Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Petr Milt

Význam detekce volné cirkulující HPV DNA
The importance of cell-free HPV DNA detection

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Martina Saláková, PhD.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, 1.5.2023

Podpis: Petr Milt

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval především své školitelce RNDr. Martině Salákové, PhD za její ochotu a vstřícnost a dále pak své rodině za veškerou podporu.

Abstrakt

Lidské papilomaviry (HPV) jsou malé, neobalené DNA viry hojně se vyskytující v populaci. Přenáší se sexuálním nebo jiným blízkým kontaktem sliznic a kůže. Papilomaviry mohou vyvolávat vznik bradavic a lézí na kůži a sliznicích. Vysoce-rizikové typy HPV, především HPV 16 a 18, jsou navíc asociované s karcinomy dlaždicových buněk jako je karcinom děložního hrdla, orofaryngeální karcinom a karcinomy vulvy, anu, penisu a vaginy. Včasná detekce a správný odhad rizika rekurencí onemocnění jsou klíčové pro účinnou léčbu. Potenciál v nádorové diagnostice má volná cirkulující DNA, která se z buněk uvolňuje do tělních tekutin. Právě volná cirkulující HPV DNA v krvi pacientů s nádory asociovanými s HPV se v současnosti ukazuje jako slibný a velmi citlivý biomarker, vhodný především pro sledování účinnosti léčby a včasné odhalení rizika rekurence.

Klíčová slova: HPV, karcinogeneze, cfDNA, cfHPV DNA, význam detekce, karcinom děložního hrdla, orofaryngeální karcinom

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are small, nonenveloped DNA viruses that are abundant in the population. They are sexually transmitted or spread by close contact with mucosa and skin. Papillomaviruses can cause lesions and warts on the skin and mucosa. In addition, high-risk HPV types, especially HPV 16 and 18, are associated with squamous cell carcinomas such as cervical cancer, oropharyngeal cancer and carcinomas of the vulva, anus, penis and vagina. Early detection and the right evaluation of the risk of recurrence are crucial for effective treatment. Cell-free DNA released from cells into body fluids has potential in cancer diagnosis. Cell-free circulating HPV DNA, in the blood of patients with HPV-associated cancers is a promising and highly sensitive biomarker, useful for monitoring treatment efficiency, early detection of the disease and estimation of recurrence risk.

Key words: HPV, carcinogenesis, cfDNA, cfHPV DNA, significance of detection, cervical cancer, oropharyngeal cancer

Obsah

1. Úvod 1
2. Lidské papilomaviry 2
2.1. Struktura virionů 2
2.2. Genom 3
2.3. Časné proteiny HPV 5
2.4. Životní cyklus 6
2.5. Onkogenní potenciál a mechanismus karcinogeneze 7
2.5.1. Protein E5 7
2.5.2. Protein E6 8
2.5.3. Protein E7 9
2.6. Nádory způsobené HPV 10
2.6.1 Karcinom děložního hrdla 12
2.6.2 Orofaryngeální karcinom dlaždicových buněk 13
3. Volná cirkulující DNA 13
3.1. Struktura a vlastnosti cfDNA 14
3.2. Cirkulující nádorová DNA 15
3.3. Význam detekce ctDNA 16
4. Volná cirkulující HPV DNA 17
4.1. Detekce cfHPV DNA u pacientů s CC 17
4.1.1. Význam detekce v době diagnózy u pacientů s CC 18
4.1.2. Význam detekce během léčby a po ní pacientů s CC 18
4.2. Detekce cfHPV DNA u pacientů s OPSCC 19
4.2.1. Význam detekce v době diagnózy u pacientů s OPSCC 19
4.2.2. Význam detekce během léčby a po ní u pacientů s OPSCC 19
4.3. Metody detekce cfHPV DNA 20
5. Závěr 21
6. Použitá literatura 22

