

DNA hypermetylace tumor supresorových genů *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1* u hyperplazie endometria

DNA hypermethylation of tumor suppressor genes *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* and *NTRK1* in endometrial hyperplasia

O. Dvořák¹, M. Slavíčková², J. Laco³, M. Štěpán¹, E. Čermáková⁴, J. Špaček¹

¹ Porodnická a gynekologická klinika LF UK a FN Hradec Králové

² Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

³ Fingerlandův ústav patologie, LF UK a FN Hradec Králové

⁴ Ústav lékařské biofyziky, LF Hradec Králové

Souhrn: **Cíl:** Zjistit míru metylací DNA vybraných genových promotorů u jednotlivých typů hyperplazie endometria ve srovnání s normální endometriální tkání. **Soubor a metodika:** Byla použita MS-MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Porovnáno bylo celkem 120 vzorků tkáně endometria; 40 vzorků s atypickou hyperplazií endometria, 40 vzorků s hyperplazií endometria bez atypií a 40 kontrolních vzorků tkáně zdravého endometria. **Výsledky a závěry:** Rozdíly v metylaci DNA mezi jednotlivými skupinami byly zjištěny v genech *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1* (*TWIST1*: atypická hyperplazie 67,5 %, benigní hyperplazie 2,5 %, normální endometrium 22,5 %; $p < 0,00001$; *GATA4*: atypická hyperplazie 95,0 %, benigní hyperplazie 65,0 %, normální endometrium 22,5 %; $p < 0,00001$; *MUS81*: atypická hyperplazie 57,5 %, benigní hyperplazie 22,5 %, normální endometrium 5,0 %; $p < 0,00001$; *NTRK1*: atypická hyperplazie 65,0 %, benigní hyperplazie 27,5 %, normální endometrium 10 %; $p < 0,00001$). U genů *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1* byla pozorována vyšší míra metylace u vzorků s atypickou hyperplazií endometria v porovnání se vzorky zdravého endometria a dále byla vyšší míra metylace pozorována u vzorků s atypickou hyperplazií endometria v porovnání se vzorky benigní hyperplazie endometria. Methylace DNA u tumor supresorových genů *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1* se uplatňuje v patogenezi atypické hyperplazie endometria.

Klíčová slova: metylace – *TWIST1* – *GATA4* – *MUS81* – *NTRK1* – hyperplazie endometria – epigenetika

Summary: **Objective:** To investigate DNA methylation of specific tumor suppressor genes in endometrial hyperplasia compared to normal endometrial tissue. **File and methodology:** To search for epigenetic events, methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification was employed to compare the methylation status of 40 tissue samples with atypical endometrial hyperplasia, 40 tissue samples with endometrial hyperplasia without atypia, and 40 control tissue samples with a normal endometrium. **Results and conclusion:** Differences in DNA methylation among the groups were found in *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81*, and *NTRK1* genes (*TWIST1*: atypical hyperplasia 67.5%, benign hyperplasia 2.5%, normal endometrium 22.5%; $P < 0.00001$; *GATA4*: atypical hyperplasia 95%, benign hyperplasia 65%, normal endometrium 22.5%; $P < 0.00001$; *MUS81*: atypical hyperplasia 57.5%, benign hyperplasia 22.5%, normal endometrium 5%; $P < 0.00001$; *NTRK1*: atypical hyperplasia 65%, benign hyperplasia 27.5%, normal endometrium 10%; $P < 0.00001$). Higher methylation rates were observed for the tumor suppressor genes of *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81*, and *NTRK1* in samples with atypical endometrial hyperplasia compared to samples with normal endometrial tissue, and higher methylation rates were found in samples with atypical endometrial hyperplasia compared to samples of benign endometrial hyperplasia. DNA methylation of *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81*, and *NTRK1* is involved in the pathogenesis of atypical endometrial hyperplasia.

Key words: methylation – *TWIST1* – *GATA4* – *MUS81* – *NTRK1* – endometrial hyperplasia – epigenetics

Úvod

Hyperplazie endometria je patologický stav charakterizovaný nadměrnou proliferací endometriálních buněk. Nejčas-

tější příčinou hyperplazie endometria je hormonální nerovnováha mezi estrogenem a progesteronem, tedy hormony ovlivňujícími růst a regeneraci endomet-

ria. Nedostatek progesteronu vůči estrogenům může vést k nadměrnému růstu endometria. Hyperplazie endometria je přirozenou odpovědí endometriální

tkáně na růst stimulující efekt estrogenů. Mezi predispoziční faktory hyperplazie endometria patří obezita, kdy může docházet ke zvýšené produkci estrogenů v tukové tkáni aromatizací testosteronu na estrogen, což následně vede k proliferaci až hyperplazii endometria. Dalšími faktory jsou syndrom polycystických ovarií, nádory produkující estrogenu, pozdní menopauza a užívání neoponovaných estrogenů, kdy dlouhodobé užívání estrogenů léčby bez doprovodné progesteronové terapie opět může zvýšit riziko hyperplazie.

Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) dělíme hyperplazii endometria do dvou kategorií [1]:

- hyperplazie endometria bez atypií (synonymum: benigní hyperplazie endometria);
- atypická hyperplazie endometria/endometrioidní intraepiteliální neoplazie (EIN).

Atypická hyperplazie endometria je pokládána za prekancerózu v užším slova smyslu, která může progredovat až do endometrioidního typu endometriálního karcinomu (EC), který je jedním z nejčastějších zhoubných nádorů ženského pohlavního ústrojí [2].

Změny endometria ve smyslu hyperplazie se obvykle objevují po menopauze, kdy s ukončením pravidelné ovulace přestanou ovaria produkovat progesteron, tyto změny jsou ale již běžné v období perimenopauzy, kdy už samotná nepravidelnost ovulace a následně cyklu může vyvolat tyto hyperplastické změny na endometriu [3]. Nejčastějšími příznaky hyperplazie endometria jsou abnormální děložní krvácení vč. menorigie, krvácení mimo cyklus, postmenopauzální krvácení, dále i nepravidelné krvácení při hormonální substituční terapii nebo léčbě tamoxifenem [4,5].

Přibližně u 25–40 % patientek s diagnostikovanou atypickou hyperplazií endometria se bez léčby následně vyvine karcinom endometria. U 13–43 % pa-

cientek s atypickou hyperplazií se vyskytuje karcinom endometria již současně. Naproti tomu riziko maligní transformace benigní hyperplazie endometria během následujících 20 let od stanovení diagnózy je < 5 % [6]. Vznik invazivního karcinomu u patientek s benigní hyperplazií je tedy poměrně vzácný, naopak atypická hyperplazie je pro vysoké riziko rozvoje v karcinom endometria považována za prekancerózu. Z toho vyplývá, že k léčbě benigní a atypické hyperplazie je nutné přistupovat odlišně. Atypická hyperplazie obvykle vyžaduje radikální léčbu ve smyslu hysterektomie, u benigní hyperplazie lze postupovat konzervativně – observačně. V některých případech může být použita hormonální léčba, např. progestinová terapie, a to i u diagnózy atypické hyperplazie [7]. Správné histologické zařazení a rozlišení benigní hyperplazie a atypické hyperplazie je zásadní pro volbu další terapie.

V procesu karcinogeneze hrají významnou roli epigenetické změny. Mohou ovlivňovat klíčové geny související s kontrolou buněčného dělení, reparací DNA a programovanou buněčnou smrtí. Nejvíce studovanou epigenetickou alterací je metylace DNA, kdy dochází k navázání metylové skupiny na cytosinové báze v DNA. Hypermetylace u tumor supresorových genů může způsobit snížení jejich exprese, což vede k nekontrolovanému buněčnému dělení. Naopak hypometylace může aktivovat onkogeny, geny podporující nádorový růst. Změny v metylaci DNA tumor supresorových genů jsou časným krokem v karcinogenezi endometriální tkáně [8]. V naší předchozí práci byly prokázány rozdíly v metylaci DNA tumor supresorových genů mezi jednotlivými typy hyperplazie u některých z 25 vybraných tumor supresorových genů [9]. Vzhledem k velmi slibným výsledkům jsme se rozhodli pro analýzu získaných vzorků hyperplastického endometria a kontrolní skupiny zdravé endometriální tkáně další skupinou 24 tumor supresorových genů. Pro dobré zkuše-

nosti byla použita sada sond MS-MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) kit ME 004.

Soubor patientek a metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 120 vzorků třech typů tkání endometria – benigní hyperplazie endometria (n = 40), atypické hyperplazie endometria (n = 40) a vzorků zdravé endometriální tkáně (n = 40). Vzorky pochází od žen léčených na Porodnické a gynekologické klinice FN Hradec Králové. Všechny ženy byly léčeny v období od roku 2007 do roku 2014 a byly české národnosti. Vzorky normálního endometria byly získány od patientek, které byly léčeny chirurgicky pro nemaligní diagnózy, např. prolaps dělohy nebo děložní leiomyomy. Parafinové bločky byly získány z archivu Fingerlandova ústavu patologie FN Hradec Králové. Všechny preparáty byly zrevidovány a případně reklasifikovány atestovaným patologem se subspecializací na gynekologickou patologii (JL). DNA byla extrahována z formalinem fixovaných parafinových vzorků pomocí soupravy Qiagen pro extrakci DNA (Hilden, Německo).

Studie byla schválena Etickou komisí FM Hradec Králové a výborem institucionální revizní komise (r.n. 20120-4 S21P).

Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)

V experimentální práci byl použit kit prob SALSA MLPA ME004 Tumour Sup.-4 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), který může analyzovat atypickou metylaci u 24 tumor supresorových genů. Sekvence prob, genová místa a pozice na chromozomu mohou být nalezeny na www.mlpa.com. Jednotlivé geny byly stanoveny pomocí dvou prob, které obsahovaly různá Hha1 restriční místa. Experimentální postup byl proveden podle protokolu výrobce, s minimem modifikací.

