
**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



Změny v metylaci DNA u pacientek s ovariálním karcinomem

Marcela Chmelařová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Klinická biochemie

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Marcela Chmelařová
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
LF UK a FN v Hradci Králové

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
LF UK a FN v Hradci Králové

Oponenti: prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.
Katedra radiobiologie
Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Univerzita obrany

doc. MUDr. Jiří Bouda, Ph.D.
Gynekologicko-porodnická klinika
LF UK a FN Plzeň

Tato práce vznikla za podpory grantů:
MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906)
SVV-264902
Vnitřní soutěž Lékařské fakulty v Hradci Králové
PRVOUK 37/11

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c
Předseda komise pro obhajobu disertačních prací
v doktorském studijním programu Klinická biochemie

Obsah

1. Souhrn	4
2. Summary	5
3. Úvod do problematiky	6
3.1 Ovariální karcinom	6
3.2 Epigenetické změny doprovázející nádorová onemocnění	6
3.3 Odchytky v metylaci DNA u ovariálního karcinomu	7
3.4 Možnosti sledování změn v metylaci DNA	8
3.4.1 Metody založené na modifikaci DNA hydrogensířičitanem	9
3.4.2 Využití restričních enzymů	10
3.4.3 MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	10
3.4.4 Mikročipy	11
3.4.5 Imunoprecipitační metody	11
4. Cíle disertační práce	11
5. Experimentální část	12
5.1 Soubor vzorků	12
5.2 Izolace a měření koncentrace DNA	12
5.3 Hydrogensířičitanová přeměna	12
5.4 Metylačně specifická PCR pro gen TP53	12
5.5 Metylačně specifická PCR pro gen GATA4	13
5.6 MS-MLPA (Methylation-specific Multiplex ligation-dependent probe amplification)	13
5.7 Statistické zpracování dat	14
6. Výsledky	15
6.1 Metylace genu TP53 u ovariálního karcinomu	15
6.2 Metylace GATA4 genu u ovariálního karcinomu	15
6.3 MS-MLPA kit ME002	15
6.4 MS-MLPA kit ME004	16
7. Diskuze	17
8. Závěr	22
9. Dosažení cílů	22
10. Použitá literatura	23
11. Přehled přednáškové a publikační činnosti	29
11.1 Původní vědecké práce s impakt faktorem	29
11.2 Publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech	29
11.3 Původní vědecké práce přijaté k publikaci v časopise s impakt faktorem	29
11.4 Původní vědecké práce v recenzním řízení	29
11.5 Posterová sdělení na mezinárodních konferencích	30
11.6 Odborné přednášky	30

1. Souhrn

V naší práci jsme se zabývali studiem změn v metylaci DNA u ovariálního karcinomu. Vzhledem k agresivitě tohoto onemocnění je velice důležité podrobně zmapovat molekulárně biologické parametry včetně těch epigenetických, jež by později mohly být využity jak v diagnostice, tak léčbě ovariálního karcinomu. Nejprve jsme se zaměřili na zavedení a zoptimalizování technik vhodných pro analýzu metylace DNA izolované z parafínových bločků. Dalším krokem byla analýza vybraných CpG míst především tumor supresorových genů.

Tkáňové vzorky ovariálních adenokarcinomů a normální ovariální tkáň fixované formalínem, zalité parafínem byly získány od 109 žen (69 pacientek s ovariálním karcinomem, 40 pacientek s nenádorovými ovárii) léčených na Porodnické a gynekologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky nenádorových ovárií byly získány od pacientek operovaných pro nemaligní diagnózu. DNA byla izolována použitím Qiagen DNA extrakčního kitu.

Zavedli a zoptimalizovali jsme dvě metodiky – MSP (metylačně specifickou PCR) a MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Zjistili jsme, že pro analýzu metylace málo kvalitní DNA izolované z parafínových bločků je vhodnější MS-MLPA než MSP. Tato skutečnost je dána především tím, že MS-MLPA nevyžaduje poměrně agresivní hydrogensířičitanovou přeměnu.

Pomocí MSP pro gen TP53 a GATA4 se nám podařilo odhalit statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledovaných CpG oblastí genu TP53 a GATA4 u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s nenádorovou ovariální tkání. Přítomnost metylace ve sledované oblasti GATA4 genu byla statisticky významně vyšší u endometroidního typu v porovnání se serózním typem ovariálního karcinomu.

Další částí studie bylo vyšetření metylačního profilu vybraných genů pomocí MS-MLPA. Pro tuto studii jsme zvolili k analýze dva kity dodávané firmou MRC-Holland a analyzovali jsme pomocí nich 47 tumor supresorových genů. Statisticky významně vyšší frekvenci metylace jsme pozorovali u genů MGMTa, PAX5, CDH13, WT1, THBS1, GATA5, NTRK1, GATA4 a WIF1 u nádorové skupiny vzorků v porovnání s nenádorovou skupinou, zatímco u ESR1 genu jsme pozorovali významně vyšší frekvenci metylaci v kontrolní skupině ve srovnání s nádorovou skupinou. Frekvence metylace jednotlivých CpG míst významně korelovala s klinicko-patologickými charakteristikami, jako je stádium, grading a histologický typ nádoru ovárií.

Tato pozorování potvrzují důležitost metylace DNA u ovariálního karcinomu. Vzhledem k tomu, že změny v metylaci DNA jsou často pozorovány jako jedny z prvních změn doprovázejících karcinogenezi, mohly by být využity jako markery časných stádií či dokonce prekancerózních stavů. Výše uvedené epigenetické charakteristiky mohou mít v budoucnu své využití v programu screeningu ovariálního karcinomu, terapeutickém přístupu a individualizaci léčby zejména u platina rezistentních nádorů ovárií.

2. Summary

DNA methylation changes in ovarian cancer patients.

In our work we studied DNA methylation changes in ovarian cancer. Due to the aggressive nature of this disease, it is very important to obtain detailed mapping of molecular parameters including epigenetics. These parameters could potentially be used in the diagnostics and treatment of ovarian cancer. To begin with, we focused on establishing and optimizing techniques which are suitable for methylation analysis of DNA isolated from paraffin blocks. The next step was to analyze selected CpG loci primarily of tumor suppressor genes.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from both ovarian adenocarcinomas and normal ovarian tissue were obtained from 109 women (69 patients with ovarian cancer, 40 patients with normal ovary) treated at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Hradec Kralove. The samples of normal ovary were obtained from patients surgically treated for non-malignant diagnosis. DNA was extracted using a Qiagen DNA extraction kit.

We established and optimized two techniques – MSP (Methylation specific PCR) and MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). We discovered that for methylation analysis of poor quality DNA isolated from paraffin blocks MS-MLPA is more suitable than MSP. This is because MS-MLPA analysis does not require aggressive bisulphite conversion.

Using MSP for TP53 and GATA4 we demonstrated statistically-significant higher promoter methylation in analysed CpG loci of TP53 and GATA4 genes in ovarian cancer patients than in the control group. GATA4 showed statistically-significant higher methylation in the endometrioid tumor type compared with the serous histological type of ovarian carcinoma.

The next part of our study was to investigate the methylation profile of selected genes using MS-MLPA. For analysis in this study we selected two sets from the company MRC-Holland. Using these sets we analysed 47 tumor suppressor genes. We observed significantly higher methylation in genes MGMTa, PAX5, CDH13, WT1, THBS1, GATA5, NTKR1, GATA4 and WIF1 in the ovarian cancer group compared with the control group, while in the ESR1 gene we observed significantly higher methylation in the control group compared with the ovarian cancer group. The methylation frequency of each CpG locus significantly correlated with clinicopathological characteristics including tumor stage, histological grade and histological type of ovarian cancer.

These findings confirm the importance of DNA methylation in ovarian cancer. Since DNA methylation changes are often observed as one of the first changes in carcinogenesis, they could be potentially used as early-stage markers. In the future these epigenetic characteristics could be used in a screening programme for ovarian cancer and treatment, and in individualization of therapy especially in platinum-resistant ovarian cancer.

3. Úvod do problematiky

Nádorová onemocnění představují jednu z nejčastějších příčin úmrtí jak v České republice, tak v celosvětovém měřítku. Znalost molekulárně biologických vlastností nádorové tkáně, včetně epigenetických, hraje důležitou roli zejména v moderní diagnostice a léčbě nádorových onemocnění.

Pro efektivní léčbu nádorových onemocnění je nezbytná časná a přesná diagnóza s možností optimalizace terapie a minimalizace nežádoucích účinků, což platí pro ovariální karcinom dvojnásob. Časná diagnóza tohoto nádorového onemocnění spolu s individualizovanou terapií mohou snížit úmrtnost a zlepšit perspektivu a kvalitu života pacientek. Užití molekulárně biologických technik, včetně analýzy metylací DNA se stává v tomto směru stále důležitějším nástrojem nejen v základním výzkumu, ale i v rozhodování o vhodné terapii.

3.1 Ovariální karcinom

Ovariální karcinom je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí pacientek s gynekologickými zhoubnými nádory. Je zastoupen 5% mezi všemi nádory u žen, ze zhoubných nádorů reprodukčních orgánů tvoří 23% (Cibula, D. et al., 2009). V roce 2010 bylo v ČR diagnostikováno 1107 karcinomů vaječníků, tj. 20,64 případů na 100 tisíc žen. V roce 2010 byl karcinom vaječníků v ČR příčinou 675 úmrtí (www.svod.cz). Přestože byla léčbě zhoubných nádorů ovária věnována velká pozornost, výsledky přežití pacientek se za posledních 20 let zlepšily pouze minimálně, a to spíše v důsledku centralizace do center. Medián výskytu epiteliálního ovariálního karcinomu je kolem 60-64 let. Incidence výrazně narůstá s věkem. Významně vyšší incidence ovariálního karcinomu především v mladších věkových skupinách je asociována s hereditárními syndromy: mutace genu BRCA1 a 2 a Lynchův syndrom. Očekává se, že během následující 10-ti let incidence karcinomu ovária výrazně klesne v důsledku užívání hormonální antikoncepce (Cibula, D. et al., 2009).

Vzhledem ke špatným výsledkům léčby pokročilých stádií je velká pozornost věnována zejména možnostem časného zachycení ovariálního karcinomu. Diskutovaný je populační screening a screening familiárního ovariálního karcinomu. Populační screening je v současné době považován za náročný, drahý a málo efektivní, především v důsledku relativně nízké incidence onemocnění v populaci a nejednoznačným výsledkům rozsáhlých publikovaných studií. Aktuálně je doporučován screening ovariálního karcinomu provádět u žen ve vysokém riziku (zejm. vrozené mutace v BRCA1 a BRCA2) pomocí transvaginální sonografie (TVS) a sérového nádorového antigenu CA-125.

V posledních letech je velký důraz kladen na nalezení nových tumorových markerů pro časnou detekci ovariálního karcinomu. Kromě již zmiňovaného sérového nádorového antigenu CA-125 se ukazuje, že by mohl být využíván například HE-4 (Human epididymis protein 4) a to zejména v kombinaci s CA-125 (Moore, RG. et al., 2009). Z dalších nádorových markerů můžeme uvést LPA (Lysophosphatic acid), M-CSF (Macrofage colony stimulating factor), prostatin, osteopontin, inhibin a kallikrein (Jacobs, IJ. and Menon, U., 2004).

3.2 Epigenetické změny doprovázející nádorová onemocnění

V procesu karcinogeneze často dochází k epigenetickým změnám. Takovéto změny jsou definovány jako dědičné změny v genové expresi, které však mohou být reverzibilní a nedochází při nich ke změnám kódujících sekvencí bazí v polynukleotidovém řetězci DNA. Dochází tedy k pozměnění fenotypu, aniž by při tom došlo ke změnám v genotypu.