Seznam použitých zkratek

zkratka	anglický název	český název
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
C konec	carboxyl-terminus	karboxylový konec proteinu
CC	cervical cancer	rakovina děložního hrdla
cfDNA	cell-free DNA	volná cirkulující DNA
CBP	CREB-binding protein	protein vázající CREB
ctDNA	cell-tumor DNA	volná nádorová DNA
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction	kapková digitální polymerázová řetězová reakce
dsDNA	double strand DNA	dvouvláknová DNA
E2F	E2F transcription factors family	rodina transkripčních faktorů E2F
E6AP	E6AP ubiquitin-protein ligase	E6AP protein ubikvitin ligáza
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	EGF receptor	receptor pro EGF
FasL	Fas ligand	Fas ligand
HR-HPV	high risk HPV	vysoce-rizikové typy HPV
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
IFN-α	interferon type I α	interferon (typu I) alfa
LoD	limit of detection	limit detekce
LR-HPV	low risk HPV	nízko-rizikové typy HPV
MAP kináza	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MHC I	major histocompatibility complex class I	hlavní histokompatibilní komplex třídy I
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
N konec	amino-terminus	konec proteinu s aminovou skupinou
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál

NETs	neutrophil extracellular traps	extracelulární pasti neutrofilů
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma	karcinom dlaždicových buněk orofaryngu
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
Ori	origin of replication	počátek replikace
p21	p21 protein	protein p21
p300	p300 protein	protein p300
p53	p53 protein	protein p53
pb	base pairs	páry bází
PET/CT	positron emission tomography - computed tomography	pozitronová emisní a RTG počítačová tomografie
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
TGF-β	transforming growth factor β	transformační růstový faktor β
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TNF související, apoptózu indukující ligand
URR	upstream regulatory region	regulační oblast
VLP	virus-like particles	částice podobné virům

1. Úvod

Lidské papilomaviry jsou malé, neobalené DNA viry, které infikují bazální epiteliální buňky sliznic nebo kůže, a jejich životní cyklus je úzce spojen s diferenciací těchto buněk. Infekce HPV bývá často bezpříznaková, může ale vést ke vzniku lézí nebo bradavic a v případě vysoce-rizikových typů HPV i k rozvoji karcinomů. Nejčastějšími nádory asociovanými s HPV jsou: karcinom děložního hrdla, orofaryngeální karcinom, dále pak karcinom anu, vulvy, penisu a vaginy (de Martel et al., 2020). V procesu vzniku nádoru mají hlavní roli papilomavirové onkoproteiny E5, E6 a E7. Hlavní funkcí onkoproteinu E6 je vazba a degradace proteinu p53 (Scheffner et al., 1993). E7 se oproti tomu váže na protein pRB, což vede k uvolnění transkripčního faktoru E2F (Dyson et al., 1989). Společně tak mohou onkoproteiny buňku imortalizovat a konstantně iniciovat vstup do S fáze buněčného cyklu. Velmi častým jevem u HPV asociovaných nádorů je integrace HPV DNA do genomu hostitelské buňky, integrace nicméně není součástí životního cyklu viru (Cullen et al., 1991). Tento proces může vést ke ztrátě negativní regulace a následné neřízené expresi virových onkoproteinů, což může být klíčová událost v procesu vzniku nádoru (Dowhanick et al., 1995). Ale i samotná integrace může přispívat k nádorové transformaci (Akagi et al., 2014; Kadaja et al., 2007).

V poslední době se u nádorových onemocnění ukazuje výhodnost tekutých biopsií zaměřených na detekci volné cirkulující DNA. Ta může například nést různé, pro nádor specifické, mutace. V případě nádorů asociovaných s HPV bývá součástí volné cirkulující DNA i papilomavirová DNA pocházející z buněk nádoru, a právě její detekce může mít velký význam v klinické praxi (Chera et al., 2020; Jeannot et al., 2021).

Cílem této bakalářské práce je stručně charakterizovat problematiku HPV a HPV asociovaných nádorů a zaměřit se na volnou cirkulující HPV DNA, konkrétně na její charakteristiky, metody detekce a především význam její detekce.