DNA (100 ng) byla rozpuštěna v 5 µl TE-pufu (10 mM Tris-Cl; 0,5 mM EDTA;

Tab. 1. Demografická a klinická data žen s atypickou hyperplazií endometria, s benigní hyperplazií endometria a s normálním nálezem na endometriu.

Tab. 1. Demographic and clinical data of women with atypical endometrial hyperplasia, benign endometrial hyperplasia and normal endometrial findings.

	Kontrolní skupina n = 40	Benigní hyperplazie n = 40	Hyperplazie s atypiiemi n = 40	P
Věk – medián (IQR)	64 (54–71)	52 (50–60,5)	60 (51–66,8)	0,0022
BMI – kg/m ² , medián (IQR)	27,3 (24,2–29,3)	28 (24–32,8)	33,8 (27,1–39,1)	0,00013
Hypertenze – četnost (%)	12 (30,0 %)	20 (51,3 %)	31 (77,5 %)	< 0,0001
Diabetes mellitus – četnost (%)	2 (5,0 %)	3 (7,7 %)	12 (30,0 %)	0,0034
Karcinom prsu – četnost (%)	4 (10,0 %)	1 (2,6 %)	0 (0 %)	0,085
Fumator – četnost (%)	2 (5,0 %)	3 (7,7 %)	2 (5,0 %)	0,796

Údaje jsou prezentovány jako medián (mezikvartilové rozpětí), kategoriální údaje jako n (%). Významné hodnoty **P** jsou uvedeny **tučně**.Data are presented as median (interquartile range), categorical data as N (%). Significant values **P** are shown in **bold**.

BMI – index tělesné hmotnosti, n – počet, IQR – mezikvartilové rozpětí

pH 9,0), denaturována a následně ochlazená na 25 °C. Po přidání směsi prob byly proby přes noc hybridizovány (16–18 hod) 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 Hha1 (30 min při 49 °C). Toto štěpení způsobilo ligaci pouze nenaštěpené (metylované) DNA sekvence. Amplifikační PCR reakce byla provedena ve standardním termocyklu (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) a využívala teplotní profil: 35 cyklů denaturace při 95 °C 30 s, annealing při 60 °C 30 s a extenze při 72 °C 1 min, zakončeno závěrečnou extenzí 20 min při 72 °C. Alikvoty PCR reakce (0,6 µl) byly smíchány s 0,2 µl vnitřního standardu GeneScan™ –500 LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 9,0 µl formamidu. Po denuraci byly fragmenty separovány a kvantifikovány na ABI3130 kapilárním sekvenátoru a analyzovány pomocí GeneMapper 4.0 (oba Applied Biosystems). Plochy pík 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 pík všech kontrolních sond, Dig

znamená Hha1 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 $Dm \geq 0,2$, což odpovídá 20 % metylované DNA [10]. Cut-off hodnotu jsme nastavili v závislosti na analýze kontrolních vzorků endometrií. CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Zymoresearch, Irvine, CA, USA) byly použity v každém běhu jako kontroly.

Statistická analýza

Kvantitativní demografické a klinické charakteristiky byly porovnány pomocí neparametrické Kruskal-Wallisovy analýzy rozptylu s následným mnohonásobným porovnáváním Dunnovým testem. Hodnoty jsou prezentovány mediánem a mezikvartilovým rozpětím (IQR). Kvalitativní veličiny byly vyhodnoceny pomocí Fisherova přesného testu a jsou prezentovány absolutními a relativními četnostmi. U testů byla použita Bonferroni modifikace hladiny významnosti. Logistická regrese byla použita ke zhodnocení vlivu případných confounder faktorů. Zvolená hladina významnosti byla pro metylaci DNA $\alpha = 0,001$, pro všechny další hodnocené parametry $\alpha = 0,05$. Data byla vyhodnocena pomocí statistického software NCSS 2023 Statistical

Software 2023 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss a IBM SPSS Statistics verze 29.0.1. – SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Výsledky

Demografické a klinické charakteristiky studijní populace

Celkem bylo do studie zařazeno 120 vzorků endometria (40 vzorků atypické hyperplazie, 40 vzorků benigní hyperplazie a 40 vzorků zdravé tkáně endometria jako kontrolní skupina) a demografické a klinické charakteristiky žen s ohledem na přítomnost benigní hyperplazie a atypické hyperplazie (tab. 1). Všechny proměnné, které byly v univerzální analýze významné (věk žen, body mass index – BMI, diabetes mellitus – DM a hypertenze – HT), byly považovány za potenciální záměnné faktory. Pomocí logistické regrese bylo zjištěno, že rozdílný výskyt genových promotorů mezi skupinami není confounder faktory ovlivněn.

Přítomnost metylace genů u žen s normální tkání endometria, s benigní hyperplazií a s atypickou hyperplazií

Rozdíly v metylaci DNA mezi jednotlivými skupinami byly zjištěny v promotorech genů *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1* (*TWIST1*: atypická hyperplazie

Tab. 2. Frekvence metylace DNA vybraných genů u podskupin žen s atypickou hyperplazií endometria, s benigní hyperplazií endometria a s normálním nálezem na endometriu.

