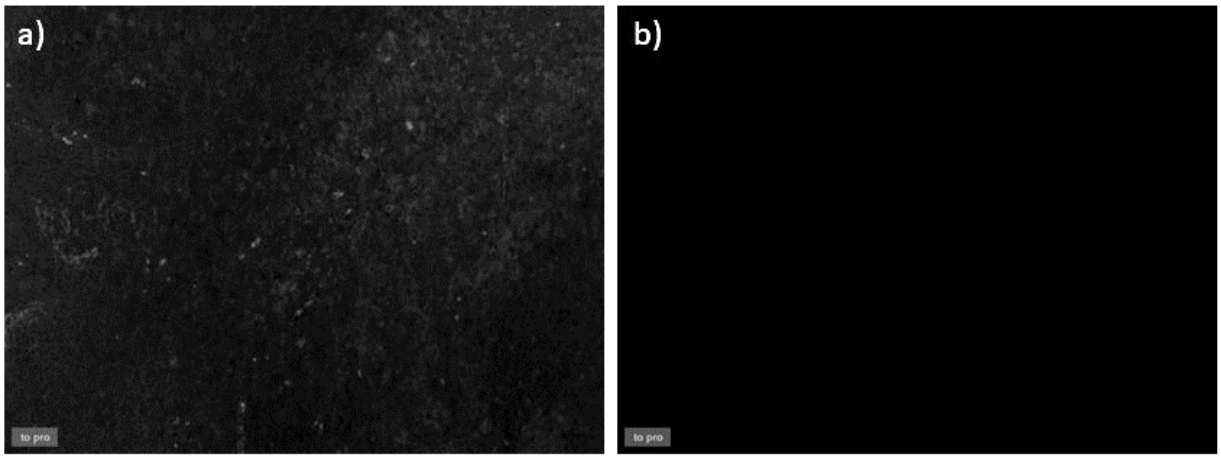


Obrázek č. 19 – Značení vzorku HNSCC ve zobrazení pro jednotlivé protilátky. Zvětšení 10x20, a) Opal fluorofor 620 – ASPH, b) Opal fluorofor 520 – GLUT1, c) Opal fluorofor 520 - HIF1α, d) Opal fluorofor 540 – VEGFa e) Opal fluorofor 570 – MMP9, f) Opal fluorofor 650 – MMP13.

5.5.3 Kontroly pro IHC-P

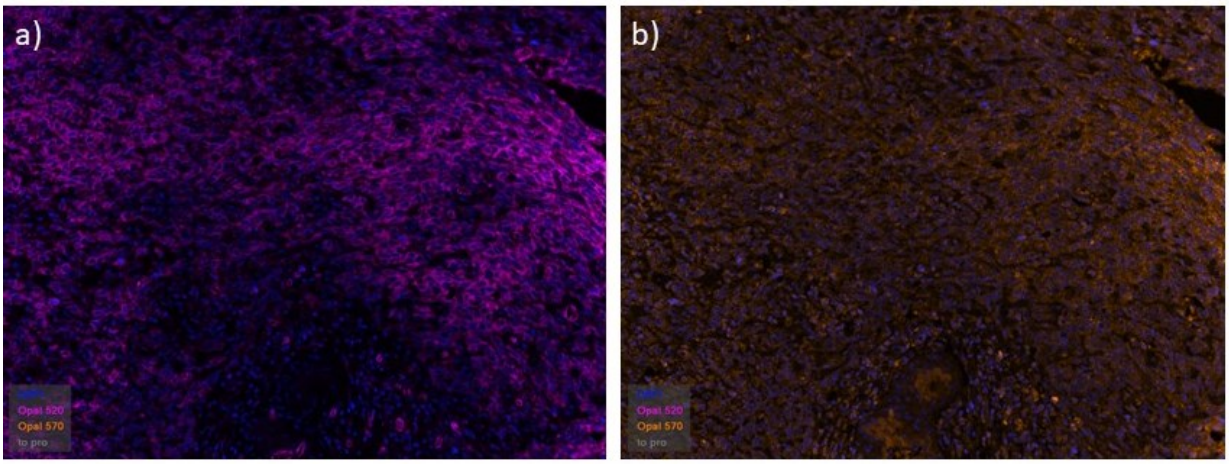
Pro ověření, že nedochází ke kolizi signálů od jednotlivých protilátek jsem využila software Phenoptr reports. Zkontrolovala jsem, že překryvy spekter jednotlivých fluoroforů jsou menší než 10 %. Hranice 10 % byla překročena pouze v případě cytokeratinu (Opal fluorofor 690) a MMP13 (Opal fluorofor 650). Vzhledem k zcela odlišnému vzoru barvení těchto dvou protilátek a možnosti jednoznačného odlišení signálů nebylo zapotřebí žádných úprav nastavení panelu. Rovněž je zapotřebí zohlednit, že tato kontrola měla pouze orientační účel a byla provedena pouze na dvou vzorcích. Primární kontrolou bylo stále vizuální rozlišení jednotlivých signálů během kontroly v programu InForm.

Dále jsem provedla kontrolu, při které jsem nahradila primární protilátku diluentem, tzv. no primary kontrola. Takto jsem ověřila specifitu vazby sekundární protilátky (Obrázek č. 20). Na obrázku je viditelná pouze autofluorescence tkáně, vynecháním primární protilátky nedošlo k vazbě sekundární protilátky a Opal fluoroforu.



Obrázek č. 20 - No primary kontrola pro ověření specifity sekundární protilátky, a) zobrazení autofluorescence tkáně (to pro), b) autofluorescence skrytá.

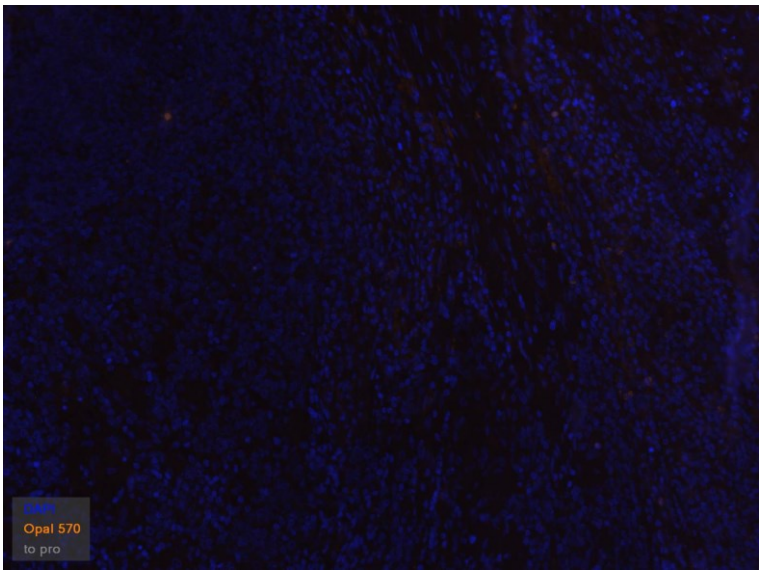
Dále jsem otestovala, zda po vaření v AR pufru dochází k úplnému odmytí komplexu primární a sekundární protilátky (tzv. stripovací kontrola). Dle nastavení multiplexových panelů jsem provedla barvení primární protilátkou, sekundární protilátkou, příslušným Opal fluoroforem, a po odmytí protilátky vařením v AR pufru jsem sklo inkubovala se sekundární protilátkou a Opal fluoroforem pro následující protilátku v panelu. Nepřítomností signálu tohoto kontrolního fluoroforu jsem ověřila, že vždy dochází ke kompletnímu odmytí primární protilátky před značením následující protilátkou (Obrázek č. 21)



Obrázek č. 21 - Stripovací kontrola pro GLUT1 protilátku, modře jádra (DAPI) a) růžově Opal fluorofor 520 pro GLUT1, b) oranžově Opal fluorofor 570, pouze nespecifické značení s velmi nízkou hladinou signálu.

Pro potvrzení specifity vazby primárních protilátek jsem provedla izotypovou kontrolu značením izotypem odpovídající dané protilátce. Značení primární protilátkou pro izotypy

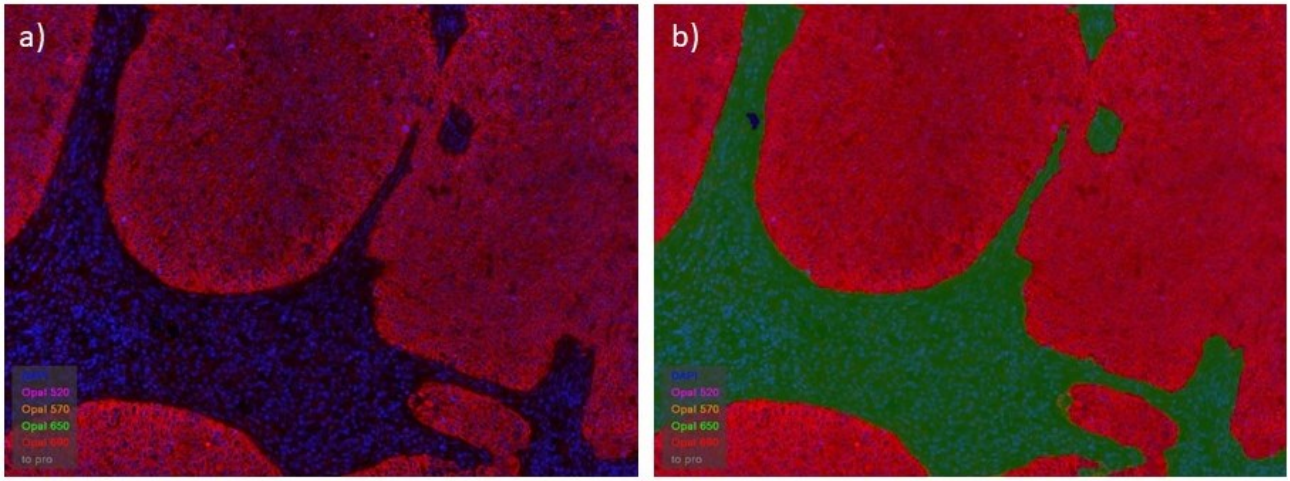
bylo buďto nespecifické nebo protilátka tkáň vůbec neznačila, čímž jsem potvrdila specifitu primárních protilátek (Obrázek č. 22).