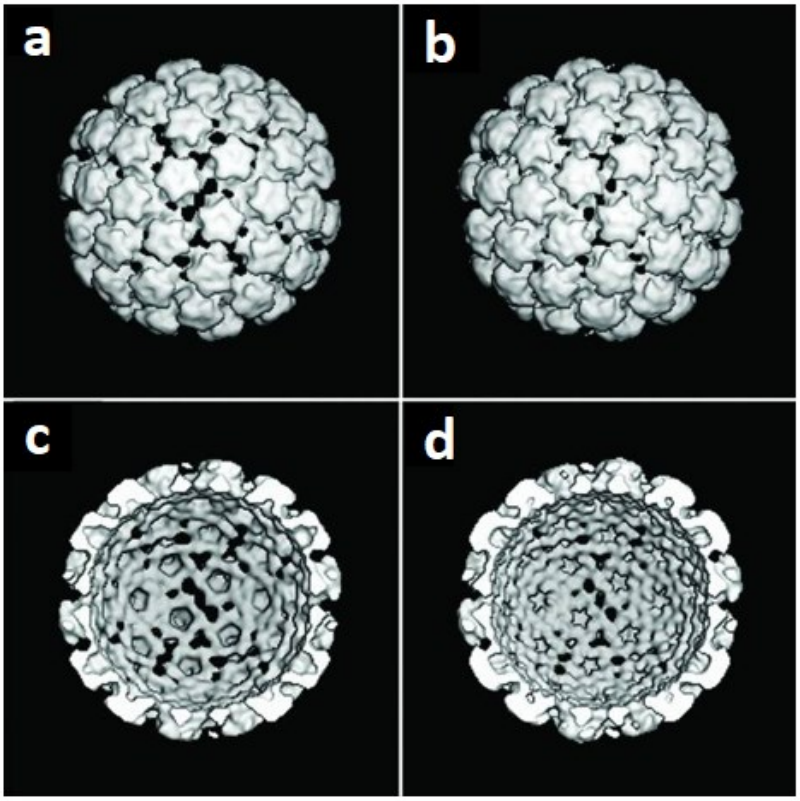
2. Lidské papilomaviry

Lidské papilomaviry jsou malé neobalené viry s DNA genomem, které se hojně vyskytují v populaci. Řadí se do čeledi *Papillomaviridae* a dělí se do pěti fylogenetických rodů: Alfa, Beta, Gamma, Mu a Nupapilomaviry. Toto dělení je odvozeno od podobnosti nukleotidové sekvence ORF pro kapsidový protein L1 (ORF z angl. open reading frame - otevřený čtecí rámec) (De Villiers et al., 2004). V současné době je podle databáze PaVE známo přes 450 typů HPV genomů, u nichž se ORF pro L1 liší o více než 10 % (https://pave.niaid.nih.gov), z nichž některé nevyvolávají žádné onemocnění, jiné mohou způsobovat vznik lézí a bradavic a některé jsou asociované s nádory dlaždicových epitelů, především s karcinomem děložního hrdla a orofaryngeálním karcinomem (de Martel et al., 2017). Podle potenciálu vyvolávat nádory se lidské papilomaviry dělí na nízko-rizikové, zkráceně LR-HPV (z ang. low risk), které působí pouze benigní léze a vysoce-rizikové, zkráceně HR-HPV (z angl. high risk), schopné iniciovat vznik nádorů. Mezi HR-HPV patří HPV typu 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 a 73 (de Martel et al., 2017). Papilomaviry se také dělí podle jejich tkáňového tropismu na typy kožní a slizniční.

2.1. Struktura virionů

Kapsidy HPV jsou neobalené, ikosahedrální částice, o průměru okolo 50-60 nm (Chen et al., 2000; Hagensee et al., 1994). Každá virová částice se skládá ze 72 pentamerů hlavního kapsidového proteinu L1, který je schopný tvořit VLP (z angl. virus-like particle) (Kirnbauer et al., 1992).