Tab. 2. DNA methylation frequency of selected genes in subgroups of women with atypical endometrial hyperplasia, benign endometrial hyperplasia and normal endometrial findings.

Geny	Kontrolní skupina n = 40	Benigní hyperplazie n = 40	Hyperplazie s atypiiemi n = 40	p
<i>EPHB2</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	1 (2,5)	1
<i>BCL2</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	2 (5,0)	0,328
<i>KLLN</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	4 (10,0)	0,0338
<i>NF1(a)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	8 (20,0)	0,000275
<i>RARRES1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>PRPF31</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>TERT</i> – četnost (%)	4 (10,0)	2 (5,0)	8 (20,0)	0,134
<i>THBS1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>SFRP1(a)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	1 (2,5)	1
<i>IGF2R(a)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	2 (5,0)	0,328
<i>NF1b</i> – četnost (%)	2 (5,0)	0 (0)	1 (2,5)	0,772
<i>BRCA1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>TWIST1</i> – četnost (%)	9 (22,5)	1 (2,5)	27 (67,5)	< 0,00001
<i>APAF1(a)</i> – četnost (%)	5 (12,5)	9 (22,5)	17 (42,5)	0,00896
<i>PCDH15</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>PCNA</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>DNAJC15</i> – četnost (%)	39 (97,5)	32 (80,0)	38 (95,0)	0,0276
<i>NTRK1</i> – četnost (%)	4 (10)	11 (27,5)	26 (65,0)	< 0,00001
<i>PXMP4(a)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>MEN1(a)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>LMNA</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>OPA1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>APAF1(b)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>PCCA</i> – četnost (%)	0 (0)	1 (2,5)	4 (10,0)	0,125
<i>PAX6</i> – četnost (%)	2 (5,0)	3 (7,5)	8 (20,0)	0,139
<i>BMPR2</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>RBM14</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>MUS81(a)</i> – četnost (%)	2 (5,0)	9 (22,5)	23 (57,5)	< 0,00001
<i>IGF2R(b)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>SFRP1(b)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	1 (2,5)	1
<i>GATA4</i> – četnost (%)	9 (2,5)	26 (65,0)	38 (95)	< 0,00001
<i>RANGAP1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>PXMP4(b)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>LEPRb</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>MEN1(b)</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>JAG1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
<i>MUS81</i> – četnost (%)	1 (2,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	1
<i>WIF1</i> – četnost (%)	1 (2,5)	7 (17,5)	8 (20,0)	0,032
<i>CDH1</i> – četnost (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–

Údaje v kategorii jsou prezentovány jako n (%). Významné hodnoty **p** jsou uvedeny **tučně**.

– nelze vypočítat, protože žádná ze skupin neobsahuje metylovaný gen

Data in a category are presented as N (%). Significant values **P** are shown in **bold**.

– cannot be calculated because none of the groups contain a methylated gene

n – počet

Tab. 3. Rozdíly v metylaci DNA vybraných genů u podskupin žen s atypickou hyperplazií endometria, s benigní hyperplazií endometria a s normálním nálezem na endometriu.

Tab. 3. Differences in DNA methylation of selected genes in subgroups of women with atypical endometrial hyperplasia, benign endometrial hyperplasia and normal endometrial findings.

Geny	Kontrolní vs. benigní hyperplazie	Kontrolní vs. hyperplazie s atypie	Benigní hyperplazie vs. hyperplazie s atypie
<i>TWIST1</i>	0,0143*	0,0001***	< 0,00001***
<i>NTRK1</i>	0,0834	< 0,00001***	0,0015**
<i>MUS81</i>	0,0476	< 0,00001***	0,0027**
<i>GATA4</i>	0,0003***	< 0,00001***	0,0015**

Významné hodnoty **p** jsou uvedeny **tučně**.*, **, *** je určena hladina významnosti po Bonferroni modifikaci (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).Significant values **P** are shown in **bold**.*, **, *** is the significance level after Bonferroni modification (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

67,5 %; benigní hyperplazie 2,5 %; normální endometrium 22,5 %; $p < 0,00001$; *GATA4*: atypická hyperplazie 95,0 %; benigní hyperplazie 65,0 %; normální endometrium 22,5 %; $p < 0,00001$; *MUS81*: atypická hyperplazie 57,5 %; benigní hyperplazie 22,5 %; normální endometrium 5,0 %; $p < 0,00001$; *NTRK1*: atypická hyperplazie 65,0 %; benigní hyperplazie 27,5 %; normální endometrium 10,0 %; $p < 0,00001$ (tab. 2). U promotoru *GATA4*, *TWIST1*, *MUS81* a *NTRK1* byla pozorována vyšší míra metylace u vzorků s atypickou hyperplazií endometria v porovnání se vzorky zdravého endometria (*GATA4* $p < 0,001$; *TWIST1* $p < 0,001$; *MUS81* $p < 0,001$ a *NTRK1* $p < 0,001$), dále byla vyšší míra metylace pozorována u vzorků s atypickou hyperplazií endometria v porovnání se vzorky benigní hyperplazie endometria (*GATA4* $p < 0,01$; *TWIST1* $p < 0,001$; *MUS81* $p < 0,01$ a *NTRK1* $p < 0,01$). Rozdíl v míře metylace ve skupině benigní hyperplazie v porovnání se skupinou zdravých endometrií byla pouze u promotoru *GATA4* a *TWIST1* (*GATA4* $p < 0,001$; *TWIST1* $p < 0,05$). Naopak nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v míře metylace u promotoru *MUS81* a *NTRK1* mezi vzorky skupin benigní hyperplazie a zdravého endometria (tab. 3).