Epigenetické změny zahrnují metylaci DNA, modifikaci histonů, přestavbu chromatinu a posttranskripční genovou regulaci pomocí miRNA. Epigenetické změny mohou být indukovány jak genetickými faktory, tak vlivem prostředí.

Nejčastější epigenetickou alterací je metylace DNA. Při metylaci dochází k vazbě metylové skupiny na 5' uhlík cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu. Děje se tak přenosem metylu z S-adenosyl-methioninu na C5 pozici cytosinu v dinukleotidovém kontextu CpG. DNA metylace hraje nepostradatelnou roli v kontrole genové aktivity a je důležitá pro architekturu buněčného jádra (*Esteller, M., 2008*), podílí se na regulaci transkripce, stabilitě chromozomů, genomickém imprintingu a inaktivaci X- chromozomu (*Bird, A., 2002*), dále má důležitou roli ve vývoji a chrání genom před transpozóny.

Při maligní transformaci dochází k celkové hypometylaci DNA a k hypermetylaci CpG ostrůvků v promotorových oblastech genů (*Barton, CA. et al., 2008*). Ztráta metylace je způsobena hlavně hypometylací opakujících se sekvencí DNA a demetylací kódujících regionů a intronů (*Esteller, M., 2008*). Hypermetylace CpG ostrůvků v místě genového promotoru je častým mechanismem inaktivace tumor supresorových genů. Jedná se tedy o určitou hypotézu onkogenetické transformace (*Herman, JG. and Baylin, SB., 2003*). Inaktivace tumor supresorových genů může být kromě hypermetylace způsobena také mutací či delecí.

Nejzajímavější vyhlídky pro onkology představuje potenciální reverzibilita epigenetických změn a využití alterací v metylaci DNA k predikci senzitivity různých nádorů k chemoterapeutikům. Nejpersvědčivějším důkazem je hypermetylace MGMT u gliomů. Hypermetylace MGMT je významným nezávislým ukazatelem odpovědi na temozolomid u gliomů (*Hegi, ME. et al., 2005*). Jiným příkladem genu, jehož metylace je asociována s rezistencí je DNA mismatch repair gene MLH1. Ztráta MLH1 je asociována se zvýšenou rezistencí k derivátům platiny in vitro (*Strathdee, G. et al., 1999, Zeller, C. et al., 2012*). V současné době rozsáhlý výzkum zabývající se epigenetickými alteracemi podporuje hypotézu, že získaná rezistence k chemoterapeutikům je důsledkem akumulace epigenetických změn. Terapie založená na epigenetických změnách může tedy zahrnovat zejména demetylační činidla, inhibitory HDAC a miRNA.

3.3 Odchytky v metylaci DNA u ovariálního karcinomu

Podobně, jako je tomu u ostatních nádorových onemocnění, dochází i u ovariálního karcinomu ve srovnání s normální zdravou ovariální tkání k celkové hypometylaci heterochromatinu a k lokální hypermetylaci CpG ostrůvků (*Barton, CA. et al., 2008*).

V současné době již byla v některých případech ovariálního karcinomu prokázána významná hypermetylace genů nepostradatelných při odpovědi buňky na poškození DNA, genů podílejících se na opravě DNA, regulaci proliferace a apoptózy. U některých genů je dokonce hypermetylace spojena se sníženou expresí těchto genů.

Jedním z nejvíce studovaných genů v souvislosti s ovariálním karcinomem je BRCA1 (breast cancer susceptibility gen 1), a to hlavně díky jeho známé roli v dědičných formách ovariálního karcinomu. Hypermetylace BRCA 1 promotoru se vyskytuje u ovariálního karcinomu a karcinomu prsu (*Esteller, M. et al., 2000*) a je spojována se snížením exprese BRCA1 (*Chan, KY. et al., 2002*). Využití sledování promotoru BRCA1 se ukazuje jako užitečné v predikci odpovědi na chemoterapii, přičemž vyšší metylační index je asociován s primární chemosenzitivitou (*Chaudhry, P. et al., 2009*). Naproti tomu hypermetylace promotoru BRCA2 se u ovariálního karcinomu nachází poměrně zřídka (*Gras, E. et al., 2001*). Hypermetylace promotoru BRCA1 je možné prokázat v séru či plazmě pacientů (*Ibanez de Caceres, I. et al., 2004*), v čemž lze vidět potenciál pro neinvazivní screeningovou

metodu. Dalším genem, jehož metylace se vyskytuje v séru pacientek s ovariálním karcinomem a koreluje s metylací primárního tumoru je DAPK (Collins, Y. et al., 2006).

Metylace některých genů u ovariálního karcinomu je studována v souvislosti s rezistencí k chemoterapeutikům. Změna metylačního profilu je asociována se zvýšenou aktivitou DNMTs. Významná upregulace DNMTs byla pozorována u získané rezistence k cisplatině u ovariálního karcinomu (Balch, C. et al., 2009). Konkrétně můžeme zmínit gen MLH1, jehož metylace se vyskytuje u ovariálního karcinomu rezistentního k cisplatině (Gifford, G. et al., 2004). Gen DAPK, který je zapojen do procesu apoptózy, je také metylován u rezistentních nádorů ovárií (Collins, Y. et al., 2006). Hypermetylace beta-tubulinu třídy III TUBB3 je spojován s rezistencí k taxanu (Izutsu, N. et al., 2008) a hypermetylace MCJ (methylation-controlled DNAJ gene) je asociována s chemorezistencí všeobecně (Barton, CA. et al., 2008). Dále snížení exprese SFRP5 v důsledku hypermetylace je spojeno s chemorezistencí ovariálního karcinomu (Su, HY. et al., 2010). Předpokládá se, že reaktivace metylací umlčených genů může senzitivizovat apoptické cesty vyvolané chemoterapií. Toto tvrzení podporuje výzkum sledující epigenetickou regulaci HSulf-1, gen související s inhibicí růstu a angiogeneze. Ukazuje se, že kombinovaná terapie zahrnující demetylační činidla a inhibitory HDAC v kombinaci s klasickými angioneoplastickými léky jako je karboplatina a taxol může být prospěšná u pacientů, kteří mají nedostatečnou expresi HSulf-1 způsobenou epigenetickými alteracemi (Staub, J. et al., 2007). RASSF1A a hMLH1 upregulace způsobená decitabinem a zebulerinem (DNMTs inhibitory) přispívá k resenzitivizaci u k cisplatině rezistentních ovariálních nádorových buněk (Balch, C. et al., 2005).

Metylační profil u ovariálního karcinomu je často spojován s molekulárními, klinickými a patologickými charakteristikami. Například změna v metylaci promotorové oblasti 14-3-3 sigma, TMS1 a WT1 je častější u světlobuněčného typu ovariálního karcinomu než u ostatních histologických typů. Metylační profil může být také rozdílný mezi ovariálním karcinomem s nízkým maligním potenciálem a invazivním ovariálním karcinomem. Například RASSF1, APC, GSTP1 a MGMT ukazují alterace v metylaci výhradně u invazivního ovariálního karcinomu (Asadollahi, R. et al., 2010). Jiné studie ukazují, že hypermetylace FBXO2 a CYP39A1 koreluje s prognózou pacientek s ovariálním karcinomem. Hypermetylace FBXO2 asociována s kratším přežitím (Chou, JL. et al., 2010) a hypermetylace CYP39A1 je spojována se zvýšeným rizikem relapsu (Huang, YW. et al., 2009).

U ovariálního karcinomu jako u ostatních nádorových onemocnění dochází kromě časté hypermetylace CpG ostrůvků v místě genového promotoru k celkové hypometylaci genomu. Celková hypometylace DNA zvyšuje malignitu ovariálních nádorů. Existují ovšem pouze limitovaná data o specifických změnách genové aktivace způsobené hypometylací u ovariálního karcinomu. Zdá se, že demetylace je v tomto případě důležitá v abnormální overexpresi mapsinu, synucleinu- γ a claudinu 4 (Barton, CA. et al., 2008).

3.4 Možnosti sledování změn v metylaci DNA

Sledování změn v metylaci DNA má několik výhod. Za prvé analýza metylace využívá DNA, která je chemicky stabilnější než RNA nebo proteiny. Druhou výhodou je poměrně jednoduché vyhodnocení, kdy přítomnost metylace může naznačovat přítomnost maligních buněk. Je pravděpodobné, že v budoucnosti budou DNA metylační analýzy prováděny stále častěji, jelikož další výhodou je jejich omezení na limitované regiony DNA (CpG ostrůvky) a relativně nízká cena analýzy.

Ve vazbě s tkáňovou analýzou byla metylovaná DNA nalezena také v plazmě, séru a peritoneální tekutině pacientek s ovariálním karcinomem (Ibanez de Caceres, I. et al., 2004), tato metylovaná DNA dobře koreluje s metylačním stupněm nádorové tkáně (Ibanez de

Caceres, I. et al, 2004), předpokládá se tedy, že zdrojem metylované DNA v séru jsou nekrotické nádorové buňky (*Balch, C. et al., 2009*). Jedná se tak o potenciální neinvazivní zdroj hodnocení karcinogeneze.

Změny v metylaci jsou často pozorovány jako jedny z prvních změn doprovázející karcinogenezi, proto by mohly být využity jako markery časných stádií či dokonce prekancerózních stavů. Včasná diagnostika je totiž základem úspěšné léčby, což platí pro ovariální karcinom dvojnásob, jelikož naprostá většina nádorů ovárií je diagnostikována v pokročilých stádiích nemoci. Prozatím prvním a jediným klinicky používaným screeningovým testem (u solidních nádorů) založeným na sledování metylace v krevní plazmě pacientů je SEPT9 metylace u kolorektálního karcinomu. Kity pro sledování metylace SEPT9 jsou dostupné dokonce od dvou komerčních firem (Epigenomics a Abbot) (*Heichman, KA. and Warren, JD., 2012*). Nedávná publikace, Warren et al. (2011) ukazuje dokonce senzitivitu detekce metylace SEPT9 u kolorektálního karcinomu 90% a specifitu 88%.

V současné době známe několik genově specifických metod, které mohou být využity k monitorování změn v metylaci DNA. Při výběru metody záleží zejména na cíli studie. Důležité je, zda sledujeme celkovou hypermetylací DNA, kde je metodou první volby HPLC (high-performance liquid chromatography) nebo pouze metylaci určitých částí DNA. V následující části teoretického úvodu je kladen důraz na monitorování změn v metylaci v oblasti CpG ostrůvků.

3.4.1 Metody založené na modifikaci DNA hydrogensířičitanem

U metod založených na modifikaci DNA hydrogensířičitanem (bisulfite conversion) je prvním krokem chemická přeměna analyzované DNA. Při modifikaci dochází k přeměně cytosinu na uracyl pomocí hydrogensířičitanu sodného na jednovlákné DNA. Dochází k záměně všech cytosinů na uracyly, pouze metylované cytosiny (5-metylcytosin) jsou k záměně rezistentní a zůstávají jako cytosiny (*Herman, JE. et al., 1996*).

Modifikace DNA hydrogensířičitanem je poměrně levná a jednoduchá, nevýhodou je ovšem časté poškození DNA, které se projeví zejména u málo kvalitní DNA izolované z parafinových bločků.

Metylačně specifická PCR (MSP)

MSP je specifickou a senzitivní metodou využívanou zejména ke sledování abnormálních metylací ve vybraných genových sekvencích, zejména CpG ostrůvcích (*Herman, JE. et al., 1996*). U MSP hydrogensířičitanovou modifikaci následuje amplifikace pomocí primerů specifických pro metylovanou a nemetylovanou DNA. Její nespornou výhodou je proveditelnost při nízkých koncentracích DNA a relativně nízká cena. Nevýhodou této metody je ovšem falešná pozitivita některých výsledků.