Obrázek č. 22 - Izotypová kontrola pro MMP9 – myší izotyp IgG2, modře jádra (DAPI), oranžově Opal fluorofor 570 – myší IgG2.

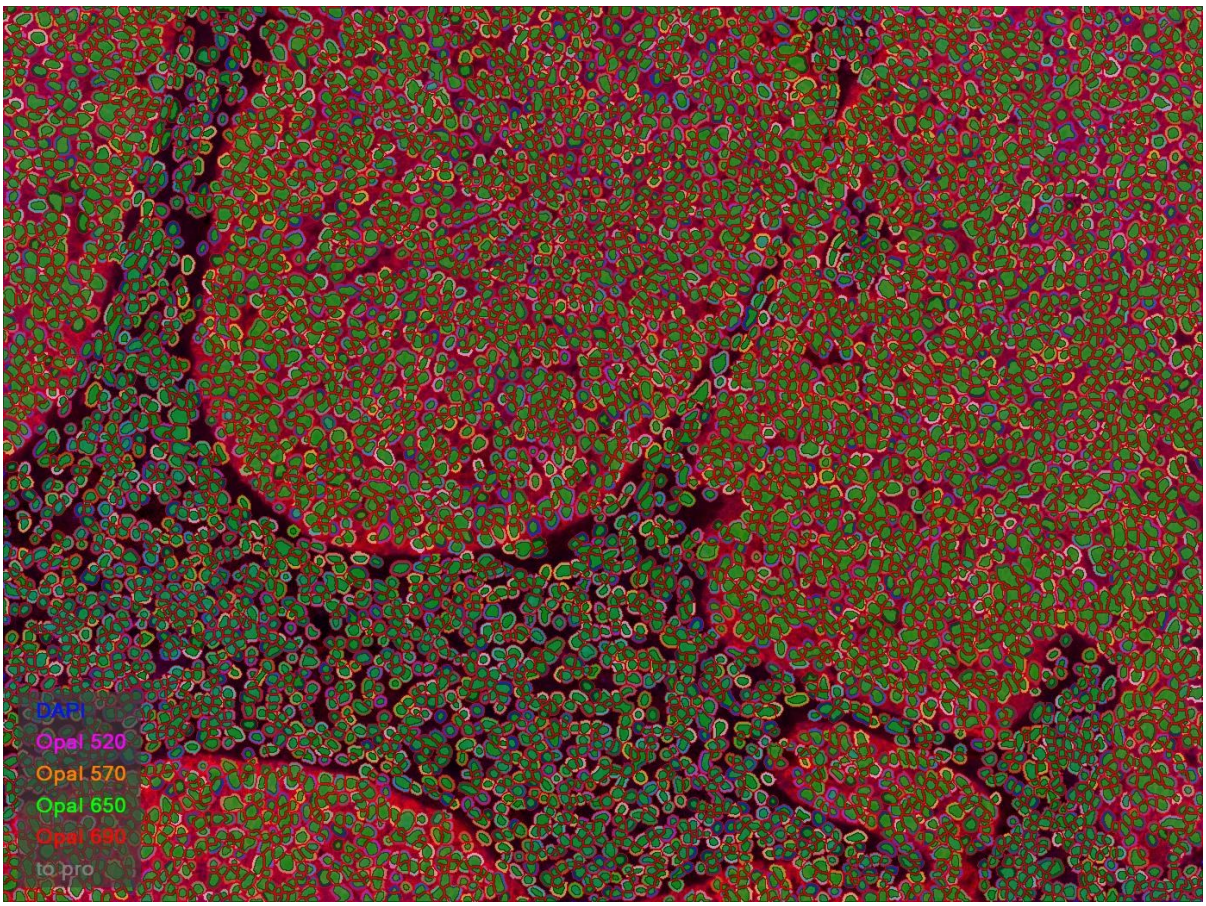
5.5.4 Analýza výsledků

Segmentaci tkáně, buněk a fenotypizaci jsem provedla v programu InForm 2.6.0. (Akoya Biosciences, USA) (Kap. 4.4.2). Na 20 reprezentativních fotografiích jsem program natrénovala na rozlišení nádorové tkáně od stromatu a pozadí. Nádor reprezentovaly buňky značené DAPI a cytokeratinem, stroma buňky značené pouze DAPI a za pozadí byla označena oblast bez signálu DAPI (Obrázek č. 23).



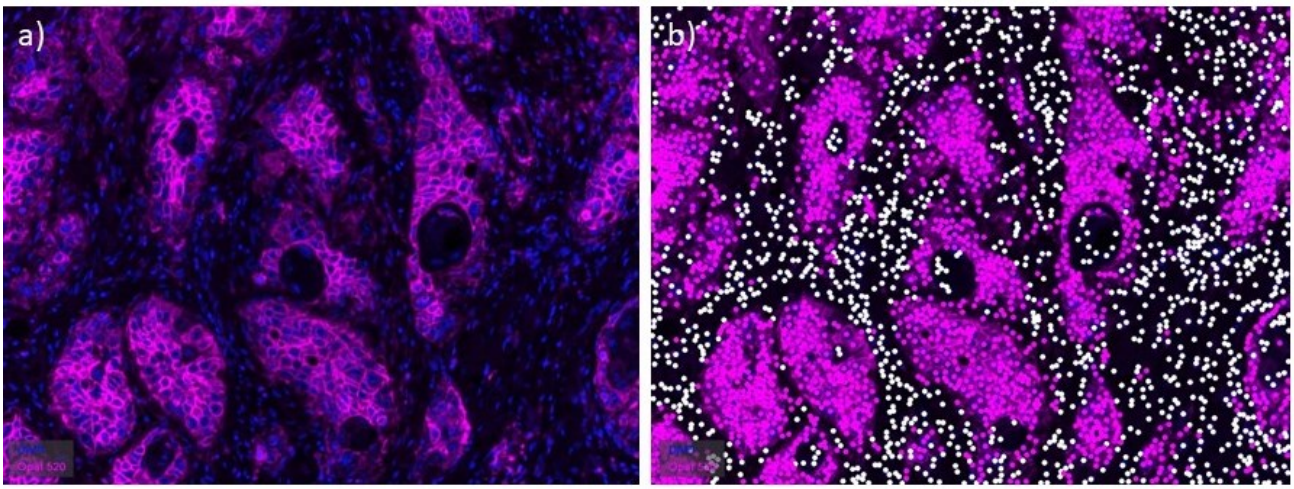
Obrázek č. 23 - Segmentace tkáně pro nádor 443, a) červeně cytokeratin, modře DAPI, b) segmentace tkáně – červeně nádor, zeleně nádorové stroma a modře pozadí.

Dále jsem na stejném souboru fotografií natrénovala program pro rozlišení jednotlivých buněk – jejich jader, cytoplazmy a membrány (Obrázek č. 24). Pro přesnější rozlišení jsem měnila nastavení velikosti jader, intenzity DAPI, citlivosti segmentace a vzdálenosti cytoplazmy od jádra, dokud program spolehlivě nerozlišoval jednotlivé buňky.

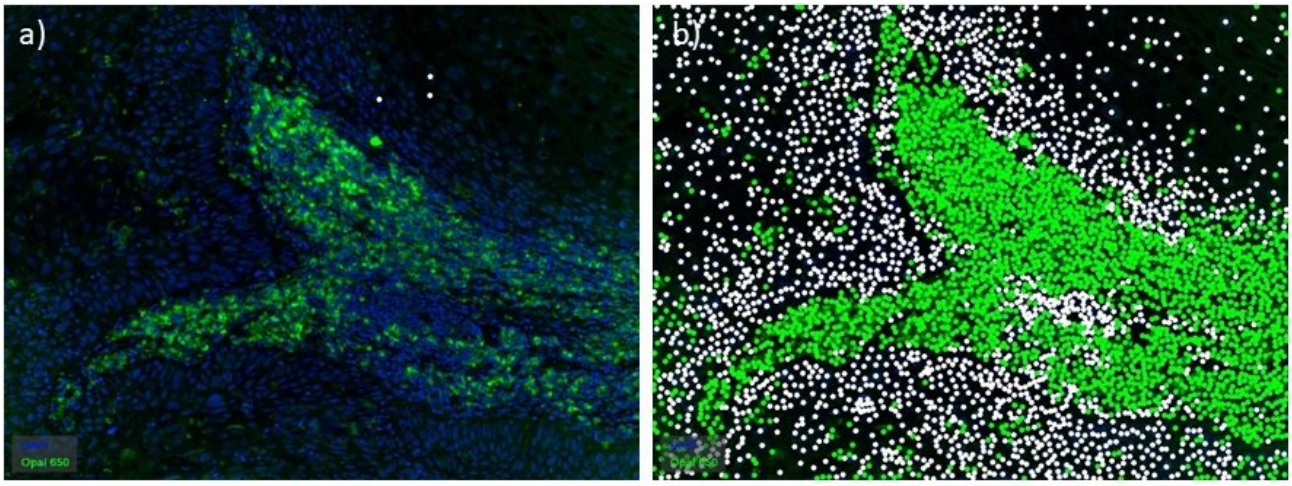


Obrázek č. 24 - Segmentace buněk pro nádor 443 – zeleně jádra, barevně cytoplazma ohraničena červeně membránou.