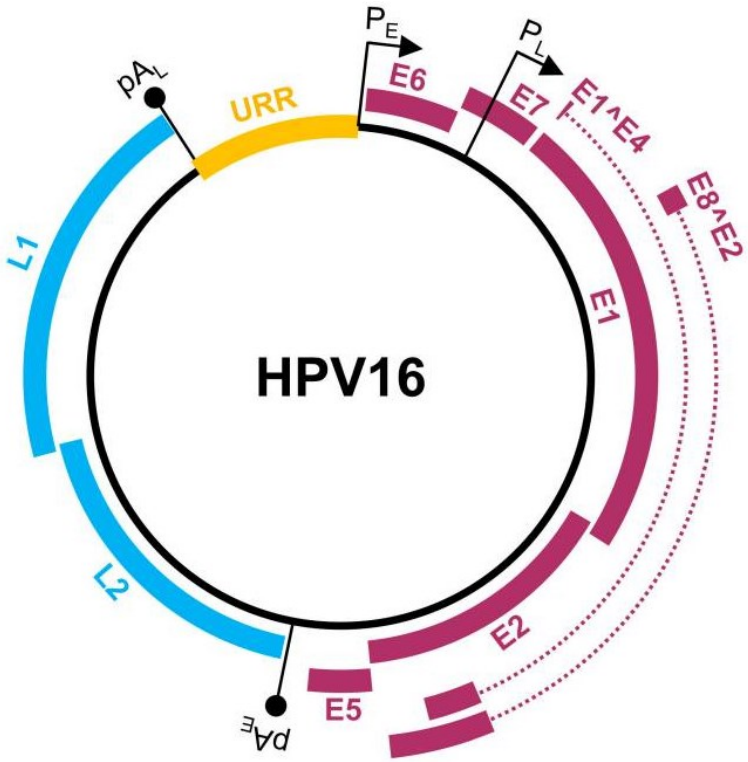
Druhý protein nacházející se ve virionu je minoritní kapsidový protein L2 (Obr. 1). Jeho početní zastoupení je stále nejasné. Zatímco starší studie uváděly 12 L2 proteinů na 1 virion, v současnosti se odhaduje až 72, tedy poměr 1:5 s proteinem L1 (Buck et al., 2008; Hagensee et al., 1993). Protein L2 napomáhá sestavování VLP a také usnadňuje enkapsidaci virového genomu, zároveň je L2 štěpen furinovou proteázou, což je důležitý krok v infekčním cyklu HPV (Richards et al., 2006; Roden et al., 1996). Papilomavirové kapsidy prochází, na rozdíl od kapsid mnoha jiných virů, velmi pomalým procesem zrání. Nicméně se zdá, že i nezralé viriony mohou být, navzdory nestabilitě, srovnatelně infekční (Buck et al., 2005).



Obr. 1.: Počítačová rekonstrukce kapsid HPV na základě kryoelektronové mikroskopie, (a, c) - kapsida pouze s L1, (b, d) - kapsida s L1+L2. Panely (a, b) ukazují vnější pohled na kapsidy, panely (c, d) zobrazují řez kapsidami, převzato z (Buck et al., 2008), upraveno

2.2. Genom

Lidské papilomaviry mají cirkulární dvouřetězcový DNA genom o velikosti okolo 8 000 párů bazí (8 kbp), který lze rozdělit na tři funkční oblasti - regulační oblast URR (z angl. upstream regulatory region), dále na oblast časných genů E (z ang. early) a na oblast pozdních genů L (z angl. late). Obě oblasti E i L mají vlastní promotorovou oblast a polyadenylační signál (Obr. 2).



Obr. 2.: Organizace genomu HPV 16, PE a PL označuje promotory časných a pozdních genů, pAE a pAL značí polyadenylační místa časných a pozdních genů, červeně jsou značeny časné a modře pozdní geny, žlutě je regulační oblast, převzato z (Yu et al., 2022)

URR má u jednotlivých typů HPV různou délku. Je to oblast, ve které se nachází vazebná místa pro virové proteiny E1 a E2, které slouží k zahájení replikace virového genomu (Sverdrup & Khan, 1994). Zároveň se v URR nachází místo počátku replikace virové DNA (Ori). Oblast časných genů (E) kóduje obvykle 6-8 ORF pro virové nestrukturální proteiny: E1, E2, E5, E6, E7, E1^E4 a E8^E2. V oblasti pozdních genů (L) se nachází ORF pro strukturní kapsidové proteiny L1 a L2 (https://pave.niaid.nih.gov).

Všechny ORF časných i pozdních genů se nacházejí na stejném vlákně dvouřetězcového genomu, proto je transkripce papilomavirů jednosměrná a probíhá pouze z jednoho vlákna (Xue et al., 2017). Papilomaviry využívají k expresi proteinů různé alternativní sestřihy RNA, i přesto je ale vzniklá mRNA obvykle bicistronní nebo polycistronní (Yu et al., 2022).