Diskuze

Karcinogeneze je obecně způsobena pozvolnými genetickými změnami,

kteří jsou závislé na množství vnitřních a vnějších faktorů. DNA metylace je epigenetický proces, který hraje důležitou roli v regulaci genové exprese a chromatinové struktury. V kontextu karcinogeneze dochází k různým změnám v DNA metylaci, což může ovlivnit regulaci genů a přispět k nekontrolovanému růstu buněk. Vzhledem ke své stabilitě v biologických vzorcích se DNA metylační změny jeví jako atraktivní biomarker různých typů onemocnění a jsou potenciálním cílem pro terapeutické intervence [11]. Všechny vzorky byly přezkoumány patologem, jenž se gynekologické onkologii věnuje dlouhodobě a systematicky. Vzhledem k tomu, že byl hodnocen pouze vybraný panel nádorových supresorových genů, mohli jsme analyzovat v jeden moment vybrané spektrum tumor supresorových genů.

Tato studie prokázala významné aberrantní změny v metylaci DNA tumor supresorových genů, konkrétně *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1*.

TWIST1

TWIST1 (twist family BHLH transcription factor 1) je gen, který kóduje transkripční faktor bHLH (basic helix-loop-helix). Tento faktor je zapojen do regulace genové exprese, regulace růstu a migrace buněk, angiogeneze a osteogeneze. Ovlivňuje procesy spojené s embryonálním vývojem a tvorbou orgánů. Za fyziologických podmínek je jeho exprese re-

gulována, ale v některých patologických stavech, vč. nádorových onemocnění, může docházet k její deregulaci, což může přispět k nádorovému růstu a invazi [12]. Mutace genu *TWIST1* je spojována s karcinomem prsu nebo také se Sézaryho syndromem, vzácným typem lymfomu kůže [13,14]. *TWIST1* byl identifikován jako jeden z faktorů zapojených do procesu epiteliálně-mezenchymální transformace (EMT), což je klíčový proces při invazi a metastazování nádorových buněk [15].

TWIST1 jako transkripční faktor může ovlivňovat i běžné buněčné procesy v endometriální tkáni. Byla zjištěna hormonální závislost exprese *TWIST1* v souvislosti s normální fyziologií endometria během menstruačního cyklu a byla také popsána spojitost hypometylace *TWIST1* genu s následnou expresí *TWIST* proteinu s patogenezi endometriózy [16]. Dále byla popsána významně vyšší exprese *TWIST1* u pacientek s atypickou hyperplazií a endometroidním karcinomem oproti kontrolní skupině zdravého endometria, naopak u exprese *TWIST1* mezi skupinami atypického endometria a endometroidního karcinomu již nebyl signifikantní rozdíl [17]. To koreluje s našimi výsledky metylace *TWIST1*, kdy byl statisticky významný rozdíl hypermetylace *TWIST1* genu ve skupině atypické hyperplazie (67,5 %) oproti skupině benigní hyperplazie (2,5 %) i skupině zdravých endometrií (22,5 %).

Expres *TWIST1* může dále úzce souviset s hloubkou nádorové invaze, metastazováním a prognózou u pacientek s endometroidním adenokarcinomem endometria [18]. S obdobnými závěry přichází studie zabývající se expresí *TWIST1* u kolorektálního karcinomu. Expres *TWIST1* zde významně koreluje s rizikem metastatického postižení, stadiem onemocnění a s tím souvisejícím kratším intervalem přežití a zdá se být klíčovým prediktorem progresu onemocnění [19].

GATA4

GATA4 je gen kódující protein GATA-binding protein 4. Tento protein patří do skupiny transkripčních faktorů GATA, která hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese, zejména během vývoje a diferenciace buněk. Gen *GATA4* je významný především v kontextu embryonálního vývoje, zejména pro správný vývoj a funkci srdce a trávicího systému [20].

GATA4 je také důležitý pro vývoj endokrinních orgánů, jako jsou vaječníky, nadledvinky a pankreas. Má vliv na správnou diferenciaci a funkci buněk v těchto orgánech [21].