Pro fenotypizaci jsem ručně označovala buňky pozitivní a negativní na značení daným markerem dle síly signálu (Obrázky č. 25 a 26). Po označení přibližně 30 pozitivních a 30 negativních buněk jsem program nechala rozlišit fenotypy zbylých buněk. Poté jsem vždy provedla kontrolu, v případě nepřesností jsem pro danou buňku přenastavila fenotyp a program přetrénovala. Kontrolu jsem opakovala, dokud program přesně nerozlišoval všechny fenotypy pro všechny fotografie z trénovacího souboru.



Obrázek č. 25 - a) růžově Opal fluorofor 520 - GLUT1, modře jádra (DAPI), b) fenotypizace pro GLUT1 – růžově pozitivní buňky, bíle negativní buňky.

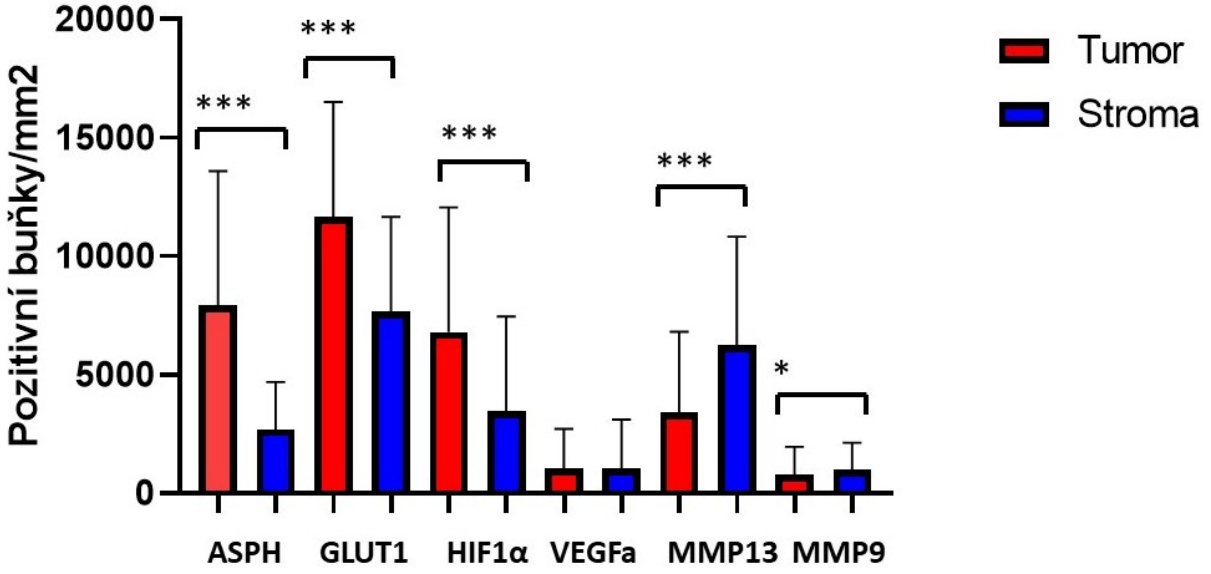


Obrázek č. 26 - a) zeleně Opal fluorofor 650 – MMP13, modře jádra (DAPI), b) fenotypizace pro MMP13 – zeleně pozitivní buňky, bíle negativní buňky.

Příprava fotek a segmentace tkáně a buněk spolu s fenotypizací tvoří algoritmus. Tento algoritmus jsem využila pro vyhodnocení 20 HPV+ a 20 HPV- nádorů, od každého vždy 3 reprezentativních fotografií.

Segmentací tkáně jsem získala plochu nádoru, stromatu a pozadí, a fenotypizací počty pozitivních buněk, ze kterých jsem v programu Excel (verze 2206) vypočítala počty pozitivních buněk na mm^2. Pro zjištění rozložení dat jsem použila Shapiro-Wilkův test. Vzhledem k tomu, že nebylo prokázáno normální rozložení u dat pro všechny protilátky, jsem pro analýzy využívala neparametrické testy. Pro každý marker jsem pomocí párového Wilcoxon testu porovnala počty pozitivních buněk na mm^2 v nádoru a stromatu (Obrázek č.

27). ASPH pozitivní buňky byly signifikantně více zastoupeny v nádoru (p<0,0001), stejně tak HIF1α (p<0,0001) a GLUT1 pozitivní buňky (p<0,0001). MMPs pozitivních buněk bylo více ve stromatu – MMP13 s p<0,0001 a MMP9 s p=0,0200. Pro znak VEGF jsem nezaznamenala žádný signifikantní rozdíl.

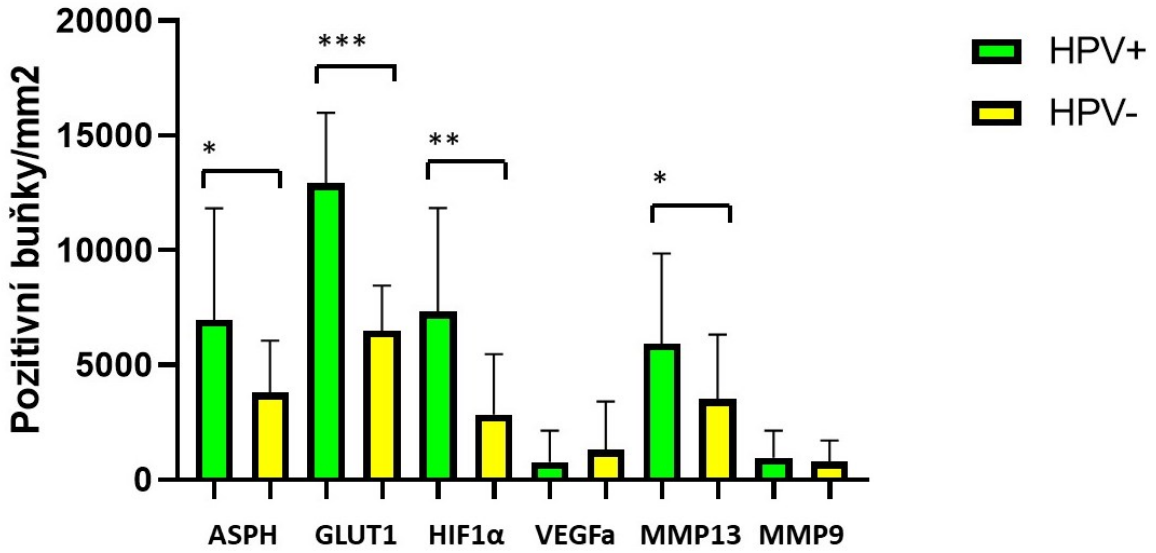


Obrázek č. 27 - Porovnání počtu pozitivních buněk v nádoru (červeně) a stromatu (modře), * = p < 0,05, *** = p < 0,0001, hladina významnosti p < 0,05. Chybové úsečky – střední chyba průměru.

Pro porovnání počtu pozitivních buněk na mm^2 pro každý z detekovaných proteinů mezi HPV+ (n=20) a HPV- (n=20) skupinami nádorů jsem použila neparametrický Mann-Whitney test, stejně jako pro všechny další analýzy ve zbytku této kapitoly. Výsledky se nachází v Tabulce č. 23 a na Obrázku č. 28 Detekovala jsem signifikantně vyšší počet buněk pozitivních na ASPH, HIF1α, MMP13 a GLUT1 u HPV+ nádorů.

Tabulka č. 23 - Porovnání mediánů počtu pozitivních buněk na mm^2 mezi HPV+ (n=20) a HPV- (n=20) skupinami, zeleně p-hodnoty nad hladinou významnosti, oranžově p-hodnoty blížící se hladině významnosti.

	Medián celkového pozitivního počet buněk na mm^2			**Medián počtu pozitivních buněk na mm^2 v nádoru**			**Medián počtu pozitivních buněk na mm^2 ve stromatu**		
Marker	**HPV+ (n=20)**	**HPV- (n=20)**	**P-hodnota**	**HPV+ (n=20)**	**HPV- (n=20)**	**P-hodnota**	**HPV+ (n=20)**	**HPV- (n=20)**	**P-hodnota**
ASPH	7185	3412	0,0402	12649	4651	0,0087	2013	2583	0,5831
GLUT1	12463	6584	<0,0001	15891	7535	<0,0001	9877	5857	0,0009
HIF1α	6794	1986	0,0013	10172	2308	0,0002	3142	992	0,1143
VEGFa	155	555	0,0922	243	726	0,0685	145	321	0,3272
MMP13	5436	2750	0,0491	4229	1758	0,0859	7144	4563	0,0524
MMP9	522	249	0,6205	172	155	0,6837	714	365	0,5831



Obrázek č. 28 - Porovnání mediánů celkového počtu pozitivních buněk na mm^2 mezi HPV+ (n=20) a HPV- (n=20) skupinami, zeleně HPV+, žlutě HPV-, * = p < 0,05, ** = p < 0,01 *** = p < 0,0001, hladina významnosti p < 0,05. Chybové úsečky – střední chyba průměru.