Sekvenování

Sekvenování DNA („čtení“ DNA) je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA. U metylační analýzy je jednou z největších předností sekvenování amplifikovaných produktů cenná kontrola hydrogensířičitanové přeměny.

V posledních letech začíná mít své zastoupení Next-Generation sekvenování (NGS). V současnosti známe 5 komerčně dostupných NGS platform. NGS platformy sdílejí společné technologické znaky – masivní paralelní sekvenování klonálně amplifikovaných nebo jednotlivých DNA molekul, které jsou prostorově separované v průtokových celách. Mezi

nejznámější platformy můžeme zařadit technologii 454 od firmy Roche, která je založena na pyrosekvenaci a emulzní PCR. Dále pak Solexa od firmy Illumina a Solid od firmy Applied Biosystems.

MS- HRM (Methylation Sensitive High-Resolution Melting Analysis)

HRM je metoda založená na změnách teploty tání DNA v roztoku. HRM je realizována postupným zahříváním dvouvlákného amplikonu DNA z přibližně 50°C na 95°C. V určitém bodě tohoto procesu je dosaženo teploty tání amplikonu a dvě vlákna DNA se od sebe oddělí.

Principem MS-HRM je, že DNA ovlivněná hydrogensířičitanem má v případě metylovaného templátu více cytosinů, než DNA, která byla původně nemetylovaná (cytosiny se při modifikaci přeměnily na uracyly), proto se změní i křivka teploty tání takovéto DNA. PCR produkty pocházející z templátu, který byl původně nemetylovaný budou mít nižší bod tání než ty, které pocházejí z metylovaného templátu. HRM nabízí také možnost určení podílu metylace v daném vzorku porovnáním s kalibrační křivkou, která vzniká mícháním různých poměrů univerzálně metylované a nemetylované DNA dohromady. Při analýze je porovnávána teplota tání univerzálně metylované a nemetylované DNA s vyšetřovaným vzorkem.

HRM je senzitivní a specifická (Wojdacz, TK. and Dobrovic, A., 2007), relativně jednoduchá a levná metoda. Předností této metody je analýza všech CpG ostrůvků amplikonu.

3.4.2 Využití restrikčních enzymů

Metylačně-specifické restrikční endonukleázy jsou enzymy specificky využívané k DNA metylační analýze. Většina z nich je inhibována metylací jejich rozpoznávacího místa, kde specificky štěpí DNA.

Vystavíme-li sledovanou DNA působení restrikčních endonukleáz, dojde v případě, kdy není metylována, k jejímu rozštěpení. Následně můžeme takto naštěpenou DNA analyzovat pomocí elektroforézy a Southern blotu. Southern blot byl použit jako jedna z prvních metod pro analýzu metylace DNA. Použijeme-li po naštěpení DNA PCR reakci, bude vznikat PCR produkt pouze v případě, kdy DNA je metylována (nedochází k rozštěpení). Využití kombinace restrikční endonukleázy s PCR se jeví jako senzitivnější metoda, než Southern blot.

Využití restrikčních enzymů, které rozpoznávají metylované sekvence od nemetylovaných může být aplikováno pouze u sekvencí, které obsahují jejich rozpoznávací místa, v čemž lze vidět určitou limitaci této metody ve srovnání s metodami využívajícími modifikaci DNA hydrogensířičitanem.

3.4.3 MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MS-MLPA je v současné době široce používaná metoda pro detekci epigenetických změn. Jedná se o semikvantitativní metodu zaměřenou na sledování změn v metylaci DNA. MS-MLPA je velmi podobná klasické MLPA, kdy ligace probe je kombinována se štěpením komplexu DNA-proba metylačně specifickou endonukleázou (Nygren AO. et al., 2005). Nejčastěji využívaným restrikčním enzymem je *HhaI*, tento enzym rozpoznává a specificky štěpí pouze nemetylovanou DNA sekvenci GCGC.

3.4.4 Mikročipy

Mikročipy jsou používány jak k celkové analýze DNA, tak k detekci metylace v promotorových oblastech genů. Principem mikročipů je imobilizace fragmentů jednovlákné DNA na pozitivně nabitě nylonové membráně a hybridizace za vhodných podmínek. Hybridizační signály jsou nejčastěji detekovány s využitím chemiluminiscence.

Mikročipy jsou komerčně připravované a poskytované různými firmami jako například Illumina, NimbleGen, Agilent a Affymetrix. DNA sondy, nebo prvky, které tvoří čip, jsou klíčovým faktorem při výběru nejvhodnější platformy k řešení dané otázky. Některé biočipy jako například od firmy Illumina jsou navrhované pro analýzu DNA po hydrogensířičitanové modifikaci, některé se hodí pro analýzu po DNA restrikci a některé jako například microarrays od firmy Agilent jsou vhodné pro analýzu imunoprecipitované DNA.

3.4.5 Imunoprecipitační metody

Imunoprecipitační metodiky umožňují izolovat metylovanou DNA, což usnadní následnou analýzu. Principem imunoprecipitačních metod je imobilizace denaturované DNA na DEAE (diethylaminoethyl) membráně a následná inkubace s monoklonální protilátkou.

Imunoprecipitace metylované DNA je běžně dosažena použitím jedné ze dvou metod: izolace DNA metylovaných fragmentů pomocí monoklonální protilátky specifické k 5-metylcytosinu (anti-5mC) nebo izolace DNA fragmentů obsahujících metylované CpG dinukleotidy za použití proteinu vázajícího metyl doménu (MBD protein - methyl binding domain protein) (*Thu, KL. et al., 2010*). Imunoprecipitovaná DNA může být následně analyzována různými výše zmíněnými metodami.

4. Cíle disertační práce

V rámci této práce jsme si stanovili následující cíle:

1. Zavést a zoptimalizovat vybrané metodiky sledující změny v metylaci DNA.
2. Zjistit, které metody jsou vhodné pro analýzu metylace málo kvalitní DNA izolované z parafínových bločků.
3. Zjistit, zda je metylace promotorových oblastí vybraných genů ve tkáních spojena s ovariálním karcinomem.
4. Zjistit, jakým způsobem metylace vybraných genů koreluje s klinicko-patologickými charakteristikami ovariálního karcinomu.

5. Experimentální část

5.1 Soubor vzorků

Tkáňové vzorky ovariálních adenokarcinomů a normální ovariální tkáň fixované formalínem, zalité parafínem byly získány od 109 žen léčených na Porodnické a gynekologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkový počet pacientek s ovariálním karcinomem byl 69 ve věku 21 až 79 let (medián 54 let). Skupina pacientek s nenádorovými ovárii čítala 40 vzorků (medián 57.5 let, věkové rozmezí 40-84 let). Vzorky nenádorových ovárií byly získány od pacientek operovaných pro nemaligní diagnózu (jako sestup dělohy s adnexektomií, leiomyomy dělohy a další). Parafínové bločky byly získány z archivu Fingerlandova ústavu patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Všechny vzorky byly přezkoumány zkušeným patologem a karcinomy klasifikovány dle aktuální WHO klasifikace nádorů ženských pohlavních orgánů (*Tavassoli, FA. a Devilee, P., 2003*). Studie byla schválena etickou komisí FNHK.

5.2 Izolace a měření koncentrace DNA

DNA byla izolována z tkáňových vzorků fixovaných v formalínu, zalitých v parafínu pomocí Qiagen DNA extrakčního kitu (Hilden, Germany) dle protokolu výrobce s minimem úprav. Izolace DNA z tkáňových vzorků fixovaných v formalínu, zalitých v parafínu se skládá z 6-ti základních kroků. Prvním krokem je odstranění parafínu jeho rozpuštěním v xylenu. Dalším krokem je lýza vzorku působením proteinázy K (56 °C, přes noc). Třetím krokem je inkubace při 70°C (10 minut), při níž dochází ke zvrácení formalínem vyvolaného zesíťování. Následuje navázání DNA na membránu a odstranění kontaminujících nečistot. Posledním šestým krokem je eluování DNA z membrány. Měření koncentrace vyizolované DNA bylo provedeno dle protokolu výrobce fluorimetricky (Qubit, Invitrogen) a spektrofotometricky (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Vzhledem k absorpčnímu maximu nukleových kyselin a možných kontaminujících látek (především proteinů) probíhalo spektrofotometrické měření při vlnových délkách 260 a 280 nm..

5.3 Hydrogensířičitanová přeměna

Hydrogensířičitanová přeměna byla provedena pomocí kitu CpGenome DNA modification kit (Chemicon International, Temecula, CA) podle protokolu výrobce s minimem úprav. Stručně, 1µg izolované DNA byl denaturován hydroxidem sodným (0.2M NaOH) po dobu deseti minut při 50°C. Modifikace byla provedena přidáním čerstvě připraveného roztoku hydrogensířičitanu pH 5 (550 µl) k denaturované DNA po dobu 17-19 h při 50°C. Následně byla modifikovaná DNA pročištěna a desulfonována působením NaOH o výsledné koncentraci 0.3M po dobu pěti minut při laboratorní teplotě. Desulfonaci následovalo další pročištění etanolem. DNA byla resuspendována v 25 µl elučním pufru a skladována při -80°C.

5.4 Metylačně specifická PCR pro gen TP53

Protein p53 je vzhledem k vysoké frekvenci mutací u ovariálního karcinomu jedním z nejvíce studovaných genů. Nicméně změny v metylaci promotorové oblasti TP53 doposud nebyly popsány, proto jsme se v naší studii zaměřili na analýzu metylace promotorové oblasti TP53 pomocí MSP.

K MSP byly použity již publikované sekvence primerů (*Amatya, VJ. et al., 2005*). 5'-TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT-3' (sense) a 5'-CCAATCCAAAAAACATATCAC-3' (antisense) pro reakci s nemetylovanou DNA (PCR produkt 247 bp), a 5'-TTCGGTAGGCGGATTATTTG-3' (sense) a 5'-AAATATCCCCGAAACCCAAC-3' (antisense) pro reakci s metylovanou DNA (PCR produkt 193 bp). PCR byla provedena v 25- μ l směsi, obsahující 10x Takara pufr (2.5 μ l), 2.5 mM roztok dNTPs Takara (2.0 μ l), primery (každého 1 μ l 10 pmol/ μ l roztoku), polymerázu Taq HS Takara 5U/ μ l (0.3 μ l) (Takara Bio Europe S.A.S, France), vodu a 2 μ l hydrogensířičitanem modifikované DNA, ve Veriti Thermocykléru (Applied Biosystems, CA). Amplifikační reakce využívala teplotní profil: počáteční denaturace při 95 °C 7 min, 40 cyklů denaturace při 95 °C 45s, annealing při 59 °C 45s, a extenze při 72 °C 60s, zakončeno závěrečnou extenzí 5 min při 72 °C.

CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Chemicon International, Temecula, CA) byla také modifikována pomocí hydrogensířičitanu sodného a byla použita jako kontrola.

Amplifikované produkty byly rozděleny pomocí elektroforézy na 2% agarózovém genu (2,0 g agarózy + 100 ml TBE pufru + 5 μ l ethidium bromidu) při napětí 100 V po dobu 1,5 hod. Produkty byly vizualizovány pod UV zářením.

5.5 Metylačně specifická PCR pro gen GATA4

GATA4 je významným transkripčním faktorem, u něhož je metylace často spojována se sníženou expresí. V naší studii jsme se rozhodli prohloubit analýzu metylace promotorové oblasti GATA4 u ovariálního karcinomu pomocí MSP s nově navrženým setem primerů.