Mutace, ztráta exprese nebo naopak nadměrná exprese faktorů *GATA4* jsou spojeny s celou řadou nádorových onemocnění, vč. leukemie, karcinomu prsu, rakoviny zažívacího traktu a dalších. Potlačení exprese *GATA4* na podkladě hypermetylace promotorových sekvencí byla popsána ve většině buněčných linií rakoviny tlustého střeva a žaludku a stejně tak i u velké části karcinomu jícnu a plic [22–25]. Metylace *GATA4* byla pozorována také u gynekologických malignit – karcinomů vaječníků a endometroidního karcinomu endometria [26]. Výsledky v této studii prokazují signifikantně vyšší metylaci *GATA4* (81,5 %) ve skupině karcinomů ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých endometrií (0 %) [26]. Všechny tyto závěry podporují hypotézu, že potlačení exprese *GATA4* na podkladě metylačních změn může přispívat k nádorové maligní transformaci.

Výsledky naší studie zaměřené na přednádorové stavy endometriální tkáně prokazují signifikantní rozdíly v metylacích *GATA4* u vzorků hyperplazie endometria s atypii (95,0 %) ve srovnání se zdravou tkání 22,5 %, stejně tak i v porovnání se vzorky benigní hyperplazie (65,0 %) Toto zjištění podporuje myšlenku významu metylace *GATA4* v karcinogenezi endometria [26].

MUS81

Gen *MUS81* není typicky považován za klasický tumor supresorový gen. *MUS81* kóduje protein *MUS81*, který hraje roli v opravě DNA a v replikaci genomu. *MUS81* může mít vliv na kontrolu buněčného cyklu, zejména na kontrolu G2/M fáze, kde dochází k finálním přípravám buňky na mitózu [27]. Zvláště v kontextu replikačního stresu, např. při rychlém buněčném dělení, může hrát *MUS81* významnou roli. Některé studie naznačují, že dysregulace *MUS81* nebo neobvyklá aktivace tohoto genu může být spojena s určitými typy nádorů [28]. Přesný charakter role *MUS81* v onkogenezi a jeho případná úloha v tvorbě nádorů jsou stále předmětem výzkumu.

Expres *MUS81* byla popsána u hormonálně rezistentního karcinomu prostaty, karcinomu žaludku, hepatocelulárního karcinomu, karcinomu tlustého střeva nebo u serózního ovariálního karcinomu. Všechny tyto studie se dále shodují, že *MUS81* má velmi významný vliv na protinádorový účinek chemoterapeutické léčby a jeho inhibice, případně popisovaný knockdown by mohly zvýšit chemosenzitivitu nádorových buněk [29–32]. Proto by *MUS81* mohl představovat nový molekulární cíl pro chemoterapii některých nádorů [33].

MUS81 a jeho případné metylace v souvislosti s hyperplazií endometria či endometriálním karcinomem nebyly v literatuře popsány. V naší studii vyšel statisticky významný rozdíl v DNA metylaci *MUS81* mezi skupinami atypické hyperplazie, benigní hyperplazie a zdravého endometria (atypická hyperpla-

zie 57,5 %; benigní hyperplazie 22,5 %; zdravé endometrium 5,0 %).

NTRK1

NTRK1 je gen, který kóduje receptor s názvem tropomyosin receptor kináza A (TrkA). TrkA je členem rodiny neurotrofních receptorů, které jsou známé také jako neurotrofní receptorová tyrosinkináza. Za fyziologických podmínek regulují synapse v nervovém systému. Dochází-li k fúzi v rámci této skupiny genů, spustí se buněčná signální kaskáda, která může ovlivnit mnoho buněčných funkcí, vč. buněčného růstu, přežití a diferenciace neuronů během vývoje nervového systému [34,35].

Mutace v genu *NTRK1*, které vedou ke změnám v proteinu TRKA, mohou mít různé biologické důsledky, mohou přispívat k vývoji nádorů, jako je např. sekreční karcinom slinných žláz nebo papilární karcinom štítné žlázy, nebo se mohou projevovat rozvojem některých neurologických poruch, např. familiární dysautonomie (FD). Gen *NTRK1* byl opakovaně zmiňován u děložních sarkomů, u subtypu s tzv. rekurentními genetikými fúzemi, jako je low-grade endometriální stromální sarkom (LGESS), high-grade endometriální stromální sarkom (HGESS) a inflamatorní myofibroblastický tumor (IMT). Incidence těchto nádorů se vzhledem k rostoucí dostupnosti molekulárního testování bude pravděpodobně dále zvyšovat [36,37]. V pátém vydání klasifikace nádorů ženských pohlavních orgánů WHO 2020 jsou klasifikovány nově vznikající jednotky, tzv. emerging entities, což jsou případy vřetenobuněčných nádorů dělohy s přestavbou genu *NTRK1* [38]. *NTRK1* byl dále zmíněn ve vztahu s jeho častější amplifikací u endometriálního karcinomu ve spojitosti s užíváním tamoxifenu (TAM) [39]. Spojitost *NTRK1* a patologií endometria není dostatečně prozkoumána. Vztah hyperplazie endometria a metylace DNA *NTRK1* nebyl doposud publikován. Z našich zjištěných výsledků je jasně patrný trend nárůstu frekvence

metylací DNA *NTRK1* v jednotlivých typech hyperplazie ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých endometrií (10,0 %) vs. benigní hyperplazie (27,5 %) a atypické hyperplazie (65,0 %). Naše nálezy jsou v tomto ohledu prioritní.