Mezi nádory lokalizovanými v orofaryngu (n=29) a nádory dutiny ústní (n=11) jsem detekovala signifikantní rozdíl v počtu pozitivních buněk na mm^2 HIF1α a GLUT1, které byly více zastoupeny u nádorů orofaryngu (Tabulka č. 24).

Tabulka č. 24 - Porovnání mediánů počtu pozitivních buněk na mm2 u nádorů podle jejich lokalizace a příslušné p hodnoty. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti, hladina významnosti p < 0,05..

Marker	Orofaryng (n=29)	Dutina ústní (n=11)	P-hodnota
ASPH	5399	3202	0,1025
GLUT1	11345	6574	0,0011
HIF1α	6192	1239	0,0070
VEGFa	242	345	0,8630
MMP13	4783	2551	0,1854
MMP9	195	524	0,3689

Dále jsem porovnala počty pozitivních buněk na mm^2 pro každý z vybraných markerů hypoxie u nádorů rozdělených dle jejich stadia do dvou skupin – stádium I (n=20) a stádium II-IV (n=20). VEGFa proteinu jsem detekovala více u nádorů vyššího stádia, oproti tomu pozitivních buněk na HIF1α a GLUT1 bylo u nádorů stádia I (Tabulka č. 25).

Tabulka č. 25 - Porovnání mediánů počtu pozitivních buněk na mm2 u nádorů podle jejich stadia a příslušné p hodnoty. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti, hladina významnosti p < 0,05..

Marker	Stádium I (n=20)	Stádium II-IV (n=20)	P-hodnota
ASPH	4810	3412	0,2012
GLUT1	12168	6969	<0,0001
HIF1α	6632	2241	0,0460
VEGFa	131	727	0,0134
MMP13	4146	3573	0,7180
MMP9	522	245	0,4945

Při porovnání počtu pozitivních buněk na mm^2 mezi nádory kuřáků (n=30) a nekuřáků (n=10) jsem detekovala signifikantně vyšší zastoupení buněk pozitivních na VEGFa u kuřáků. Výsledky se nachází v Tabulce č. 26.

Tabulka č. 26 - Porovnání mediánů počtu pozitivních buněk na mm^2 mezi nádory pacientů, kteří se označili (n=30) a neoznačili (n=10) za konzumenty alkoholu. Zeleně zvýrazněny p-hodnoty nad hladinou významnosti, hladina významnosti $p < 0,05$.

Marker	**Kouření**		**P-hodnota**
	Ano (n=30)	Ne (n=10)	
ASPH	4339	4816	0,7939
GLUT1	8735	9121	0,5079
HIF1α	3910	4734	>0,9999
VEGFa	446	113	0,0303
MMP13	4112	4523	0,9388
MMP9	448	344	0,6556

Nakonec jsem porovnala počty pozitivních buněk na mm^2 mezi nádory pacientů, kteří se označili (n=30) a neoznačili (n=10) za konzumenty alkoholu. Výsledky se nachází v Tabulce č. 27. Pro žádný z detekovaných markerů jsem nezaznamenala signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami.

Tabulka č. 27 - Porovnání mediánů počtu pozitivních buněk na mm2 mezi nádory pacientů, kteří se označili (n=30) a neoznačili (n=10) za konzumenty alkoholu, hladina významnosti $p < 0,05$..

Marker	**Alkohol**		**P-hodnota**
	Ano (n=30)	Ne (n=10)	
ASPH	4184	4590	0,9144
GLUT1	8357	12005	0,0721
HIF1α	2786	6353	0,5279
VEGFa	372	211	0,5240
MMP13	4000	4146	0,9144
MMP9	396	512	0,4139

6 Diskuse

Ve své práci jsem se zaměřila na detekci exprese ASPH a vybraných markerů hypoxie v nádorech hlavy a krku různé etiologie, jak na úrovni mRNA pomocí kvantitativní PCR, tak na úrovni proteinů pomocí multispektrální imunohistochemie. Markery hypoxie byly vybrány dle jejich možného vztahu s ASPH, která je u nás v laboratoři aktuálně studována v souvislosti s možným protinádorovým účinkem inhibitorů tohoto enzymu. Výsledky exprese mRNA a proteinu studovaných znaků se až na vyšší expresi VEGFa u HPV- HNSCC lišily. Prokázala jsem signifikantně vyšší expresi mRNA pro ASPH, VEGFa a P4HA1 u HNSCC negativních na HPV. Výsledky z IHC naznačují, v souladu s výsledky z RT-qPCR, vyšší expresi proteinu VEGFa u HPV- HNSCC, rozdíl však není statisticky signifikantní. Na úrovni proteinů jsem dále pozorovala statisticky významnou vyšší expresi HIF1α a GLUT1 u HPV+ nádorů.

Zvýšená exprese ASPH, 2-oxoglutarát-dependentní hydroxylázy, je významným negativním prognostickým faktorem v mnoha typech solidních nádorů (Kanwal *et al.*, 2020). Nádory s vysokou expresí ASPH se vyznačují vyšší invazivitou a agresivním chováním. V poslední době byly vyvinuty malé molekulární inhibitory ASPH umožňující cílenou léčbu nádorů s vysokou expresí tohoto proteinu (Kanwal *et al.*, 2020). V HNSCC role ASPH zatím zkoumána nebyla. ASPH může v buňce sloužit jako sensor hladiny kyslíku a výsledky studií naznačují, že je v hypoxii prostřednictvím HIF1 posilována její transkripce (Lawton *et al.*, 2010; Chang, Forde and Lai, 2019). Expresi ASPH jsem v HNSCC detekovala na úrovni mRNA i proteinu. Vyšší exprese ASPH proteinu byla zjištěna v nádoru oproti stromatu ($p<0,0001$) u HPV+ i HPV- HNSCC. Detekce ASPH na mRNA a proteinové úrovni však ukázala diskrepantní výsledky. Ve své studii jsem prokázala vyšší expresi ASPH proteinu u HPV+ HNSCC ($p=0,0402$) zatímco na úrovni mRNA jsem detekovala více ASPH u HPV- HNSCC ($p=0,0163$). U HPV+ nádorů HNSCC jsem zjistila i vyšší expresi proteinu HIF1α, u něhož bylo prokázáno, že HPV onkoprotein E6 stabilizuje tento faktor a zároveň tento protein pozitivně ovlivňuje transkripci ASPH. Rozdílné výsledky detekce ASPH na úrovni proteinu a mRNA lze alespoň částečně vysvětlit i limitací jednotlivých metod. Zatímco IHC rozlišuje kompartmenty a buňky, kde dochází k produkci proteinu, detekce mRNA je prováděna po izolaci RNA ze všech buněk získaných z nádoru. Na diskrepanci výsledků by mohly mít vliv další faktory ovlivňující expresi ASPH, například regulace translace prostřednictvím miRNA (Yao, Liu and Huang, 2018). Pro cílení léčby nádorů malými molekulami zaměřenými na ASPH je důležitá její

exprese především na proteinové úrovni. Moje předběžné výsledky naznačují, že by z této léčby více profitovali pacienti s HNSCC HPV+. Tyto předběžné výsledky je však třeba ověřit na větším počtu vzorků. Zajímavé je též studium vlivu vyšší exprese ASPH enzymu na prognózu pacientů s HNSCC. V současnosti se právě na tyto otázky zaměřujeme a rozšiřujeme počet analyzovaných materiálů a výsledky získané na rozšířeném souboru pacientů nám zároveň umožní provést analýzu přežívání, neboť sledování pacientů ve studii je již nyní pětileté.

Mezi proteiny, jejichž aktivita je ovlivněna ASPH patří mimo jiné MMPs. V naší studii jsem detekovala více buněk pozitivních na MMP9 a MMP13 u HPV+ HNSCC, ale rozdíl oproti expresi těchto proteinů u HPV- HNSCC byl statisticky významný jen pro MMP13 (p=0,0491). Toto je dosud první studie, která studovala vliv HPV statusu na expresi MMPs u HNSCC. U nádorů cervixu asociovaných s HPV byla ukázána zvýšená exprese MMPs oproti zdravé tkáni cervikálního epitelu (Davidson *et al.*, 1998). Analýza exprese MMPs na buněčných liniích odvozených od nádoru děložního čípku vyvolaného HPV ukázala, že onkoproteiny HPV16, E6 a E7, podporovaly aktivitu MMP1, 2, a 9, čímž přispívaly ke zvýšené migraci buněk (Zhu, Ye, & Zhang, 2015).