K MSP byly použity sekvence primerů designované pomocí programu MethPrimer. 5'-GGTTAGTTAGTGTTTTAGGGTTGA-3' (sense) a 5'-AACAAAAACAAAAAACTCCAAA-3' (antisense) pro reakci s nemetylovanou DNA (PCR produkt 230 bp), a 5'-GTTAGTTAGCGTTTTAGGGTTCGA-3' (sense) a 5'-CAAAAACGAAAAAACTCCGAA-3' (antisense) pro reakci s metylovanou DNA (PCR produkt 228 bp). PCR byla provedena v 25- μ l směsi, obsahující 10x Takara pufr (2.5 μ l), 2.5 mM roztok dNTPs Takara (2.0 μ l), primery (každého 1 μ l 10 pmol/ μ l roztoku), polymerázu Taq HS Takara 5U/ μ l (0.3 μ l) (Takara Bio Europe S.A.S, France), vodu a 2 μ l hydrogensířičitanem modifikované DNA, v GeneAmp 9700 termocykléru (Applied Biosystems, CA). Jelikož jsme používali nově navržené primery, musela být nejprve provedena optimalizace teploty annelingu, podle které jsme zvolili teplotu annelingu 53,7°C. Amplifikační reakce využívala teplotní profil: počáteční denaturace při 95 °C 5 min, 40 cyklů denaturace při 95 °C 45s, annealing při 53,7 °C 35s, a extenze při 72 °C 35s, zakončeno závěrečnou extenzí 5 min při 72 °C.

CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Chemicon International, Temecula, CA) byla také modifikována pomocí hydrogensířičitanu sodného a byla použita jako kontrola.

Amplifikované produkty byly rozděleny pomocí elektroforézy na 2% agarózovém genu (2,0 g agarózy + 100 ml TBE pufru + 5 μ l ethidium bromidu) při napětí 100 V po dobu 1,5 hod. Produkty byly vizualizovány pod UV zářením.

5.6 MS-MLPA (Methylation-specific Multiplex ligation-dependent probe amplification)

V experimentální práci byly použity dva kity prob SALSA MLPA ME002 Tumour Sup.-2 a SALSA MLPA ME004 Tumour Sup.-4 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), které mohou analyzovat atypickou metylaci u 47 tumor supresorových genů.

Sekvence prob, genová místa a pozice na chromozómu mohou být nalezena na <http://www.mlpa.com>. Jednotlivé geny byly stanoveny pomocí dvou prob, které obsahovaly různá *HhaI* restriční místa. Experimentální postup byl proveden podle protokolu výrobce, s minimem modifikací.

V krátkosti, DNA (100 ng) byla rozpuštěna v 5 μ l TE-pufu (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0), denaturována a následně ochlazena na 25°C. Po přidání směsi prob, byly proby přes noc hybridizovány (16-18 hodin) při 60°C. Následně byly vzorky rozděleny na dva podíly: jedna polovina vzorku byla přímo ligována, zatímco druhá polovina vzorku byla společně s ligázou vystavena působení restriční endonukleázy *HhaI* (30 minut při 49°C). Toto štěpení způsobilo ligaci pouze nenaštěpené (metylované) DNA sekvence. Amplifikační PCR reakce byla provedena ve standardním termocykléru (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) a využívala teplotní profil: 35 cyklů denaturace při 95 °C 30s, annealing při 60 °C 30s a extenze při 72 °C 1 minutu, zakončeno závěrečnou extenzí 20 minut při 72 °C. Alikvoty PCR reakce (0.6 μ l) byly smíchány s 0.2 μ l vnitřního standardu GeneScan™ –500 LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 9.0 μ l formamidu. Po denuraci byly fragmenty separovány a kvantifikovány na ABI3130 kapilárním sekvenátoru a analyzovány pomocí GeneMapper4.0 (oba Applied Biosystems). Plochy píků s odpovídající velikostí párů bází (bp) byly použity pro další zpracování dat. Poměr metylace byl získán následujícím výpočtem: $Dm = (Px / Pctrl) Dig / (Px / Pctrl) Undig$, kde Dm je poměr metylace, Px je plocha píku dané sondy, Pctrl je součet ploch píků všech kontrolních sond, Dig znamená *HhaI* štěpený vzorek a Undig neštěpený vzorek. Dm se může pohybovat od 0 do 1.0 (odpovídá 0% -100% metylované DNA). Na základě předchozích experimentů jsme považovali promotor za metylovaný, pokud $Dm \geq 0.15$ pro kit ME002 (0.2 pro kit ME004), což odpovídá 15% (20%) metylované DNA (Moelans, CB. et al., 2011, Pavicic, W. et al., 2011). Cut-off hodnotu u jednotlivých kitů jsme nastavili zejména v závislosti na analýze kontrolních vzorků ovárií.

CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Chemicon International, Temecula, CA) byly použity v každém běhu jako kontroly.

5.7 Statistické zpracování dat

Charakteristiky byly porovnány pomocí Fischerova přesného testu rozdílu dvou proporcí. Za statisticky signifikantní rozdíly byly považovány asociace, kde p-hodnota byla <0.05 .

6. Výsledky

6.1 Metylace genu TP53 u ovariálního karcinomu

Metylace TP53 genu byla stanovena pomocí MSP s užitím již dříve publikovaných specifických primerů. Pomocí MSP pro gen TP53 se nám podařilo vyšetřit 103 vzorků: 66 vzorků ovariálního karcinomu a 37 kontrolních vzorků. Zbylých 6 vzorků se nám nepodařilo amplifikovat. Pomocí MSP byla zjištěna statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledované CpG oblasti TP53 ($p=0.04$) u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s nenádorovou ovariální tkání. Sledovaná CpG oblast byla metylována u 34 z 66 (51.5%) vzorků ovariálního karcinomu, ale překvapivě i u 11 z 37 (29.7%) vzorků nenádorové ovariální tkáně.

Střední věk (medián) v době diagnózy byl 54 let (rozmezí 21-79 let) u nádorové skupiny pacientek a 57 let (rozmezí 40-84 let) u kontrolní nenádorové skupiny. Stav metylace vzorků ovariálního karcinomu byl porovnán s klinicko-patologickými charakteristikami zahrnujícími věk, histologický typ, stádium a grade nádoru. Nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace mezi metylací sledované oblasti a uvedenými klinicko-patologickými charakteristikami ($p>0.05$).

6.2 Metylace GATA4 genu u ovariálního karcinomu

Metylace GATA4 genu byla stanovena pomocí MSP s užitím nově navržených specifických primerů. Pomocí MSP pro gen GATA4 se nám podařilo vyšetřit 107 vzorků: 67 vzorků ovariálního karcinomu a 40 kontrolních vzorků. Zbylé dva vzorky se nám nepodařilo amplifikovat. Pomocí MSP byla zjištěna statisticky významně vyšší přítomnost metylace sledované CpG oblasti genu GATA4 ($p<0.001$) u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s nenádorovou ovariální tkání. Sledovaná CpG oblast byla metylována u 21 z 67 (31.3%) vzorků ovariálního karcinomu a žádného vzorku nenádorové ovariální tkáně.

Střední věk (medián) v době diagnózy byl 54 let (rozmezí 21-79 let) u nádorové skupiny pacientek a 57.5 let (rozmezí 40-84 let) u kontrolní nenádorové skupiny. Stav metylace vzorků ovariálního karcinomu byl porovnán s klinicko-patologickými charakteristikami zahrnujícími věk, histologický typ, stádium a grade nádoru. Přítomnost metylace ve sledované oblasti GATA4 genu byla statisticky významně vyšší u endometroidního typu v porovnání se serózním typem ovariálního karcinomu.

6.3 MS-MLPA kit ME002

Metylace promotorových oblastí genů s užitím 15% cut-off

MS-MLPA – kit ME002 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) byl použit k analýze 109 vzorků: 69 vzorků ovariálního karcinomu a 40 kontrolních vzorků. S užitím cut-off hodnoty 15% byla prokázána statisticky významně vyšší metylace u genů MGMT ($p=0.05$), PAX5 ($p=0.002$), CDH13 ($p<0.001$), WT1 ($p=0.045$), THBS1 ($p=0.048$), a GATA5 ($p=0.05$) u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s nenádorovou kontrolní skupinou. Naopak, u genu ESR1 byla pozorována signifikantně ($p<0.001$) vyšší četnost přítomnosti metylace v kontrolní skupině vzorků v porovnání se skupinou nádorových vzorků. U genu MSH6 byla pozorována vyšší četnost metylace (okolo 80%) v obou skupinách vzorků. U genů ATM, TP53, PTEN, VLH, GSTP1, RB1, MGMTb a PYCARD metylace nepřekročila 15% hranici.

Porovnání klinicko-patologických charakteristik s četností metylace jednotlivých genů

Střední věk (medián) v době diagnózy byl 54 let (rozmezí 21-79 let) u nádorové skupiny pacientek a 57.5 let (rozmezí 40-84 let) u kontrolní nenádorové skupiny. Stav metylace jednotlivých genů u vzorků ovariálního karcinomu byl porovnán s klinicko-patologickými charakteristikami zahrnujícími věk, histologický typ, stádium a grade nádoru (Tabulka 9).

U Genů MGMTa, PAX5, CDH13, THSB1 a GATA5 byla pozorována signifikantně ($p < 0.05$) vyšší četnost metylace u endometroidního typu v porovnání se serózním histologickým typem ovariálního karcinomu. U genu WT1 jsme pozorovali signifikantně ($p = 0.006$) vyšší četnost metylace u vzorků v časných stádiích než v pozdních stádiích ovariálního karcinomu. Žádné statisticky výrazné rozdíly nebyly nalezeny mezi věkem diagnózy pacientek a různými stupni ovariálního karcinomu.

5.4 MS-MLPA kit ME004

Methylace promotorových oblastí genů s užitím 20% cut-off

MS-MLPA – kit ME004 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) byl použit k analýze 74 vzorků: 44 vzorků ovariálního karcinomu a 30 kontrolních vzorků. Ostatní vzorky jsme z finančních důvodů neanalyzovali. S užitím cut-off hodnoty 20% byla prokázána statisticky významně vyšší metylace u genů NTRK1 ($p = 0.008$), GATA4 ($p < 0.001$) a WIF1 ($p = 0.005$) u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s nenádorovou kontrolní skupinou. U genů APAF1a a DNAJC15 byla pozorována vyšší četnost metylace (okolo 80%) v obou skupinách vzorků. U genů EPHB2, NF1a, THBS1, PCNA, MEN1a, LMNA, RBM14, IGF2Rb, MEN1b, MUS81 b a CDH1 metylace nepřekročila 20% hranici.

Porovnání klinicko-patologických charakteristik s četností metylace jednotlivých genů

Střední věk (medián) v době diagnózy byl 53 let (rozmezí 21-79 let) u nádorové skupiny pacientek a 56.5 let (rozmezí 40-84 let) u kontrolní nenádorové skupiny. Stav metylace jednotlivých genů u vzorků ovariálního karcinomu byl porovnán s klinicko-patologickými charakteristikami zahrnujícími věk, histologický typ, stádium a grade nádoru (Tabulka 11).

U Genu GATA4 byla pozorována signifikantně ($p < 0.05$) vyšší četnost metylace u endometroidního typu v porovnání s mucinózním histologickým typem ovariálního karcinomu. Gen WIF1 vykazoval signifikantně ($p = 0.045$) vyšší četnost metylace u vzorků v pozdních stádiích než v stádiu I ovariálního karcinomu. U Genu PTEN byla pozorována signifikantně ($p < 0.05$) vyšší četnost metylace v gradu 2 v porovnání s ostatními grady (1,3) ovariálního karcinomu. Žádné statisticky výrazné rozdíly nebyly nalezeny mezi věkem diagnózy.