V rámci onkologického screeningu je dnes již možné využití metylačních změn některých konkrétních genů. Některé jsou již v praxi zavedené, jiné jsou zkoumány v rámci studií a experimentů. Nejvíce využívané jsou v rámci screeningu kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, karcinomu plic či leukemie. Díky detekci metylace DNA příslušných genů v tělních tekutinách, například krevní plazmě, je možné volit tento minimálně invazivní přístup. Příkladem může být screening kolorektálního karcinomu průkazem metylace *SEPT9* v plazmě [40].

Závěr

Naše výsledky prokazují metylační změny DNA u tumor supresorových genů *TWIST1*, *GATA4*, *MUS81* a *NTRK1*. Předpokládáme, že by identifikace specifických vzorců DNA metylace u jednotlivých pacientek mohla vést k další personalizaci léčebného přístupu, který by zohledňoval individuální genetické a epigenetické charakteristiky tohoto nejčastějšího gynekologického nádoru.

Literatura

- Singh G, Puckett Y. Endometrial Hyperplasia. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2024.
- Hsu YT, Gu F, Huang YW et al. Promoter hypomethylation of EpCAM-regulated bone morphogenetic protein gene family in recurrent endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(22): 6272–6285. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1734.
- Chandra V, Kim JJ, Benbrook DM et al. Therapeutic options for management of endometrial hyperplasia. *J Gynecol Oncol* 2016; 27(1): e8. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e8.
- Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985; 56(2): 403–412. doi: 10.1002/1097-0142(19850715)56:2<403::aid-cnrcr2820560233>3.0.co;2-x.
- Montgomery BE, Daum GS, Dunton CJ. Endometrial hyperplasia: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59(5): 368–378. doi: 10.1097/0000-6254-200405000-00025.
- Lacey JV Jr, Chia VM. Endometrial hyperplasia and the risk of progression to carcinoma. *Maturitas* 2009; 63(1): 39–44. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.02.005.
- Lacey JV Jr, Chia VM, Rush BB et al. Incidence rates of endometrial hyperplasia, endometrial cancer and hysterectomy from 1980 to 2003 within a large prepaid health plan. *Int J Cancer* 2012; 131(8): 1921–1929. doi: 10.1002/ijc.27457.
- Nieminen TT, Gylling A, Abdel-Rahman WM et al. Molecular analysis of endometrial tumorigenesis: importance of complex hyperplasia regardless of atypia. *Clin Cancer Res* 2009; 15(18): 5772–5783. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0506.
- Dvorak O, Ndukwe M, Slavickova M et al. DNA methylation of selected tumor suppressor genes in endometrial hyperplasia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2024; 168(1): 68–73. doi: 10.5507/bp.2022.053.
- Pavacic W, Perkiö E, Kaur S et al. 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; 17(7–8): 726–735. doi: 10.2119/molmed.2010.00239.
- Trimarchi MP, Yan P, Groden J et al. Identification of endometrial cancer methylation features using combined methylation analysis methods. *PLoS One* 2017; 12(3): e0173242. doi: 10.1371/journal.pone.0173242.
- Khan MA, Chen HC, Zhang D et al. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol* 2013; 34(5): 2497–2506. doi: 10.1007/s13277-013-1002-x.
- Martin TA, Goyal A, Watkins G et al. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005; 12(6): 488–496. doi: 10.1245/ASO.2005.04.010.
- van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH et al. Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sézary syndrome identified by gene expression analysis. *Cancer Res* 2004; 64(16): 5578–5586. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1253.
- Roberts CM, Tran MA, Pitruzzello MC et al. *TWIST1* drives cisplatin resistance and cell survival in an ovarian cancer model, via upregulation of GAS6, L1CAM, and Akt signalling. *Sci Rep* 2016; 6: 37652. doi: 10.1038/srep37652.
- Juanqing L, Hailan Y, Xiangwei F et al. Relationship between the methylation levels of Twist gene and pathogenesis of endometriosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2019; 65(3): 94–100.
- Shen J, Chen Q, Li N et al. *TWIST1* expression and clinical significance in type I endometrial cancer and premalignant lesions: a retrospective clinical study. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99(48): e23397. doi: 10.1097/MD.00000000000023397.
- Wang XJ, Chen XH. Expression and significance of *TWIST1* and MMP-2 in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2012; 34(8): 588–591. doi: 10.3760/cm.a.j.issn.0253-3766.2012.08.006.
- Yusup A, Huji B, Fang C et al. Expression of trefoil factors and *TWIST1* in colorectal cancer and their correlation with metastatic potential and prognosis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(1): 110–120. doi: 10.3748/wjg.v23.i1.110.
- Perrino C, Rockman HA. *GATA4* and the two sides of gene expression reprogramming. *Circ Res* 2006; 98(6): 715–716. doi: 10.1161/01.RES.0000217593.07196.af.
- Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 38949–38952. doi: 10.1074/jbc.R000029200.
- Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H et al. *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; 23(23): 8429–8439. doi: 10.1128/MCB.23.23.8429-8439.2003.
- Guo M, Akiyama Y, House MG et al. Hypermethylation of the *GATA* genes in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(23): 7917–7924. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1140.
- Guo M, House MG, Akiyama Y et al. Hypermethylation of the *GATA* gene family in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(9): 2078–2083. doi: 10.1002/ijc.22092.
- Wen XZ, Akiyama Y, Pan KF et al. Methylation of *GATA-4* and *GATA-5* and development of sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2010; 16(10): 1201–1208. doi: 10.3748/wjg.v16.i10.1201.
- Chmelarova M, Kos S, Dvorakova E et al. Importance of promoter methylation of *GATA4* and *TP53* genes in endometrioid carcinoma of endometrium. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(8): 1229–1234. doi: 10.1515/cclm-2013-0162.
- Lukaszewicz A, Howard-Till RA, Loidl J. *MUS81* nuclease and Sgs1 helicase are essential for meiotic recombination in a protist lacking a synaptonemal complex. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(20): 9296–9309. doi: 10.1093/nar/gkt703.
- Chen S, Geng X, Syeda MZ et al. Human *MUS81*: a fence-sitter in cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 657305. doi: 10.3389/fcell.2021.657305.
- Gong L, Tang Y, Jiang L et al. Expression of *MUS81* mediates the sensitivity of castration-resistant prostate cancer to olaparib. *J Immunol Res* 2022; 2022: 4065580. doi: 10.1155/2022/4065580.
- Lu R, Xie S, Wang Y et al. *MUS81* participates in the progression of serous ovarian can-