2.3. Časné proteiny HPV

E1 protein je velmi konzervovaný napříč různými typy HPV a je jediným papilomavirovým proteinem s enzymatickou aktivitou. Jde o protein, který má helikázovou a ATPázovou aktivitu a také DNA vazebnou doménu (Hughes & Romanos, 1993). E1 proteiny jsou klíčové pro virovou replikaci. Za účasti proteinů E2 vytváří hexamery a díky helikázové aktivitě rozvolňují vlákna DNA (Sedman et al., 1997). Zároveň E1 proteiny interagují s DNA polymerázou α a dalšími buněčnými proteiny a umožňují tak sestavení komplexu pro iniciaci replikace. (Conger et al., 1999).

E2 protein má transaktivační a DNA vazebnou doménu a je proteinem nezbytným pro iniciaci replikace a zároveň je důležitým transkripčním regulátorem. E2 je důležitý pro vazbu E1 proteinu do oblasti zahájení replikace (Sedman et al., 1997). Zároveň může interagovat s celou řadou buněčných proteinů, jako jsou například sestřihové faktory nebo topoizomeráza I (Clower et al., 2006; Lai et al., 1999). E2 protein je zároveň represorem hlavních virových onkogenů E6 a E7, proto je ztráta jeho funkce často spojována se vznikem HPV asociovaných nádorů (Dowhanick et al., 1995).

E8^E2 protein sestává z krátkého peptidu z E8 ORF, asociovaného s C koncem E2, přičemž E8 část může vázat transkripční korepresory a E2 část umožňuje vazbu na DNA. Tento protein je mnohem účinnějším represorem časného promotoru než protein E2 a blokuje tak expresi papilomavirových onkoproteinů i replikačních proteinů E1 a E2 (Stubenrauch et al., 2000). Potlačuje nejen virovou transkripci, ale i replikaci, což slouží k udržení nízké virové aktivity a nízkého počtu kopií genomu u přetrvávajících infekcí a ve spodních vrstvách nediferencovaných buněk epitelu (Dreer et al., 2017).

E1^E4, nebo jen **E4 protein** vzniká translací ze sestřižené E1^E4 mRNA a jde o nejvíce exprimovaný papilomavirový protein, a to především v horních vrstvách diferencujících se infikovaných buněk (Chow et al., 1987). Přestože je gen lokalizován v časné oblasti, k expresi proteinu dochází až v pozdních fázích infekce. Má schopnost vázat a rozkládat cytokeratin, což vede k destabilizaci keratinizujících buněk a napomáhá to uvolňování virionů (Doorbar et al., 1991). Zároveň protein E1^E4 způsobuje zastavení buněčného cyklu v diferencovaných buňkách v G2 fázi, což pravděpodobně slouží ke zvýšení replikace virových genomů (Davy et al., 2002).

Proteiny E5, E6 a E7 mají hlavní onkogenní potenciál a budou podrobně probrány v kapitole 2.5.

2.4. Životní cyklus

HPV jsou vysoce specializované viry a jejich životní cyklus je úzce spojen s diferenciací epiteliálních buněk. To mimo jiné zahrnuje udržování nízké virové aktivity v buňkách hlubších vrstev epitelu, které jsou v kontaktu s imunitním systémem, a naopak velkou expresi pozdních proteinů a sestavování virionů v horních, terminálně diferencovaných buňkách.

HPV infikuje aktivně se dělící bazální nebo kmenové epiteliální buňky, přičemž do bazální vrstvy obvykle virus proniká drobnými poraněními. Vstup do buňky začíná navázáním kapsidového proteinu L1 na heparin sulfátové proteoglykany v bazální vrstvě (Joyce et al., 1999). To vede ke konformační změně kapsidy a vysunutí L2 proteinu. Jeho N-koncová doména je posléze štěpena furinem nebo jinou proteázou a následně se kapsida váže na sekundární receptor na povrchu epiteliálních buněk (Richards et al., 2006). Poté je virus endocytován, kapsida je rozvolněna a virový genom asociovaný pouze s L2 proteiny uniká z endozomu a dostává se do trans-Golgi sítě (Day et al., 2013).