7. Diskuze

Vzhledem k tomu, že ovariální karcinom patří mezi příčinu nejčastějšího úmrtí na gynekologické zhoubné nádory a k onemocnění se širokou variabilitou klinické odpovědi, jsou intenzivně studovány především molekulárně-biologické parametry doprovázející toto onemocnění. Důraz je kladen na markery, které by mohly být použity pro screening a mohly přesněji určit prognózu nebo predikovat odpověď na léčbu.

Pouze genetické alterace nejsou dostatečným vysvětlením všech změn doprovázejících nádorovou transformaci buňky, a to především změn v expresi jednotlivých genů. Proto je velké úsilí věnováno odhalování faktorů ležících mimo samotný sled nukleotidů. V této práci jsme se zaměřili právě na jednu z těchto epigenetických změn, a to na metylaci promotorových oblastí vybraných především tumor supresorových genů.

Lidský gen pro tumor supresorový nukleární fosfoprotein p53 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, v poloze 17p13.1. Celková délka genu je přibližně 20kb a je složen z 11 exonů, z nichž jeden je nekódující, a 10 intronů. (Lane, DP., 1994).

Protein p53 je považován za jeden z nejdůležitějších regulátorů odpovědi na nejrůznější formy buněčného stresu. Je významný v několika fázích buněčného cyklu počínaje zástavou buněčného cyklu, přes inhibici replikace DNA, řízení diferenciaci, regulaci transkripce a reparace DNA. V případě rozsáhlého poškození DNA, které již nelze opravit, indukuje tento protein smrt buňky apoptózou a tím brání přenosu poškozené DNA do dceřiných buněk.

Vzhledem k tomu, že gen kódující protein p53 je nejčastěji mutovaným genem u ovariálního karcinomu (50-70%) (Marks, JR. et al., 1991), patří ve spojitosti s tímto onemocněním mezi nejvíce studované geny. Nicméně, jeho metylace u ovariálního karcinomu nebyla doposud popsána. Methylace jednoho z nejdůležitějších tumor supresorových genů p53 byla prokázána u různých malignit. Kang et al. odhalili metylaci p53 promotoru u 3 z 19 (16%) p53 „wild type“ karcinomu prsu. Amatya et al. prokázali metylaci p53 promotoru u více než 60% gliomů. Agirre et al. pozorovali metylaci p53 promotoru u 8 z 25 případů (32%) akutní lymfoblastické leukémie. Pogribny a James poukázali na to, že p53 „wild type“ hepatocelulární karcinom vykazuje významnou metylaci promotorové oblasti p53. Vzhledem k výše uvedeným publikacím jsme se na počátku naší práce zaměřili na průkaz metylace již známého CpG místa p53 genu.

S využitím již dříve publikovaných primerů (Amatya, VJ. et al., 2005) jsme v naší studii prokázali metylaci sledovaného CpG místa p53 promotoru u 34 z 66 (51.5%) vzorků ovariálního karcinomu, zatímco frekvence metylace v tomtéž místě u nemaligních vzorků byla 11 z 37 (29.7%). Statisticky významná odlišnost v frekvenci metylace p53 promotoru u nádorové a nenádorové skupiny naznačuje, že metylace promotorové oblasti p53 genu může přispívat k nádorové transformaci.

Methylace promotorové oblasti genu p53 může být asociována se stádiem, gradingem a histologickým typem nádoru. Nicméně, v naší studii jsme neprokázali statisticky významnou korelaci mezi stavem metylace a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s ovariálním karcinomem. Přítomnost metylace promotoru p53 mírně stoupala u nádorů s pokročilým gradingem (grade 3). Přítomnost metylace p53 promotoru také stoupala (100%) u světlobuněčného typu ovariálního karcinomu; nicméně není možné vyvozovat z tohoto pozorování žádné závěry, vzhledem k tomu, že počet vzorků v této podskupině je příliš malý (n=2). Z výše uvedeného je patrné, že je nutné provést studii s větším počtem vzorku, abychom mohli rozhodnout, zda metylace promotoru p53 je asociována s klinicko-patologickými charakteristikami ovariálního karcinomu.

Další gen, u kterého jsme se zaměřili na sledování přítomnosti metylace promotorové oblasti s využitím MSP u ovariálního karcinomu byl transkripční faktor GATA4.

Rodina transkripčních faktorů GATA patří mezi klíčové regulátory specifikace a diferenciaci mnoha tkání (Zheng, R. and Blobel, GA., 2010). U obratlovců bylo charakterizováno a klasifikováno 6 odlišných GATA proteinů. Na základě jejich strukturálních a expresních vzorů byly tyto proteiny rozděleny do dvou podskupin. GATA1, GATA2 a GATA3 hrají důležitou roli ve vývoji a diferenciaci hematopoetických buněčných liniích, zatímco GATA4, GATA5 a GATA6 jsou exprimovány u různých mezodermu a endodermu odvozených tkání, jako je srdce, játra, plíce, gonády a střeva, kde hrají kritickou roli v regulaci tkáňově specifické genové exprese (Orkin, SH., 1992, Molkenin, JD., 2000).

Předpokládá se, že GATA4 a GATA5 mají tendenci ovlivňovat plně diferencované epiteální buňky, zatímco GATA6 je exprimován u nezralých proliferujících buněk v intestinálních kryptách. Tyto poznatky poukazují na GATA4 a GATA5 jako na potenciální tumor supresorové geny a na GATA6 jako na potenciální onkogen (Zheng, R., Blobel, GA., 2010).

Nejen genetické změny, ale také epigenetické změny, jako je metylace CpG ostrůvků v promotorových oblastech genů, hrají důležitou roli ve ztrátě funkce GATA genů. Časté metylace v GATA4 a GATA5 genu byly pozorovány u primárních gastrointestinálních nádorů (Akiyama, Y. et al., 2003), u nádorů plic (Guo, M. et al., 2004) a také vaječníků (Wakana, K. et al., 2006).

Rodina GATA transkripčních faktorů se podílí na regulaci genové exprese a buněčné diferenciaci. U ovariálního karcinomu byly často pozorovány odchylky v expresi GATA4 (Lassus, H. et al., 2001, Capo-chichi, CD. et al., 2003, Cai, KQ. et al., 2009). Capo-chichi et al. poukázali na ztrátu exprese GATA4 zejména u serózních typu karcinomů ovária, přičemž u mucinózních karcinomů byla exprese zachována. Dále ztrátu exprese GATA4 popsali Cai et al., a to u serózního, světlouněčného i endometroidního typu ovariálního karcinomu. Na druhé straně McEachin et al. prokázali, že většina vzorků ovariálního karcinomu povrchového epitelu si expresi GATA4 zachovala. Tato zjištění naznačují, že GATA4 transkripční faktor hraje důležitou roli v karcinogenezi ovariálního karcinomu a zdá se, že je spojen i histologickým typem ovariálního karcinomu.

S využitím nově navržených primerů se nám v naší studii podařilo odhalit metylaci promotorové oblasti GATA4 u 27 z 67 (31.3%) vzorků ovariálního karcinomu. Statisticky významně vyšší četnost metylace sledovaného CpG místa GATA4 promotoru u nádorové skupiny v porovnání s nenádorovou skupinou naznačuje, že metylace GATA4 promotoru může hrát důležitou roli v karcinogenezi ovariálního karcinomu. Tato data korelují s výsledky výzkumu Tokijské skupiny Wakana et. al. přestože analyzovali metylaci GATA4 promotoru v odlišném místě, prokázali častou metylaci GATA4 promotoru u buněčných linií odvozených od buněk ovariálního karcinomu a u patnácti pacientů s ovariálním karcinodem. Na podkladě těchto výsledků můžeme říci, že metylace GATA4 promotoru hraje důležitou roli v ovariální karcinogenezi, zejména pak u endometroidního typu. Tato skutečnost by mohla být v budoucnosti využita pro screening ovariálního karcinomu, protože metylovaná DNA se objevuje v tělesných tekutinách, například v plazmě pacientek s ovariálním karcinodem. Vzhledem k tomu, že stupeň metylace DNA izolované z plazmy koreluje se stupněm metylace DNA izolované z nádorové tkáně, předpokládá se, že zdrojem metylované DNA v plazmě jsou právě nádorové buňky (Ibanez de Caceres, I. et al., 2004).

Naše studie je první studií, která prokázala statisticky významně vyšší četnost metylace GATA4 promotoru u endometroidního typu v porovnání se serózním typem ovariálního karcinomu (69.2% vs. 19.1%). Incidence GATA4 metylace se slabě zvyšuje u časných stádií v porovnání s pozdními stádii ovariálního karcinomu (43.5% vs. 25%); nicméně vzhledem k nízkému počtu vzorků v této podskupině není prokazatelná statistická významnost a nemůžeme tedy z těchto dat vyvozovat žádné závěry. Z porovnání dalších klinicko-patologických charakteristik je patrná vyšší četnost metylace u vzorků v gradu 2, než

v ostatních gradech. K prokázání souvislosti metylace GATA4 promotoru se stádiem a gradingem nádoru je nutná další studie s větším počtem vzorků.

Integrované genomické analýzy ovariálního karcinomu ukazují čtyři podtypy ovariálního karcinomu v souvislosti s metylací promotoru. Tyto podtypy signifikantně souvisejí s odchylkami v BRCA inaktivaci, s přežitím a věkem pacientek. Rozdíly mezi podtypy ovariálního karcinomu pravděpodobně odráží kombinaci etiologických a rodových účinků a představují větší prostor pro zlepšení managementu specifické léčby ovariálního karcinomu prostřednictvím podtypu navržené péče (*Cancer Genome Atlas Research Network, 2011*). Naše studie ukázala metylaci promotoru GATA4 u 31.3% vzorků ovariálního karcinomu, zejména u endometroidního typu. Na podkladě těchto dat, můžeme předpokládat, že právě tato část vzorků může představovat určitou podskupinu ovariálního karcinomu.

Další částí studie bylo zavedení a zoptimalizování MS-MLPA a vyšetření metylačního profilu vybraných genů. Pro tuto studii jsme zvolili k analýze dva kity dodávané firmou MRC-Holland a analyzovali jsme pomocí nich 47 tumor supresorových genů.

Metylace analyzovaných CpG míst genů ATM, TP53, PTEN, VLH, GSTP1, RB1a, MGMTb, PYCARD, EPHB2, NF1a, THBS1, PCNA, MEN1a, LMNA, RBM14, IGF2Rb, MEN1b, MUS81b a CDH1 nikdy nepřekročila zvolený práh pro metylaci, což naznačuje, že metylace těchto CpG míst pravděpodobně nehraje důležitou roli při vzniku a vývoji ovariálního karcinomu. Na druhé straně sledovaná CpG místa genů BRCA1, BRCA2, MGMTa, PAX5, CDH13, TP73, WT1, CHFR, ESR1, MSH6, THSB1, CADM1, STK11, PAX6, CDKN2A, GATA5, RARB, CD44, RB1b, BCL2, PTEN, RARRES1, TERT, SFRP1a, IGF2Ra, NF1b, TWIST1, APAF1a, DNAJC15, NTRK1, PXMP4, APAF1b, PCCA, PAX6, MUS81a, SFRP1b, GATA4, PXMP4 a WIF vykazovala metylaci v různém rozsahu nad zvolenou cut-off hodnotu. U genů MSH6, APAF1a a DNAJC15 se vyskytovala metylace s vysokou frekvencí jak u vzorků ovariálního karcinomu, tak v kontrolní skupině.