cer associated with dysfunctional DNA repair system. *Front Oncol* 2019; 9: 1189. doi: 10.3389/fonc.2019.01189.

31. Wang T, Zhang P, Li C et al. *MUS81* inhibition enhances the anticancer efficacy of talazoparib by impairing ATR/CHK1 signaling pathway in gastric cancer. *Front Oncol* 2022; 12: 844135. doi: 10.3389/fonc.2022.844135.

32. Wu F, Su SC, Tan GQ et al. *MUS81* knockdown sensitizes colon cancer cells to chemotherapeutic drugs by activating CHK1 pathway. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2017; 41(5): 592–601. doi: 10.1016/j.clinre.2017.01.011.

33. Xie S, Zheng H, Wen X et al. *MUS81* is associated with cell proliferation and cisplatin sensitivity in serous ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 476(4): 493–500. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.152.

34. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986; 319(6056): 743–748. doi: 10.1038/319743a0.

35. O'haira S, Franchini F, Kang YJ et al. Systematic review of NTRK 1/2/3 fusion prevalence pancreatic and across solid tumours. *Sci Rep* 2023; 13(1): 4116. doi: 10.1038/s41598-023-31055-3.

36. Croce S, Hostein I, McCluggage WG. NTRK and other recently described kinase fusion positive uterine sarcomas: a review of a group of rare neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2021; 60(3): 147–159. doi: 10.1002/gcc.22910.

37. Mohammad N, Stewart CJ, Chiang S et al. p53 immunohistochemical analysis of fusion-positive uterine sarcomas. *Histopathology* 2021; 78(6): 805–813. doi: 10.1111/his.14292.

38. Grant L, Boyle W, Williams S et al. Uterine neurotrophic tyrosine receptor kinase rearranged spindle cell neoplasms: three cases of an emerging entity. *Int J Gynecol Pathol* 2023; 43(4): 326–334. doi: 10.1097/PGP.0000000000000988.

39. Saeki H, Horimoto Y, Hlaing MT et al. Clinicopathological and molecular pathological characteristics in tamoxifen-related endometrial cancer. *Oncol Lett* 2024; 27(1): 9. doi: 10.3892/ol.2023.14142.

40. Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(10): 1707–1721. doi: 10.1515/cclm-2011-0935.

ORCID autorů

O. Dvořák 0000-0003-1372-3729

M. Štěpán 0000-0002-5976-2291

J. Laco 0000-0002-9602-7501

M. Slavičková 0000-0002-7891-9979

E. Čermáková 0000-0003-3413-4149

Doručeno/Submitted: 21. 4. 2024

Přijato/Accepted: 23. 5. 2024

MUDr. Ondřej Dvořák

Porodnická a gynekologická klinika

LF UK a FN Hradec Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

ondrej.dvorak@fnhk.cz

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

Publication ethics: The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.

Konflikt zájmů: Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.

Conflict of interests: The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.

Dedikace: Podpořeno Ministerstvem zdravotnictví ČR – koncepční rozvoj výzkumné organizace: projekt UHHK, 00179906, projektem BBMRI-CZ LM2023033, Evropským fondem pro regionální rozvoj – projekt BBMRI-CZ: EF16_013/0001674 a programem Cooperatio, vědní oblast DIAG.

Dedication: Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of a research organization: project UHHK, 00179906, project BBMRI-CZ LM2023033, European Fund for Regional Development – project BBMRI-CZ: EF16_013/0001674 and Cooperatio program, scientific area DIAG.