Negativním prognostickým markerem HNSCC je také proangiogenní faktor VEGF (Kyzas *et al.*, 2005). Prokázala jsem významně vyšší expresi VEGFa na úrovni mRNA (p<0,0001) a stejný trend (p=0,0922) na úrovni proteinu ve skupině HNSCC negativních na HPV. Tyto analýzy jsou v souladu s předchozími výsledky z naší laboratoře, kde bylo detekováno signifikantně více VEGFa pozitivních buněk u HPV- HNSCC (Pokrývková *et al.*, 2020). Vyšší expresi VEGF u HPV- HNSCC detekovali i další autoři (Baruah et al., 2015; Karpathiou et al., 2019), jiní však tento rozdíl v souvislosti s etiologií nádoru neprokázali (Troy et al., 2013, Fei et al., 2009). Je možné, že diskrepantní výsledky studií lze alespoň částečně přičíst i metodice detekce HPV. Například Troy a kol. ve své studii detekovali HPV metodou *in situ* hybridizace, která je málo citlivá a pomocí této metody nelze určit, zda se v případě pozitivity jedná o aktivní virovou infekci.

Na úrovni proteinu jsem u HPV+ HNSCC prokázala (p=0,0013) vyšší množství HIF1α, hlavního regulátoru buněčné odpovědi na změny hladiny kyslíku. Jedním z mechanismů, který by mohl vést k rozdílnému množství proteinu HIF1α mezi HPV+ a HPV- nádory, je přímá interakce HPV onkoproteinu E6 s podjednotkou HIF1α, která má za následek snížení

interakce HIF1α s proteinem VHL, což vede ke stabilizaci podjednotky a následně k vyšší aktivitě HIF1 a posílení glykolýzy (Guo *et al.*, 2014b). Až 7,2× více proteinu HIF1α v HPV+ liniích oproti HPV- liniím odvozených od HNSCC bylo detekováno bez ohledu na hladinu kyslíku (Knuth *et al.*, 2017). Jiná studie také na buněčných liniích odvozených od HNSCC ale ukázala vyšší expresi HIF1α na úrovni proteinu i mRNA u HPV- linií (Jung *et al.*, 2017). Zvýšená exprese proteinu HIF1α byla pozorována u nádorů cervixu, které jsou téměř ve 100 % asociované s HR HPV infekcí (Bachtiary *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že HIF1α je regulován na úrovni proteinu (Nakazawa, Keith and Simon, 2016), rozdíl mezi skupinami nemusí být na úrovni exprese mRNA patrný.

V souladu s vyšší expresí proteinu HIF1α jsem u HPV+ HNSCC detekovala více proteinu přenašeče glukózy GLUT1 ($p<0,0001$), který je pozitivně regulovaný HIF1. Na úrovni mRNA jsem rozdíl mezi HPV+ a HPV- skupinami neprokázala. Jiné studie, které se zabývaly detekcí GLUT1 v HNSCC bez ohledu na HPV status ukázaly, že exprese proteinu byla zvýšená ve všech těchto nádorech (Mellanen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2008). Zvýšená hladina proteinu GLUT1 je typická pro řadu dalších malignit (Szablewski, 2013). V nádorech cervixu byla pozorována současně zvýšená exprese mRNA i proteinu GLUT1 oproti zdravé tkáni (Rudlowski *et al.*, 2003). Dále byla v těchto nádorech prokázána role tohoto proteinu jako nezávislého negativního prognostického faktoru (Kim and Chang, 2019). Ve vzorcích od pacientů s nádory plic byla zvýšená exprese mRNA i proteinu GLUT1 pozorována v souvislosti s aktivní infekcí HPV (Fan *et al.*, 2016).

Protein P4HA1 je pozitivně regulovaný prostřednictvím faktoru HIF1 (Cao, Cao, Li, Zhang, & Zhu, 2019; Kappler et al., 2017). U HNSCC byla exprese mRNA P4HA1 identifikovaná jako nezávislý marker hypoxie, a zároveň byl tento znak vyhodnocen jako negativní prognostický marker (Kappler et al., 2017; Tawk et al., 2016). V naší studii jsem prokázala vyšší relativní expresi mRNA P4HA1 u HPV- HNSCC ($p=0,0139$). Tento výsledek koresponduje se závěry autorů, kteří pozorovali vyšší expresi mRNA P4HA1 u HPV- HNSCC různých lokalizací (Q. Li et al., 2020). Vzhledem k prognostickému významu mRNA P4HA1 by bylo vhodné doplnit výsledky též na úrovni detekce proteinu. Prognostický význam mRNA P4HA1 ověříme ve studii, která právě v laboratoři probíhá a jejímž základem jsou pilotní data z mé diplomové práce.

Na HPV- buněčných liniích odvozených od HNSCC byla normoxii pozorována zvýšená exprese mRNA markerů hypoxie HIF1α, PDK a CA9, což bylo v souladu se zvýšeným metabolismem glukózy a produkcí laktátu (Jung *et al.*, 2017). HPV+ buněčné linie oproti tomu více využívaly mitochondriální respiraci a měly zvýšenou hladinu cytochromu C. Pozorování, že HPV+ HNSCC jsou méně hypoxické podporují i výsledky další studie, jejíž autoři ve vzorcích těchto nádorů detekovali nižší relativní expresi mRNA HIF1α, GLUT 1, 3 a P4HA3 a rovněž nižší množství proteinu CA9 (Hanns *et al.*, 2015).

Mé výsledky ukazují na vyšší expresi mRNA markerů hypoxie u HPV- HNSCC, na úrovni proteinů ale ukazují na vyšší množství markerů hypoxie u HPV+ HNSCC. Při detekci markerů hypoxie je významnější míra jejich exprese na úrovni proteinů, jelikož některé z těchto proteinů jsou regulovány posttranslačně. Jedním z možných důvodů diskrepance těchto výsledků je heterogenita nádorů. Nádory jsou obecně co do transkriptomu, proteomu a metabolismu často vysoce heterogenní. Stejně tak i exprese markerů hypoxie může v rámci nádoru vykazovat značnou heterogenitu (Kidd and Grigsby, 2008; Gerlinger *et al.*, 2012; Mangano *et al.*, 2015); (Iakovlev *et al.*, 2007). V neposlední řadě mohou být výsledky ovlivněné i charakterem hypoxie v nádorech (akutní vs chronická), což dále ovlivňuje fenotyp nádoru (Chan *et al*., 2008). V mé studii jsem pro účely detekce exprese mRNA izolovala RNA ze všech buněk nádoru i z buněk infiltrujících nádor. Oproti tomu metoda IHC umožňuje analyzovat jednotlivé části nádoru a zohlednit tak lépe jejich heterogenitu.

Virově indukované nádory odpovídají lépe na léčbu (kap. 3.3.3.1), a zároveň bylo ukázáno, že hypoxické nádory bývají radiorezistentní (kap. 3.1.1). Ve studii jsem ale prokázala vyšší expresi proteinových markerů hypoxie (HIF1α, GLUT) právě u HPV+ HNSCC, u kterých je obvykle lepší odpověď na léčbu. Jedním z možných vysvětlení by mohlo být snížení úrovně proteinů účastnících se oprav DNA v hypoxii, což by mohlo mít za následek zvýšenou radiosenzitivitu těchto buněk (Hill et al., 2015). Odpověď HNSCC různé etiologie na léčbu také ovlivňuje řada dalších faktorů, jako je například věk pacientů, protinádorová imunitní odpověď nebo rozdíly v mechanismu inaktivace tumorsupresorových genů (kap. 3.3.3).

Výsledky porovnání exprese hypoxických markerů a ASPH u HNSCC rozdělených do skupin dle jiných rizikových faktorů a klinicko-patologických charakteristik, než je infekce HPV, jsou pro tento analyzovaný soubor pacientů omezeny nestejným zastoupením HPV+ a HPV-

nádorů ve skupinách. Protože je HPV infekce významně spojena s nádory HNSCC v oblasti orofaryngu, dále ve skupině nádorů stádia I převládají HPV+ nádory a ve skupině kuřáků/konzumentů alkoholu naopak HPV- nádory, výsledky dalších analýz tím mohou být ovlivněny. Po rozšíření souboru bude na výsledky aplikována pokročilá statistika pro zjištění nezávislosti jednotlivých proměnných, jako je HPV infekce, věk pacientů, lokalizace nebo například stádium nádoru.

Ve své práci jsem porovnávala vliv stádia nádorů podle jejich patologické klasifikace (pTNM) (stádium I vs. II-IV) na expresi ASPH a markerů hypoxie. Na úrovni mRNA byly signifikantně více exprimovány ASPH (p=0,0051) a VEGFa (p=0,0103) u skupiny pokročilejších nádorů stádia II-IV oproti nádorům stádia I, stejně tak VEGFa i na úrovni proteinu (p=0,0134). Shodné pozorování ukázala studie na 69 pacientech s HNSCC, ve které detekovali VEGFa na proteinové úrovni (Kyzas *et al.*, 2005). Ve studii zabývající se expresí ASPH v souvislosti se stádiem nádoru u pacientů s adenokarcinomem plic detekovali vyšší expresi mRNA ASPH u pokročilejších stádií nádorů (Xu *et al.*, 2020). Dle výsledků výzkumů na jiných typech solidních nádorů, konkrétně karcinomech tlustého střeva a hepatocelulárních karcinomech, bylo u pokročilejších stádií detekováno vyšší množství proteinů HIF1α resp. GLUT1 (Amann *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Já jsem pro oba proteiny prokázala vyšší expresi u nádorů stádia I, což mohlo být způsobeno právě nestejným zastoupením HPV+ a HPV- nádorů v analyzovaných skupinách, 17/20 nádorů stádia I bylo pozitivních na HPV.