U genu MSH6 byla prokázána častá metylace u karcinomu prsu a také normální prsní tkáň (*Moelans, CB. et al., 2011*). Vzhledem k tomu, že jsme v naší studii rovněž prokázali velmi častou metylaci MSH6 jak u ovariální nádorové, tak nenádorové tkáň, je možné usuzovat, že tato metylace může být specifická pro ovariální a prsní tkáň. Naše výsledky naznačují, že stejně tak by mohla být pro ovariální tkáň specifická metylace v promotorových oblastech genů APAF1a a DNAJC15.

Statisticky významně vyšší frekvenci metylace jsme pozorovali u genů MGMTa, PAX5, CDH13, WT1, THBS1, GATA5, NTRK1, GATA4 a WIF1 u nádorové skupiny vzorků v porovnání s nenádorovou skupinou. Tento poznatek naznačuje, že metylace promotorových oblastí těchto tumor supresorových genů může hrát důležitou roli v karcinogenezi ovariálního karcinomu. Sledování metylace těchto genů by mohlo být v budoucnosti využito pro screening ovariálního karcinomu, jelikož jak již bylo zmíněno metylovaná DNA může být prokázána i v plazmě pacientů (*Ibanez de Caceres, I. et al., 2004*). Dále by mohla mít metylace těchto genů význam v chemoterapii založené na epigenetických změnách, jelikož např. rezistence k derivátům platiny je silně spojována s metylací indukovanou odpovědí (*Asadollahi, R. et al., 2010*).

O-6-methylguanine-DNA methyltransferáza (MGMT) je protein podílející se na opravě DNA. Odstraněním cytotoxických aduktů 6-O-methylguaninu v DNA zabraňuje vzniku DNA „crosslinks“. Roh et al. prokázali metylaci promotoru MGMT u 14.7% mucinózních a světlobuněčných typů ovariálního karcinomu. Naše data z MS-MLPA, přestože jsou zaměřena na průkaz metylace v jiném CpG místě se s jejich výzkumem shodují, což podporuje myšlenku, že MGMT se významně podílí na vzniku a progresi ovariálního karcinomu.

PAX5 (paired box gene 5) patří do rodiny transkripčních faktorů PAX. Hlavním rysem této genové rodiny je nový, velmi konzervativní DNA vazebný motiv, známý jako

párové pole. PAX proteiny jsou důležitými regulátory v časném vývoji a ovlivňují expresi genů podílejících se na nádorové transformaci. Naše studie je první studií, která prokázala u ovariálního karcinomu statisticky významně vyšší metylaci promotorové oblasti genu PAX5. U ostatních nádorových onemocnění byla metylace PAX5 pozorována v 0-6% (*Palmisano, WA. et al., 2003*)

Protein kódovaný THBS1 (thrombospondin 1) genem je podjednotkou disulfidicky propojené homotrimerické bílkoviny. Tato bílkovina je adhezivní glykoprotein, který zprostředkovává interakce buňka-buňka a buňka-matrix. Může se vázat na fibrinogen, fibrinonektin, lamin a kolagen typu V. Bylo prokázáno, že hraje důležitou roli při agregaci destiček, angiogenezi a tumorigenezi. Naše studie je opět první studií, která prokázala statisticky významně vyšší metylaci promotorové oblasti THBS1 u ovariálního karcinomu. U ostatních nádorových onemocnění byla metylace THBS1 pozorována v 2-43% (*Bonazzi, VF. et al., 2011*).

Methylace genů WT1 (Wilms tumor suppressor 1) a výše popsaného GATA5 transkripčního faktoru již byla u ovariálního karcinomu popsána (*Kaneuchi, M. et al., 2005, Wakana, K. et al., 2006, Montavon, C. et al., 2012*). Gen WT1 kóduje transkripční faktor, který na C- konci obsahuje čtyři zinkové motivy a na N-konci prolin/glutanim bohaté DNA-vazebné domény. Tento transkripční faktor má důležitou roli v normálním vývoji urogenitálního systému. Kaneuchi et al. prokázali pomocí MSP metylaci u 88.2% světlobuněčných a u 24% serózních histologických podtypů ovariálního karcinomu. Naše data získaná z MS-MLPA ukazují metylaci u 10% ovariálního karcinomu (0% světlobuněčný, 6.3% serózní). Tento rozdíl může být způsobený tím, že byla sledována metylace v jiném CpG místě promotorové oblasti. Toto zjištění demonstruje důležitost polohy CpG dinukleotidů, což je diskutováno v článku 'Analysis of Promoter CpG Island Hypermethylation in Cancer: Location, Location, Location!' (*Vlodrop, IJ. et al., 2011*).

H-kadherin (kadherin 13) kódovaný genem CDH13 patří do skupiny kadherinů, které zajišťují buněčný kontakt. H-kadherin je lokalizovaný na povrchu buněčné membrány, do níž je zakotven pomocí GPI kotvy. Tento protein postrádá cytoplazmatickou doménu charakterizující ostatní členy kadherinové rodiny, a proto není považován za buňka-buňka adhezivní glykoprotein. H-kadherin působí jako negativní regulátor růstu axonů během nervové diferenciaci. Také chrání cévní endotelové buňky před oxidačním stresem indukovanou apoptózou a je spojován s odolností proti ateroskleróze. Gen CDH13 je často metylovaný u mnoha typů nádorů. Gen CDH13 je často metylován také u dědičného i sporadického ovariálního karcinomu (*Bol, GM. et al., 2010*). Bol et al. analyzovali metylaci CDH13 také pomocí MS-MLPA, ovšem jiným kitem (ME001B), analyzovali tedy odlišné CpG místo. U ovariálního karcinomu byl tedy v obou těchto CpG místech prokázán významný stupeň metylace. Naše studie tak potvrzuje, že metylace CDH13 hraje důležitou roli v karcinogenezi ovariálního karcinomu (metylováno bylo více než 50% vzorků ovariálního karcinomu).

NTRK1 (Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1) gen kóduje protein z rodiny neurotrofních tyrosin kinázových receptorů (NTRK family). Kináza vázající se na tento receptor fosforyluje sebe a proteiny zapojené do MAPK dráhy. V naší studii jsem prokázali významně vyšší četnost metylace tohoto genu u vzorků ovariálního karcinomu v porovnání s kontrolní nenádorovou tkání. Tapia et al. poukázali na vyšší expresi NTRK1 u ovariálního karcinomu, jako potenciálního markeru ovariálního karcinomu. Toto tvrzení v korelaci s naším experimentem může naznačovat, že sledované CpG místo může být nejenom metylované, ale hydroxymetylované, protože hydroxymetylace má opačný dopad na expresi DNA v porovnání s metylací. Na druhé straně je nutné si uvědomit, že jsem analyzovali pouze jedno jediné CpG místo v celé promotorové oblasti, které nemusí mít na genovou expresi vliv.

Pomocí MS-MLPA jsem prokázali stejně jako pomocí MSP statisticky významně vyšší četnost metylace GATA4 genu u ovariálního karcinomu. MSP prokázala metylaci u 31.3% vzorků ovariálního karcinomu a u žádného vzorku nenádorové kontrolní tkáně. MS-MLPA, která sledovala metylaci pouze jednoho CpG místa prokázala metylaci u 61.4% vzorků ovariálního karcinomu a u žádného vzorku nenádorové kontrolní tkáně. Tento rozdíl je daný tím, že navržené primery pro MSP pokrývají 4 CpG místa, přičemž jedno z toho je stejné jako u MS-MLPA. Naše data společně se studii Wakana et al. a Montavon et al. prokazují význam metylace u ovariálního karcinomu. Naše studie tedy nejen že potvrdila význam metylace GATA4 genu u ovariálního karcinomu, ale současně také odhalila nová CpG místa GATA4 promotorové oblasti, která jsou metylována pouze u ovariálního karcinomu.

Protein kódovaný genem WIF1 funguje jako inhibitor WNT proteinů, které jsou extracelulárními signálními molekulami hrajícími důležitou roli v embryonálním vývoji. Tento protein se skládá z domény WNT inhibičního faktoru (WIF) a z pěti EGF-like domén (epidermal growth factor), a tak je zapojený do mezodermální segmentace. WIF1 gen působí jako tumor supresorový gen, jehož epigenetická regulace byla prokázána u několika nádorů (Mazieres, J. et al, 2004, Taniguchi, H. et al., 2005, Deng, Y. et al., 2010). Naše studie poukazuje na význam epigenetické regulace WIF1 genu také u ovariálního karcinomu, zejména pak u pokročilých stádií.

Na rozdíl od ostatních genů u ESR1 byla prokázána statisticky významně ($p < 0.001$) vyšší četnost metylace u kontrolních nenádorových vzorků v porovnání s nádorovou tkání. ESR1 patří do skupiny nukleárních receptorů aktivovaných ligandy. Skládá se z několika důležitých domén vázajících hormony, DNA a aktivační transkripční faktory. Tento protein se nachází v jádru, kde může tvořit homodimery a společně s ESR2 heterodimery. Estrogen a jeho receptory mají nezastupitelnou roli v sexuálním vývoji a funkci reprodukčních orgánů. Estrogenové receptory jsou zapojeny taktéž do mnoha patologických procesů, jako nádor prsu, endometriální karcinom a osteoporóza. U karcinomu prsu byla již dříve prokázána metylace ESR1, která byla statisticky významně spojená se sníženou expresí estrogenového receptoru α (ER α) (Gaudet, M.M. et al., 2009). Tato publikace společně s našimi daty naznačuje, že by mohla být u nenádorové ovariální tkáně snížená exprese ER α v porovnání s nádorovou ovariální tkání a mohla by být touto cestou ovlivněna metabolická aktivita nádorových buněk.

Změny v metylaci DNA u ovariálního karcinomu jsou často spojovány s klinicko-patologickými charakteristikami (Asadollahi, R. et al., 2010). Montavon et al. prokázali vyšší četnost metylace u „high grade“ serózních nádorů ovárií. Abou-Zeid et al. ukázali vyšší frekvenci metylace CDKN2A u málo diferencovaných (grade3) nádorů. V naší studii vybrané tumor supresorové geny analyzované pomocí MS-MLPA také korelovaly s gradíngem tumoru. Nádorové vzorky gradu 2 vykazovaly statisticky významně vyšší frekvenci metylace PTEN genu v porovnání s gradem 1, 3. Vzhledem k malému počtu vzorků v gradu 2 však nemůžeme z této skutečnosti vyvozovat žádné závěry. K prokázání spojitosti mezi metylací PTEN a gradíngem je nutná další studie s větším počtem vzorků v této subkategorii. Z histologického hlediska jsme prokázali významně vyšší četnost metylace u endometroidního podtypu ovariálního karcinomu, a to zejména u genů MGMTa, PAX5, CDH13, THSB1, GATA5 a GATA4. Se stádiem nemoci potom významně korelovala metylace WT1 (časná stádia) a WIF1 (pozdní stádia) genů.

8. Závěr

V naší práci jsme se zabývali studiem metylace DNA u ovariálního karcinomu jakožto nejčastější příčiny úmrtí pacientek na gynekologické zhoubné nádory. Vzhledem k agresivitě tohoto onemocnění je velice důležité podrobně zmapovat molekulárně biologické parametry včetně těch epigenetických, jež by později mohly být využity jak v diagnostice, tak léčbě ovariálního karcinomu. Nejprve jsme se zaměřili na zavedení a zoptimalizování technik vhodných pro analýzu metylace DNA izolované z parafinových bločků. Dalším krokem pak byla analýza vybraných CpG míst především tumor supresorových genů.