Dále jsem porovnávala expresi markerů hypoxie u skupin nádorů rozdělených dle lokalizace na oblast orofaryngu (orofaryng, kořen jazyka, tonsily a měkké patro) a oblast dutiny ústní (tělo jazyka, spodina dutiny ústní nebo retromolární oblast). Pozorovala jsem vyšší relativní expresi mRNA ASPH, HIF1α, VEGFa i P4HA1 u nádorů v dutině ústní. Vyšší exprese proteinů HIF1α a GLUT1 byla naopak ve skupině nádorů z oblasti orofaryngu, což koreluje s jejich vyšší expresí u HPV+ HNSCC, neboť všechny nádory této lokalizace v mé práci jsou spojeny s infekcí HPV.

Dále jsem zkoumala souvislost kouření a konzumace alkoholu, rizikových faktorů vzniku HNSCC, s expresí ASPH a markerů hypoxie. Při porovnání skupin nádorů kuřáků a nekuřáků jsem mezi těmito skupinami nezaznamenala rozdíl v relativní expresi mRNA ASPH ani hypoxických markerů. Na úrovni proteinu byl statisticky významný vyšší počet pozitivních

buněk pro VEGFa u kuřáků. Na toto pozorování bude mít pravděpodobně vliv opět nestejné zastoupení HPV+ a HPV- nádorů v analyzovaných skupinách (17/20 HPV- vzorků pocházelo do kuřáků), i nestejná velikost těchto skupin.

Mezi konzumenty alkoholu a pacienty, kteří se za konzumenty alkoholu neoznačili, jsem neprokázala žádný signifikantní rozdíl v expresi sledovaných markerů ani ASPH. Vliv chronického přísunu alkoholu na hypoxii byl zjištěn v myším modelu, kde vedl k hypoxii jater (Arteel *et al.*, 1996) a zároveň byla prokázána vyšší exprese mRNA HIF1α v játrech (Zhou *et al.*, 2013). Vztah hypoxie a kouření u pacientů s HNSCC naznačuje studie Hoff a kol., která zjistila, že kouření zvyšuje u těchto pacientů množství karboxyhemoglobinu, (Hoff, Grau and Overgaard, 2012). Karboxyhemoglobin znemožňuje přenos kyslíku, jeho vyšší množství by tedy mohlo vést k celkové hypoxii u kuřáků. Vyšší míru hypoxie u kuřáků podporuje i pozorování vlivu nikotinu na zvýšení exprese HIF1α nebo VEGFa v karcinomech nasofaryngu (Shi *et al.*, 2012).

Uvedené výsledky naznačují, že HPV status HNSCC má vliv na expresi markerů hypoxie a ASPH, což by mohlo částečně vysvětlit rozdílnou prognózu a odpověď na léčbu u HNSCC rozdílné etiologie. Analýzy je třeba nyní provést na větším souboru pacientů a pokusit se vytipovat znak či jejich kombinaci, které by vedle HPV statusu mohly umožnit další stratifikaci jednotlivých pacientů pro co nejvhodnější individualizovanou léčbu.

7 Souhrn

Ve své práci jsem provedla charakterizaci vzorků od pacientů s nádory hlavy a krku. Po izolaci nukleových kyselin a reverzní transkripci jsem získala cDNA. Vzniklou cDNA jsem použila pro detekci HPV onkogenu E6 k určení HPV statusu nádoru. Metodou reverzní transkripce s následnou kvantitativní PCR jsem stanovila relativní expresi mRNA ASPH a vybraných hypoxických markerů HIF1α, HIF2α, GLUT1, VEGFa a P4HA1. Na modelových systémech nádorů hlavy a krku jsem optimalizovala metodu multispektrální imunohistochemie a nastavení dvou multiplexových panelů, každý obsahující 5 fluorescenčních barev. Touto metodou jsem provedla detekci ASPH a markerů hypoxie HIF1α, GLUT1, VEGFa, MMP13 a MMP9 na úrovni proteinu u stejné kohorty vzorků, kterou jsem analyzovala pomocí kvantitativní PCR. Porovnala jsem míru exprese těchto markerů s ohledem na virovou etiologii nádorů a další rizikové faktory či klinicko-patologické charakteristiky.

Potvrdila jsem hypotézu "Nádory hlavy a krku indukované HPV mají rozdílnou expresi markerů hypoxie než nádory hlavy a krku negativní na HPV", moje výsledky ale jednoznačně neukazují na vyšší míru hypoxie u jedné z těchto skupin nádorů. Na úrovni mRNA jsem prokázala vyšší relativní expresi ASPH, P4HA1 a VEGF u skupiny nádorů negativních na HPV. Na úrovní proteinu jsem detekovala vyšší expresi HIF1α, GLUT1, ASPH a MMP13 u nádorů pozitivních na HPV. Pro detekci markerů hypoxie je významnější míra jejich exprese na úrovni proteinů, protože některé z těchto markerů, např. HIF1α jsou regulovány na proteinové úrovni. Jiné markery, např. GLUT1 jsou v buňkách i na úrovni proteinu přítomny stále, podstatné je ale porovnání míry exprese těchto proteinů mezi jednotlivými skupinami. Je rovněž důležité zmínit, že nepřímá detekce hypoxie prostřednictvím exprese endogenních hypoxických markerů nemusí být ve shodě s výsledky fyzikálních metod, například PET, měřících hypoxii přímo.

Tato práce rozšiřuje poznání o studiu hypoxie u nádorů hlavy a krku a ukazuje na její možnou souvislost s virovou etiologií nádorů. Bližší objasnění tohoto vztahu by mohlo částečně vysvětlit rozdílnou prognózu pacientů s nádory hlavy a krku pozitivními a negativními na HPV a zároveň umožnit vhodnější, více individualizovanou volbu terapie pro pacienty s těmito nádory.

8 Seznam použité literatury

Amann, T. *et al.* (2009) 'GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis', *American Journal of Pathology*, 174(4), pp. 1544–1552. doi: 10.2353/ajpath.2009.080596.

Arteel, G. E. *et al.* (1996) 'Acute alcohol produces hypoxia directly in rat liver tissue in vivo: Role of Kupffer cells', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(3 34-3). doi: 10.1152/ajpgi.1996.271.3.g494.

*Aupérin, A. (2020) 'Epidemiology of head and neck cancers: An update', *Current Opinion in Oncology*, 32(3), pp. 178–186. doi: 10.1097/CCO.0000000000000629.

Bachtiary, B. *et al.* (2003) 'Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer', *Clinical Cancer Research*, 9(6), pp. 2234–2240.

*Blot, W. J. *et al.* (1988) 'Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer', *Cancer Research*, 48(11), pp. 3282–3287.

Bossler, F. *et al.* (2019) 'Repression of Human Papillomavirus Oncogene Expression under Hypoxia Is Mediated by PI3K/mTORC2/AKT Signaling', *mBio*. NLM (Medline), 10(1). doi: 10.1128/mBio.02323-18.

*Brentjens, M. H. *et al.* (2002) 'Human papillomavirus: A review', *Dermatologic Clinics*, 20(2), pp. 315–331. doi: 10.1016/S0733-8635(01)00028-6.

Van den Brule, A. J. C. *et al.* (2002) 'GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes', *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), pp. 779–787. doi: 10.1128/JCM.40.3.779-787.2002.

*Carlander, A. F. *et al.* (2021) 'A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide', *Viruses*, 13(7). doi: 10.3390/v13071326.

Castellsagué, X. *et al.* (2016) 'HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients', *Journal of the National Cancer Institute*, 108(6), pp. 1–12. doi: 10.1093/jnci/djv403.

*Cui, N., Hu, M. and Khalil, R. A. (2017) 'Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases', in *Physiology & behavior*, pp. 1–73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.

D'Souza, G. *et al.* (2017) 'Differences in the prevalence of human papillomavirus (HPV) in head and neck squamous cell cancers by sex, race, anatomic tumor site, and HPV detection method', *JAMA Oncology*, 3(2), pp. 169–177. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3067.

Dalewská, Natálie. *Detekce a charakterizace makrofágů v nádorech virové a nevirové etiologie.* Praha, 2020.

Dang, T. P. *et al.* (2000) 'Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), pp. 1355–1357. doi: 10.1093/jnci/92.16.1355.

Davidson, B. *et al.* (1998) 'Expression of Metalloproteinases and Their Inhibitors in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix', *International Journal of Gynecological Pathology*, 17(4), pp. 295–301. doi: 10.1097/00004347-199810000-00002.

Doorbar, J. (2013) 'Latent papillomavirus infections and their regulation', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 3(4), pp. 416–421. doi: 10.1016/j.coviro.2013.06.003.

Eustace, A. *et al.* (2013) 'A 26-gene hypoxia signature predicts benefit from hypoxia-modifying therapy in laryngeal cancer but not bladder cancer', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 19(17), pp. 4879–4888. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0542.

Fan, R. *et al.* (2016) 'Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells', *Tumor Biology*. Springer Netherlands, 37(4), pp. 4655–4663. doi: 10.1007/s13277-015-4221-5.

Fleige, S. *et al.* (2006) 'Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR', *Biotechnology Letters*, 28(19), pp. 1601–1613. doi: 10.1007/s10529-006-9127-2.

Fleming, J. C. *et al.* (2019) 'HPV, tumour metabolism and novel target identification in head and neck squamous cell carcinoma', *British Journal of Cancer*. Springer US, 120(3), pp. 356–367. doi: 10.1038/s41416-018-0364-7.

Forsythe, J. A. *et al.* (1996) 'Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 16(9), pp. 4604–4613. doi: 10.1128/mcb.16.9.4604.

Franceschi, S. *et al.* (1990) 'Smoking and Drinking in Relation to Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, Larynx, and Esophagus in Northern Italy', *Cancer Research*, 50(20), pp. 6502–6507.

Gerlinger, M. *et al.* (2012) 'Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing', *New England Journal of Medicine*, 366(10), pp. 883–892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.

Gillison, M. L. *et al.* (2000) 'Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers', *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), pp. 709–720. doi: 10.1093/jnci/92.9.709.

*Gillison, M. L. *et al.* (2015) 'Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), pp. 3235–3242. doi: 10.1200/JCO.2015.61.6995.

*Graham, S. V. (2017) 'The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review', *Clinical Science*, 131(17), pp. 2201–2221. doi: 10.1042/CS20160786.

Gu, Y. Z. *et al.* (1998) 'Molecular characterization and chromosomal localization of a third α- class hypoxia inducible factor subunit, HIF3α', *Gene Expression*. Cognizant Communication Corporation, 7(3), pp. 205–213.

Guo, Y. *et al.* (2014a) 'Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1α induced warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1α interaction', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 15(5), pp. 7974–7986. doi: 10.3390/ijms15057974.

*Haedicke, J. and Iftner, T. (2013) 'Human papillomaviruses and cancer', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 108(3), pp. 397–402. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.004.

Hanns, E. *et al.* (2015) 'Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 51(9), pp. 848–856. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.003.

Hashibe, M. *et al.* (2013) 'Tobacco, alcohol, body mass index, physical activity, and the risk of head and neck cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cohort', *Head & Neck*, 35(7), pp. 914–922. doi: 10.1002/hed.23052.

*Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) 'Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation', *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.

Hill, R. P. *et al.* (2015) 'Hypoxia and Predicting Radiation Response', *Seminars in Radiation Oncology*.

Elsevier, 25(4), pp. 260–272. doi: 10.1016/j.semradonc.2015.05.004.

Hoff, C. M., Grau, C. and Overgaard, J. (2012) 'Effect of smoking on oxygen delivery and outcome in patients treated with radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma - A prospective study', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier, 103(1), pp. 38–44. doi: 10.1016/j.radonc.2012.01.011.

Hong, A. *et al.* (2013) 'The prognostic significance of hypoxia inducing factor 1-α in oropharyngeal cancer in relation to human papillomavirus status', *Oral Oncology*. Pergamon, 49(4), pp. 354–359. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.11.006.

Hoppe-Seyler, K. *et al.* (2017) 'Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(6), pp. E990–E998. doi: 10.1073/pnas.1615758114.

*Horsman, M. R. *et al.* (2012) 'Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, 9(12), pp. 674–687. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.171.

Hsu, J. Y. *et al.* (2017) 'Epidermal growth factor–induced pyruvate dehydrogenase kinase 1 expression enhances head and neck squamous cell carcinoma metastasis via up-regulation of fibronectin', *FASEB Journal*, 31(10), pp. 4265–4276. doi: 10.1096/fj.201700156R.

Hu, C.-J. *et al.* (2003) 'Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(24), pp. 9361–9374. doi: 10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.

Chang, W. H., Forde, D. and Lai, A. G. (2019a) 'Dual prognostic role of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases in ten cancer types: implications for cell cycle regulation and cell adhesion maintenance', *Cancer Communications*. BioMed Central Ltd., 39(1), p. 23. doi: 10.1186/s40880-019-0369-5.

Chaturvedi, A. K. *et al.* (2013) 'Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers', *Journal of Clinical Oncology*, 31(36), pp. 4550–4559. doi: 10.1200/JCO.2013.50.3870.

Chen, E. Y., Fujinaga, M. and Giaccia, A. J. (1999) 'Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development', *Teratology*. John Wiley & Sons, Ltd, 60(4), pp. 215–225. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(199910)60:4<215::AID-TERA6>3.0.CO;2-2.

Chen, X. *et al.* (2018) 'Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis', *Molecular Immunology*. Elsevier, 96(January), pp. 28–36. doi: 10.1016/j.molimm.2018.02.005.

*Chiantore, M. V. *et al.* (2020) 'Human Papillomavirus and carcinogenesis: Novel mechanisms of cell communication involving extracellular vesicles', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, pp. 92–98. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.12.009.

Chiara Cantarini, M. *et al.* (2006) 'Aspartyl-Asparagyl hydroxylase Over-Expression in Human Hepatoma Is Linked to Activation of Insulin-Like Growth Factor and Notch Signaling Mechanisms'. doi: 10.1002/hep.21272.

Chien, Y.-C. *et al.* (2001) 'Serologic Markers of Epstein–Barr Virus Infection and Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwanese Men', *New England Journal of Medicine*, 345(26), pp. 1877–1882. doi: 10.1056/nejmoa011610.

Iakovlev, V. V. *et al.* (2007) 'Effect of distributional heterogeneity on the analysis of tumor hypoxia based on carbonic anhydrase IX', *Laboratory Investigation*, 87(12), pp. 1206–1217. doi: 10.1038/labinvest.3700680.

Janecka-Widła, A. *et al.* (2020) 'Active HPV infection and its influence on survival in head and neck squamous-cell cancer', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 146(7), pp. 1677–1692. doi: 10.1007/s00432-020-03218-6.

Jung, A. C. *et al.* (2010) 'Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma', *International Journal of Cancer*, 126(8), pp. 1882–1894. doi: 10.1002/ijc.24911.

Jung, Y. S. *et al.* (2017) 'HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer', *Oncotarget*, 8(31), pp. 51530–51541. doi: 10.18632/oncotarget.17887.

*Kanwal, M. *et al.* (2020) 'Aspartate ß-hydroxylase as a target for cancer therapy', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. doi: 10.1186/s13046-020-01669-w.

Kidd, E. A. and Grigsby, P. W. (2008) 'Intratumoral metabolic heterogeneity of cervical cancer', *Clinical Cancer Research*, 14(16), pp. 5236–5241. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5252.

Kim, B. H. and Chang, J. H. (2019) 'Differential effect of GLUT1 overexpression on survival and tumor immune microenvironment of human papilloma virus type 16-positive and -negative cervical cancer', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-019-49928-x.

Kimple, R. J. *et al.* (2013) 'Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer', *Cancer Research*, 73(15), pp. 4791–4800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0587.

*Klozar, J. *et al.* (2010) 'Human papillomavirus in head and neck tumors: Epidemiological, molecular and clinical aspects', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 160(11–12), pp. 305–309. doi: 10.1007/s10354-010-0782-5.

Knuth, J. *et al.* (2017) 'Hypoxia-inducible factor-1α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(52), pp. 89681–89691. doi: 10.18632/oncotarget.20813.

Koneva, L. A. *et al.* (2018) 'HPV integration in HNSCC correlates with survival outcomes, immune response signatures, and candidate drivers', *Molecular Cancer Research*, 16(1), pp. 90–102. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0153.

Koslabova, E. *et al.* (2013) 'Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors', *International Journal of Cancer*, 133(8), pp. 1832–1839. doi: 10.1002/ijc.28194.

*Kreimer, A. R. *et al.* (2005) 'Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systemic review', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(2), pp. 467–475. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.

Krupar, R. *et al.* (2014) 'Immunologic and metabolic characteristics of HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas are strikingly different.', *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 465(3), pp. 299–312. doi: 10.1007/S00428-014-1630-6.

Kyzas, P. A. *et al.* (2005) 'Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(9), pp. 624–630. doi: 10.1007/s00432-005-0003-6.

Lassen, P. *et al.* (2010) 'HPV-associated p16-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer', *Radiotherapy and Oncology*. doi: 10.1016/j.radonc.2009.10.008.

Lawton, M. *et al.* (2010) 'Aspartyl-(asparaginyl) β-hydroxylase, hypoxia-inducible factor-1α and Notch cross-talk in regulating neuronal motility', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(5), pp. 347–356. doi: 10.4161/oxim.3.5.13296.

*Lendahl, U. *et al.* (2009) 'Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 821–832. doi: 10.1038/nrg2665.

León, X. *et al.* (2009) 'Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of

second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study', *Cancer Causes and Control*, 20(5), pp. 645–652. doi: 10.1007/s10552-008-9277-8.

Li, H. *et al.* (2018) 'Association of human papillomavirus status at head and neck carcinoma subsites with overall survival', *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 144(6), pp. 519–525. doi: 10.1001/jamaoto.2018.0395.

Li, S. Jiao *et al.* (2008) 'Expression of Glut-1 in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas, and compared with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulation in positron emission tomography', *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(3), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.bjoms.2007.11.003.

Linge, A. *et al.* (2016) 'Low cancer stem cell marker expression and low hypoxia identify good prognosis subgroups in HPV(-) HNSCC after postoperative radiochemotherapy: A multicenter study of the DKTK-ROG', *Clinical Cancer Research*, 22(11), pp. 2639–2649. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1990.

*Loboda, A., Jozkowicz, A. and Dulak, J. (2010) 'HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical.', *Molecules and cells*, 29(5), pp. 435–442. doi: 10.1007/s10059-010-0067-2.

Ma, Y. *et al.* (2014) 'Human Papillomavirus Community in Healthy Persons, Defined by Metagenomics Analysis of Human Microbiome Project Shotgun Sequencing Data Sets', *Journal of Virology*, 88(9), pp. 4786–4797. doi: 10.1128/jvi.00093-14.