Závěrem můžeme říci, že se nám podařilo zavést a zoptimalizovat MSP a MS-MLPA, které jsou použitelné pro analýzu metylace málo kvalitní DNA izolované z parafinových bločků. Pomocí MS-MLPA je dokonce možné analyzovat téměř všechny izolované vzorky. Tato skutečnost je dána především tím, že na rozdíl od MSP MS-MLPA nevyžaduje poměrně agresivní hydrogensiričitanovou přeměnu, jejíž negativní dopad se projeví zejména u málo kvalitní fragmentované DNA izolované z tkáně fixované formalínem, zalité parafínem.

Díky našemu projektu byla popsána u ovariálního karcinomu významnost metylace u dosud ještě nepopsaných CpG míst. Naše studie ukázala u vzorků ovariálního karcinomu statisticky významné změny ve frekvenci metylace sledovaných CpG míst u genů TP53, GATA4, MGMTa, PAX5, CDH13, WT1, THBS1, GATA5, ESR1, NTRK1 a WIF1. Frekvence metylace jednotlivých CpG míst dokonce významně korelovala s klinicko-patologickými charakteristikami, jako je stádium, grading a histologický typ nádoru ovárií. Tato pozorování potvrzují důležitost metylace DNA u ovariálního karcinomu. Vzhledem k tomu, že změny v metylaci DNA jsou často pozorovány jako jedny z prvních změn doprovázejících karcinogenezi, mohly by být využity jako markery časných stádií či dokonce prekancerózních stavů. Výše charakterizované epigenetické charakteristiky mohou mít v budoucnu své využití v programu screeningu ovariálního karcinomu, terapeutickém přístupu a individualizaci léčby zejména u platin rezistentních nádorů ovárií.

V současné době pokračujeme v našem výzkumu, přičemž se zaměřujeme na detailnější prozkoumání metylace promotorových oblastí genu GATA4 a CDH13. Využíváme sekvenování nové generace (platformu Roche 454). V budoucnu bychom naší studii chtěli nadále prohlubovat a rozšířit sledování změn v metylaci vybraných CpG míst u tkáňových vzorků na analýzu volné nádorové DNA izolované z plazmy pacientek s ovariálním karcinomem, a to zejména vysoce citlivými metylačně specifickými real-time technikami.

9. Dosažení cílů

1. Zavedli a zoptimalizovali jsme dvě metodiky – MSP (Metylačně specifickou PCR) a MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).
2. Zjistili jsme, že pro analýzu metylace málo kvalitní DNA izolované z parafinových bločků je vhodnější MS-MLPA než MSP. Tato skutečnost je dána především tím, že MS-MLPA nevyžaduje poměrně agresivní hydrogensiričitanovou přeměnu.
3. Prokázali jsme souvislost metylace promotorových oblastí sledovaných genů s ovariálním karcinomem, viz. publikace: *Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer*, *Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA* a *Promoter methylation of GATA4, WIF1, NTRK1 and other selected tumor suppressor genes in ovarian cancer* v příloze.

4. Prokázali jsem korelaci metylace vybraných genů s klinicko-patologickými charakteristikami ovariálního karcinomu, viz. publikace: *Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer*, *Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA* a *Promoter methylation of GATA4, WIF1, NTRK1 and other selected tumor suppressor genes in ovarian cancer* v příloze.

10. Použitá literatura

AGIRRE, X. - VIZMANOS, J.L. - CALASANZ, M.J. - GARCÍA-DELGADO, M. - LARRÁYOZ, M.J. - NOVO, F.J. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 7, s. 1070-2.

AKIYAMA, Y. - WATKINS, N. - SUZUKI, H. - JAIR, K.W. - VAN ENGELAND, M. - ESTELLER, M. - SAKAI, H. - REN, C.Y. - YUASA, Y. - HERMAN, J.G. - BAYLIN, S.B. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol*, 2003, vol. 23, no. 23, s. 8429-39.

AMATYA, V.J. - NAUMANN, U. - WELLER, M. - OHGAKI, H. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol*, 2005, vol. 110, no. 2, s. 178-84.

ASADOLLAHI, R. - HYDE, C.A. - ZHONG, X.Y. Epigenetics of ovarian cancer: from the lab to the clinic. *Gynecol Oncol*, 2010, vol. 118, no. 1, s. 81-7.

BALCH, C. - FANG, F. - MATEI, D.E. - HUANG, T.H. - NEPHEW, K.P. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology*, 2009, vol. 150, no. 9, s. 4003-11.

BALCH, C. - YAN, P. - CRAFT, T. - YOUNG, S. - SKALNIK, D.G. - HUANG, T.H. - NEPHEW, K.P. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 2005, vol. 4, no. 10, s. 1505-14.

BARTON, C.A. - HACKER, N.F. - CLARK, S.J. - O'BRIEN, P.M. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol*, 2008, vol. 109, no. 1, s. 129-39.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002 Jan, vol. 16, no. 1, s. 6-21.

BOL, G.M. - SUIJKERBUIJK, K.P. - BART, J. - VOOIJS, M. - VAN DER WALL, E. - VAN DIEST, P.J. Methylation profiles of hereditary and sporadic ovarian cancer. *Histopathology*, 2010, vol. 57, no. 3, s. 363-70.

BONAZZI, V.F. - NANCARROW, D.J. - STARK, M.S. - MOSER, R.J. - BOYLE, G.M. - AOUBE, L.G. - SCHMIDT, C. - HAYWARD, N.K. Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 10, e26121.

CAI, K.Q. - CASLINI, C. - CAPO-CHICHI, C.D. - SLATER, C. - SMITH, E.R. - WU, H. - KLEIN-SZANTO, A.J. - GODWIN, A.K. - XU, X.X. Loss of GATA4 and GATA6 expression specifies ovarian cancer histological subtypes and precedes neoplastic transformation of ovarian surface epithelia. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 7, e6454.

CAPO-CHICHI, C.D. - ROLAND, I.H. - VANDERVEER, L. - BAO, R. - YAMAGATA, T. - HIRAI, H. - COHEN, C. - HAMILTON, T.C. - GODWIN, A.K. - XU, X.X. Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. *Cancer Res*, 2003, vol. 63, no. 16, s. 4967-77.

CIBULA, D. - PETRUŽELKA, L. A KOLEKTIV. Onkogynekologie. Praha 2009, Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2665-6.

COLLINS, Y. - DICIOCCIO, R. - KEITZ, B. - LELE, S. - ODUNSI, K. Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 Suppl 1, s. 195-9.

DENG, Y. - YU, B. - CHENG, Q. - JIN, J. - YOU, H. - KE, R. - TANG, N. - SHEN, Q. - SHU, H. - YAO, G. - ZHANG, Z. - QIN, W. Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, vol. 136, no. 8, s. 1161-7.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med*, 2008 Mar, vol. 358, no. 11, s. 1148-59.

ESTELLER, M. - SILVA, J.M. - DOMINGUEZ, G. - BONILLA, F. - MATIAS-GUIU, X. - LERMA, E. - BUSSAGLIA, E. - PRAT, J. - HARKES, I.C. - REPASKY, E.A. - GABRIELSON, E. - SCHUTTE, M. - BAYLIN, S.B. - HERMAN, J.G. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 2000, vol. 92, no. 7, s. 564-9.

GAUDET, M.M. - CAMPAN, M. - FIGUEROA, J.D. - YANG, X.R. - LISSOWSKA, J. - PEPLONSKA, B. - BRINTON, L.A. - RIMM, D.L. - LAIRD, P.W. - GARCIA-CLOSAS, M. - SHERMAN, M.E. DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, vol. 18, no. 11, s. 3036-43.

GIFFORD, G. - PAUL, J. - VASEY, P.A. - KAYE, S.B. - BROWN, R. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2004, vol. 10, no. 13, s. 4420-6.

GRAS, E. - CORTES, J. - DIEZ, O. - ALONSO, C. - MATIAS-GUIU, X. - BAIGET, M. - PRAT, J. Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer*, 2001, vol. 92, no. 4, s. 787-95.

GUO, M. - AKIYAMA, Y. - HOUSE, M.G. - HOOKER, C.M. - HEATH, E. - GABRIELSON, E. - YANG, S.C. - HAN, Y. - BAYLIN, S.B. - HERMAN, J.G. - BROCK, M.V. Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, vol. 10, no. 23, s. 7917-24.

HEGI, M.E. - DISERENS, A.C. - GORLIA, T. - HAMOU, M.F. - DE TRIBOLET, N. - WELLER, M. - KROS, J.M. - HAINFELLNER, J.A. - MASON, W. - MARIANI, L. - BROMBERG, J.E. - HAU, P. - MIRIMANOFF, R.O. - CAIRNCROSS, J.G. - JANZER, R.C. - STUPP, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, vol. 352, no. 10, s. 997-1003.

HEICHMAN, K.A. - WARREN, J.D. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med*, 2012 Oct, vol. 50, no. 10, s. 1707-21.

HERMAN, J.G. - BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, vol. 349, no. 21, s. 2042-54.

HERMAN, J.G. - GRAFF, J.R. - MYÖHÄNEN, S. - NELKIN, B.D. - BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, no. 18, s. 9821-6.

HUANG, Y.W. - JANSEN, R.A. - FABBRI, E. - POTTER, D. - LIYANARACHCHI, S. - CHAN, M.W. - LIU, J.C. - CRIJNS, A.P. - BROWN, R. - NEPHEW, K.P. - VAN DER ZEE, A.G. - COHN, D.E. - YAN, P.S. - HUANG, T.H. - LIN, H.J. Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection. *Oncol Rep*, 2009, vol. 22, no. 4, s. 853-61.

CHAN, K.Y. - OZÇELIK, H. - CHEUNG, A.N. - NGAN, H.Y. - KHOO, U.S. Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, no. 14, s. 4151-6.

CHAUDHRY, P. - SRINIVASAN, R. - PATEL, F.D. Utility of gene promoter methylation in prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer (EOC). *Cancer Invest*, 2009, vol. 27, no. 8, s. 877-84.

CHOU, J.L. - SU, H.Y. - CHEN, L.Y. - LIAO, Y.P. - HARTMAN-FREY, C. - LAI, Y.H. - YANG, H.W. - DEATHERAGE, D.E. - KUO, C.T. - HUANG, Y.W. - YAN, P.S. - HSIAO, S.H. - TAI, C.K. - LIN, H.J. - DAVULURI, R.V. - CHAO, T.K. - NEPHEW, K.P. - HUANG, T.H. - LAI, H.C. - CHAN, M.W. Promoter hypermethylation of FBXO32, a novel TGF-beta/SMAD4 target gene and tumor suppressor, is associated with poor prognosis in human ovarian cancer. *Lab Invest*, 2010, vol. 90, no. 3, s. 414-25.

IBANEZ DE CACERES, I. - BATTAGLI, C. - ESTELLER, M. - HERMAN, J.G. - DULAIMI, E. - EDELSON, M.I. - BERGMAN, C. - EHYA, H. - EISENBERG, B.L. - CAIRNS, P. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 2004, vol. 64, no. 8, s. 6476-81.

IZUTSU, N. - MAESAWA, C. - SHIBAZAKI, M. - OIKAWA, H. - SHOJI, T. - SUGIYAMA, T. - MASUDA, T. Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, 2008, vol. 32, no. 6, s. 1227-35.

JACOBS, I.J. AND MENON, U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2004, vol. 3, no. 4, s. 355-66.