Mangano, Alberto *et al.* (2015) 'Intratumor heterogeneity: Origins, clinical significance and optimal strategies for cancer treatment', *Future Oncology*, 11(4), pp. 561–564. doi: 10.2217/fon.14.296.

Maxwell, P. H. *et al.* (1997) 'Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), pp. 8104–8109. doi: 10.1073/pnas.94.15.8104.

McBride, A. A. and Warburton, A. (2017) 'The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1006211.

Mellanen, P. *et al.* (1994) 'Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors', *International Journal of Cancer*, 56(5), pp. 622–629. doi: 10.1002/ijc.2910560503.

Mirzamani, N. *et al.* (2006) 'Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization', *Experimental and Molecular Pathology*, 81(3), pp. 231–234. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.04.006.

Mueller, O. (2004) 'RNA Integrity Number (RIN)', *Nano*, pp. 1–17.

*Nakazawa, M. S., Keith, B. and Simon, M. C. (2016) 'Oxygen availability and metabolic adaptations', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 663–673. doi: 10.1038/nrc.2016.84.

Nayak, S. *et al.* (2012) 'VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 48(3), pp. 233–239. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.10.003.

O-charoenrat, P., Rhys-Evans, P. H. and Eccles, S. A. (2001) 'Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck', *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 127(7), pp. 813–820.

Ogawa, K. *et al.* (2019) 'Aspartate β-hydroxylase promotes pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis through activation of SRC signaling pathway', *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s13045-019-0837-z.

Papandreou, I. *et al.* (2006) 'HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption', *Cell Metabolism*, 3(3), pp. 187–197. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.012.

Park, J. T. *et al.* (2006) 'Notch3 gene amplification in ovarian cancer', *Cancer Research*, 66(12), pp. 6312–6318. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3610.

Park, J. W. *et al.* (2014) 'Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 113(3), pp. 337–344. doi: 10.1016/j.radonc.2014.08.026.

Peridis, S. *et al.* (2011) 'Carbonic anhydrase-9 expression in head and neck cancer: A meta-analysis', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268(5), pp. 661–670. doi: 10.1007/s00405-011-1488-z.

Petry, K. U. (2014) 'HPV and cervical cancer', *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(SUPPL. 244), pp. 59–62. doi: 10.3109/00365513.2014.936683.

Pokrývková, B. *et al.* (2020) 'P03.26 Immunoprofiling of oral and oropharyngeal tumors of different etiology', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(Suppl 2), p. A33 LP-A33. doi: 10.1136/jitc-2020-ITOC7.64.

Pokrývková, B. *et al.* (2021) 'Arg1 mrna level is a promising prognostic marker in head and neck squamous cell carcinomas', *Diagnostics*, 11(4), pp. 1–15. doi: 10.3390/diagnostics11040628.

Ren, S. *et al.* (2020) 'HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers', *Oncogene*. Springer US, 39(40), pp. 6327–6339. doi: 10.1038/s41388-020-01431-8.

Rotnáglová, E. *et al.* (2011) 'HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers', *International Journal of Cancer*, 129(1), pp. 101–110. doi: 10.1002/ijc.25889.

Rudlowski, C. *et al.* (2003) 'GLUT1 Messenger RNA and Protein Induction Relates to the Malignant Transformation of Cervical Cancer', *American Journal of Clinical Pathology*, 120(5), pp. 691–698. doi: 10.1309/4KYNQM5862JW2GD7.

Ruokolainen, H., Pääkkö, P. and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2004) 'Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Potential Marker for Prognosis', *Clinical Cancer Research*, 10(9), pp. 3110–3116. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0530.

Scheffner, M. *et al.* (1990) 'The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53', *Cell*, 63(6), pp. 1129–1136. doi: 10.1016/0092-8674(90)90409-8.

Seiwert, T. Y. and Cohen, E. E. W. (2008) 'Targeting Angiogenesis in Head and Neck Cancer', *Seminars in Oncology*, 35(3), pp. 274–285. doi: 10.1053/j.seminoncol.2008.03.005.

*Semenza, G. L. (2000) 'HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia', *Journal of Applied Physiology*, pp. 1474–1480. doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.

Shi, D. *et al.* (2012) 'Nicotine Promotes Proliferation of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating α7AChR, ERK, HIF-1α and VEGF/PEDF Signaling', *PLoS ONE*, 7(8), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0043898.

Smeets, S. J. *et al.* (2007) 'A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen', *International Journal of Cancer*, 121(11), pp. 2465–2472. doi: 10.1002/ijc.22980.

Sonoshita, M. *et al.* (2011) 'Suppression of colon cancer metastasis by aes through inhibition of notch signaling', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 19(1), pp. 125–137. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.008.

*Sørensen, B. S. and Horsman, M. R. (2020) 'Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways', *Frontiers in Oncology*, 10(April), pp. 1–11. doi: 10.3389/fonc.2020.00562.

*Sritippho, T., Chotjumlong, P. and Iamaroon, A. (2015) 'Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(15), pp. 6193–6200. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.15.6193.

Stephen, J. K. *et al.* (2013) 'Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.', *Cancer and clinical oncology*, 2(1), pp. 51–61. doi: 10.5539/cco.v2n1p51.

Stubenrauch, F. and Laimins, L. A. (1999) 'Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases', *Seminars in Cancer Biology*, 9(6), pp. 379–386. doi: 10.1006/scbi.1999.0141.

Sturla, L. M. *et al.* (2016) 'Aspartate-β-hydroxylase (ASPH): A potential therapeutic target in human malignant gliomas', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 2(12), pp. 1–31. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00203.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.

*Szablewski, L. (2013) 'Expression of glucose transporters in cancers', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V., 1835(2), pp. 164–169. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.12.004.

Tachezy, R. *et al.* (2009) 'Demographic and Risk Factors in Patients With Head and Neck Tumors', *Journal of Medical Virology 81:878–887*. doi: 10.1002/jmv.

Tawk, B. *et al.* (2016) 'Comparative analysis of transcriptomics based hypoxia signatures in head- and neck squamous cell carcinoma', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 118(2), pp. 350–358. doi: 10.1016/j.radonc.2015.11.027.

Tian, H., McKnight, S. L. and Russell, D. W. (1997) 'Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells', *Genes and Development*, 11(1), pp. 72–82. doi: 10.1101/gad.11.1.72.

Toustrup, K. *et al.* (2011) 'Development of a hypoxia gene expression classifier with predictive impact for hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 71(17), pp. 5923–5931. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1182.

Vaupel, P. (2008) 'Hypoxia and Aggressive Tumor Phenotype: Implications for Therapy and Prognosis', *The Oncologist*. Alphamed Press, 13(S3), pp. 21–26. doi: 10.1634/theoncologist.13-s3-21.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995) 'Purification and characterization of hypoxia-inducible factor', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 270(3), pp. 1230–1237. doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.

*Weaver, A. M. (2006) 'Invadopodia: Specialized cell structures for cancer invasion', *Clinical and*

Experimental Metastasis, 23(2), pp. 97–105. doi: 10.1007/s10585-006-9014-1.

Weaver, A. N. *et al.* (2015) 'DNA double strand break repair defect and sensitivity to poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibition in human papillomavirus 16-positive head and neck squamous cell carcinoma', *Oncotarget*, 6(29), pp. 26995–27007. doi: 10.18632/oncotarget.4863.

Wharton, K. A. *et al.* (1985) 'Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats', *Cell*, 43(3 PART 2), pp. 567–581. doi: 10.1016/0092-8674(85)90229-6.

Wu, Y. *et al.* (2010) 'Clinicopathologic significance of HIF-1α, CXCR4, and VEGF expression in colon cancer', *Clinical and Developmental Immunology*, 2010. doi: 10.1155/2010/537531.

Wykoff, C. C. *et al.* (2000) 'Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases', *Cancer Research*, 60(24), pp. 7075–7083.

Wynder, Bross and Feldman (1957) 'A study of the etiological factors in cancer of the mouth', pp. 1127–1133.

Wyss, A. *et al.* (2013) 'Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium', *American Journal of Epidemiology*, 178(5), pp. 679–690. doi: 10.1093/aje/kwt029.

Yao, W. F., Liu, J. W. and Huang, D. S. (2018) 'Mir-200a inhibits cell proliferation and emt by down-regulating the asph expression levels and affecting erk and pi3k/akt pathways in human hepatoma cells', *American Journal of Translational Research*, 10(4), pp. 1117–1130.

Zavadil, J. *et al.* (2004) 'Integration of TGF-β/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition', *EMBO Journal*, 23(5), pp. 1155–1165. doi: 10.1038/sj.emboj.7600069.

Zeng, Q. *et al.* (2005) 'Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling', *Cancer Cell*, 8(1), pp. 13–23. doi: 10.1016/j.ccr.2005.06.004.

Zhang, P. *et al.* (2014) 'Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia', *Cell Reports*. The Authors, 6(6), pp. 1110–1121. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.011.

Zhou, J. Y. *et al.* (2013) 'Long-Term Binge and Escalating Ethanol Exposure Causes Necroinflammation and Fibrosis in Rat Liver', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(2), pp. 213–222. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01936.x.

Zou, Q. *et al.* (2018) 'Hydroxylase Activity of ASPH Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis Through Epithelial-to-Mesenchymal Transition Pathway', *EBioMedicine*. Elsevier B.V., 31, pp. 287–298. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.004.