KANEUCHI, M. - SASAKI, M. - TANAKA, Y. - SHIINA, H. - YAMADA, H. - YAMAMOTO, R. - SAKURAGI, N. - ENOKIDA, H. - VERMA, M. - DAHIYA, R. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer*, 2005, vol. 104, no. 9, s. 1924-30.

KANG, J.H. - KIM, S.J. - NOH, D.Y. - PARK, I.A. - CHOE, K.J. - YOO, O.J. - KANG, H.S. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest*, 2001, vol. 81, no. 4, s. 573-9.

LANE, D.P. p53 and human cancers *Br Med Bull*, 1994, vol. 50, no. 3, s. 582-99.

LASSUS, H. - LAITINEN, M.P. - ANTTONEN, M. - HEIKINHEIMO, M. - AALTONEN, L.A. - RITVOS, O. - BUTZOW, R. Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab Invest*, 2001, vol. 81, no. 4, s. 517-26.

MARKS, J.R. - DAVIDOFF, A.M. - KERNS, B.J. - HUMPHREY, P.A. - PENCE, J.C. - DODGE, R.K. - CLARKE-PEARSON, D.L. - IGLEHART, J.D. - BAST, R.C. JR., BERCHUCK, A. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 1991, vol. 51, no. 11, s. 2979-84.

MAZIERES, J. - HE, B. - YOU, L. - XU, Z. - LEE, A.Y. - MIKAMI, I. - REGUART, N. - ROSELL, R. - MCCORMICK, F. - JABLONS, D.M. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res*, 2004, vol. 64, no. 14, s. 4717-20.

McEACHIN, M.D. - XU, X.X. - SANTOIANNI, R.A. - LAWSON, D. - COTSONIS, G. - COHEN, C. GATA-4 and GATA-6 expression in human ovarian surface epithelial carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, vol. 16, no. 2, s. 153-8.

MOELANS, C.B. - VERSCHUUR-MAES, A.H. - VAN DIEST, P.J. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol*, 2011, vol. 225, no. 2, s.222-31.

MOLKENTIN, J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. ubiquitously expressed regulators of tissuespecific gene expression. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, no. 50, s. 38949-52.

MONTAVON, C. - GLOSS, B.S. - WARTON, K. - BARTON, C.A. - STATHAM, A.L. - SCURRY, J.P. - TABOR, B. - NGUYEN, T.V. - QU, W. - SAMIMI, G. - HACKER, N.F. - SUTHERLAND, R.L. - CLARK, S.J. - O'BRIEN, P.M. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2012, vol. 124, no. 3, s. 582-8.

MOORE, R.G. - MCMEEKIN, D.S. - BROWN, A.K. - DISILVESTRO, P. - MILLER, M.C. - ALLARD, W.J. - GAJEWSKI, W. - KURMAN, R. - BAST, R.C. JR. - SKATES, S.J. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*, 2009, vol. 112, no. 1, s. 40-6.

NYGREN, A.O. - AMEZIANE, N. - DUARTE, H.M. - VIJZELAAR, R.N. - WAISFISZ, Q. - HESS, C.J. - SCHOUTEN, J.P. - ERRAMI, A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*, 2005, vol. 33, no.14, e128.

ORKIN, S.H. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, 1992, vol. 80, no. 3, s. 575-581.

PALMISANO, W.A. - CRUME, K.P. - GRIMES, M.J. - WINTERS, S.A. - TOYOTA, M. - ESTELLER, M. - JOSTE, N. - BAYLIN, S.B. - BELINSKY, S.A. Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res*, 2003, vol. 63, no.15, s. 4620-5.

PAVICIC, W. - PERKIÖ, E. - KAUR, S. - PELTOMÄKI, P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med*, 2011, vol. 17, no.7-8, s. 726-35.

POGRIBNY, I.P. - JAMES, S.J. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Lett*, 2002, vol. 176, no. 2, s. 169-74.

ROH, H.J. - SUH, D.S. - CHOI, K.U. - YOO, H.J. - JOO, W.D. - YOON, M.S. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation: association of epithelial ovarian carcinogenesis in specific histological types. *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, vol. 37, no. 7, 851-60.

STAUB, J. - CHIEN, J. - PAN, Y. - QIAN, X. - NARITA, K. - ALETTI, G. - SCHEERER, M. - ROBERTS, L.R. - MOLINA, J. - SHRIDHAR, V. Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance. *Oncogene*, 2007, vol. 26, no. 34, s. 4969-78.

STRATHDEE, G. - MACKEAN, M.J. - ILLAND, M. - BROWN, R. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 1999, vol. 18, no. 14, s. 2335-41.

SU, H.Y. - LAI, H.C. - LIN, Y.W. - LIU, C.Y. - CHEN, C.K. - CHOU, Y.C. - LIN, S.P. - LIN, W.C. - LEE, H.Y. - YU, M.H. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*, 2010, vol. 127, no.3, s. 555-67.

TANIGUCHI, H. - YAMAMOTO, H. - HIRATA, T. - MIYAMOTO, N. - OKI, M. - NOSHO, K. - ADACHI, Y. - ENDO, T. - IMAI, K. - SHINOMURA, Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, 2005, vol. 24, no. 53, s. 7946-52.

TAPIA, V. - GABLER, F. - MUÑOZ, M. - YAZIGI, R. - PAREDES, A. - SELMAN, A. - VEGA, M. - ROMERO, C. Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2011, vol. 121, no. 1, s. 13-23.

TAVASSOLI, F.A, DEVILEE, P. (EDS.): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003: s. 113-202.

THU, K.L. - PIKOR, L.A. - KENNETT, J.Y. - ALVAREZ, C.E. - LAM, W.L. Methylation analysis by DNA immunoprecipitation. *J Cell Physiol*, 2010, vol. 222, no. 3, s. 522-31.

VAN VLODROP, I.J. - NIESSEN, H.E. - DERKS, S. - BALDEWIJNS, M.M. - VAN CRIEKINGE, W. - HERMAN, J.G. - VAN ENGELAND, M. Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! *Clin Cancer Res.*, 2011, vol. 17, no. 13, s. 4225-31.

WAKANA, K. - AKIYAMA, Y. - ASO, T. - YUASA, Y. Involvement of GATA-4/-5 transcription factors in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2006, vol. 241, no. 2, s. 281-8.

WARREN, J.D. - XIONG, W. - BUNKER, A.M. - VAUGHN, C.P. - FURTADO, L.V. - ROBERTS, W.L. - FANG, J.C. - SAMOWITZ, W.S. - HEICHMAN, K.A. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med.* 2011 Dec; 9:133.

WOJDACZ, T.K. - DOBROVIC, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*, 2007, vol. 35, no. 6, e41

ZELLER, C. - DAI, W. - STEELE, N.L. - SIDDIQ, A. - WALLEY, A.J. - WILHELM-BENARTZI, C.S. - RIZZO, S. - VAN DER ZEE, A. - PLUMB, J.A. - BROWN, R. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene*, 2012, vol. 31, no. 42, s. 4567-76.

ZHENG, R. - BLOBEL, G.A. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer*, 2010, vol. 1, no. 12, s. 1178-88.

Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 2011, vol. 474, no. 7353, s. 609-15

Webový portál - SVOD: epidemiologie zhoubných nádorů v České republice.
<http://www.svod.cz>

11. Přehled přednáškové a publikační činnosti

11.1 Původní vědecké práce s impakt faktorem

1. SEIFRTOVÁ, M. - HAVELEK, R. - CHMELAROVÁ, M. - CMILOVÁM J. - MUTHNÁ, D. - STOKLASOVÁ, A. - ZEMÁNKOVÁ, S. - REZÁČOVÁ, M. The Effect of ATM and ERK1/2 Inhibition on Mitoxantrone-Induced Cell Death of Leukaemic Cells. *Folia Biol (Praha)*, 2011, vol. 57, no. 2, s. 74-81. [IF= 1.151]
2. CHMELAROVA, M. - KREPINSKA, E. - SPACEK, J. - LACO, J. - BERANEK, M. - PALICKA, V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin Transl Oncol*, 2013, vol. 15, no. 2, s. 160-3. doi: 10.1007/s12094-012-0894-z. Epub 2012 Jul 19. [IF= 1.254]
3. CHMELAROVA, M. - KREPINSKA, E. - SPACEK, J. - LACO, J. - NEKVINDOVA, J. - PALICKA, V. Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha)*, 2012, vol. 58, no. 6, s. 246-250. [IF= 1.151]
4. CHMELAROVA, M. - DVORAKOVA, E. - SPACEK, J. - LACO, J. - MZIK, M. - PALICKA, V. Promoter methylation of GATA4, WIF1, NTRK1 and other selected tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Folia Biol (Praha)*, 2013, vol. 59, no. 2, s. 87-92. [IF= 1.151]

11.2 Publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech

1. CHMELAROVÁ, M. - PALIČKA, V. Hypermetylace DNA u ovariálního karcinomu. *Klin. Biochem Metab*, 2010, vol. 18 (39), no. 4, s. 214–218
2. CHMELAROVÁ, M. - PALIČKA, V. Nejčastěji využívané metodiky k analýze DNA metylačních změn. *Cas Lek Cesk*, 2011, vol. 150, no. 8, s. 442-5.
3. KŘEPINSKÁ, E. - CHMELAROVÁ, M. - LACO, J. - PALIČKA, V. - ŠPAČEK, J. Jaký je prognostický význam molekulárně genetických faktorů u karcinomu endometria? *Klin Onkol*, 2012, vol. 25, no. 4, s. 282-6.

11.3 Původní vědecké práce přijaté k publikaci v časopise s impakt faktorem

1. DVORAKOVA, E. - CHMELAROVA, M. - LACO, J. - PALICKA, V. - SPACEK, J. Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometroid carcinoma of endometrium using MS-MLPA. *Biomedical Papers...* in print [IF= 0.702]

11.4 Původní vědecké práce v recenzním řízení

1. CHMELAROVA, M. - DVORAKOVA, E. - SPACEK, J. - LACO, J. - PALICKA, V. Importance of promoter methylation in GATA4 gene in epithelial ovarian cancer. *Biomedical Papers ...* under review [IF= 0.702]

11.5 Posterová sdělení na mezinárodních konferencích

1. KREPINSKA, E. - CHMELAROVA, M. - PALICKA, V. - SPACEK, J. Mutation of K-ras gene in carcinogenesis of endometrial carcinoma. 13th Biennial Meeting of the International Gynecological Cancer Society, Prague, October 23-26, 2010
2. CHMELAROVA, M. - KREPINSKA, E. - SPACEK, J. - PALICKA, V. Promoter methylation of p53 in epithelial ovarian cancer. 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, Milan, Italy, September 11-14, 2011
3. KREPINSKA, E. - CHMELAROVA, M. - LACO, J. - PALICKA, V. - SPACEK, J. Mutation of K-ras gene in pathogenesis of endometrial carcinoma. 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, Milan, Italy, September 11-14, 2011
4. CHMELAROVA, M. - KREPINSKA, E. - SPACEK, J. - LACO, J. - PALICKA, V. Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Vancouver, Canada, October 13-16, 2012
5. KREPINSKA, E. - CHMELAROVA, M. - LACO, J. - PALICKA, V. - SPACEK, J. Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometrial cancer. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Vancouver, Canada, October 13-16, 2012

11.6 Odborné přednášky

1. Cyklus odborných seminářů 2. ročníku doktorského studia, 11.dubna 2011, Hradec Králové. Metylace DNA u ovariálního karcinomu.
2. Regionální seminář v oboru klinická biochemie, 13. prosince 2011, Hradec Králové. Zkušenosti ze stáže na Mayo Clinic.
3. 8th Postgraduate Medical Students Conference, 22nd October, 2012, Hradec Králové. Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer using MS- MLPA.