Během mitózy se pak viriony dostávají do jádra, kde dochází k uvolnění virových genomů, které zde setrvávají v extrachromozomální formě (DiGiuseppe et al., 2016). Následuje syntéza časných proteinů E1 a E2, které slouží k iniciaci replikace virové DNA. Vzniká jen nízký počet kopií virového genomu, které se při dělení dostávají spolu s hostitelskou DNA do dceřiných buněk (Coursey & McBride, 2019). Proteiny E5, E6 a E7 modifikují proliferaci a diferenciaci buněk ve prospěch viru, jsou schopné v buňkách, které již opustily bazální vrstvu, opětovně vyvolávat vstup do buněčného cyklu a zároveň zprostředkovávají obranu před imunitním systémem (Zhou et al., 2015).

V pozdních fázích infekce, během finální diferenciace hostitelských buněk dochází k produktivní replikaci virové DNA a k syntéze pozdních proteinů (Graham, 2017; Wang et al., 2017). To znamená, že papilomaviry potřebují namnožit svůj genom v diferencovaných buňkách, které svůj buněčný cyklus již zastavily a nejsou tedy schopné replikovat DNA. Papilomaviry proto signalizují poškození DNA a buněčné opravné mechanismy pak využívají ke svojí replikaci (Moody & Laimins, 2009).

V horních vrstvách epitelu dochází k sestavování virionů, které se při odlučování keratinocytů uvolňují do okolí (Doorbar et al., 1991).

2.5. Onkogenní potenciál a mechanismus karcinogeneze

Existuje mnoho důkazů o nádorech vyvolaných vysoce-rizikovými typy HPV a to především alfapapilomaviry, které jsou zodpovědné za cca 5 % všech případů rakoviny (de Martel et al., 2017). Přesto je ale přechod od HPV infekce k nádorové transformaci poměrně vzácný (Stanley, 2010). Zdá se, že důležitou roli ve vzniku karcinomu má dlouhodobá přetrvávající infekce bazálních buněk a zvýšená nebo nekontrolovatelná exprese papilomavirových onkoproteinů E6 a E7. Tyto proteiny mimo jiné interagují s pRb a degradují p53 (Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1993), čímž účinně stimulují proliferaci a zpomalují diferenciaci buněk. Obzvláště u HR-HPV může nadprodukce E6 a E7 vést k abnormální buněčné proliferaci, indukovat chromozomální nestabilitu a vést tak až k nádorovým transformacím (Coursen et al., 1997; Duensing & Münger, 2002).

Velmi častým jevem u HPV asociovaných nádorů je integrace virové DNA do genomu hostitele (Cullen et al., 1991). Zdá se, že integrace je náhodný proces a jednotlivé případy se od sebe liší, v lidském genomu nicméně existují integrační „hot spots“, tedy místa, ve kterých dochází ke vložení virové DNA s vyšší pravděpodobností (Kamal et al., 2021). Během integrace virové DNA může dojít ke vložení genů pro virové onkoproteiny do hostitelského chromozomu a ztrátě exprese E2 proteinu, což může vést k nekontrolovatelné expresi onkoproteinů E6 a E7 (Dowhanick et al., 1995). Navíc se zdá, že u integrovaných virových genomů může být v ori zahájena E1, E2 závislá replikace zasahující až do hostitelské DNA, to může vést k dalším rekombinacím a přestavbám hostitelské genetické informace v místě integrace virové DNA (Kadaja et al., 2007). Podobné procesy a vznik DNA konkatemerů popisuje ve své studii i Akagi a kol. (Akagi et al., 2014). Na vznik nádoru mají vliv i modifikace histonů nebo metylace DNA, která může například umlčovat transkripci tumor supresorových proteinů (Gustafson et al., 2004). To vše může nastartovat proces vzniku HPV asociovaných nádorů. Uvažují se ale i další způsoby jakými mohou HPV vyvolávat karcinogenezi, například nedávno popsaná E2/E4/E5 závislá dráha (Ren et al., 2020).

V následujících podkapitolách budou podrobněji probrány papilomavirové onkoproteiny E5, E6 a E7.

2.5.1. Protein E5

E5 je přítomen pouze u Alfapapilomavirů. Jde o malý, hydrofobní, transmembránový protein se slabými transformačními schopnostmi (Bubb et al., 1988). Obvykle se nachází

v membráně endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, endozomů, ale i v jaderné membráně (Conrad et al., 1993).

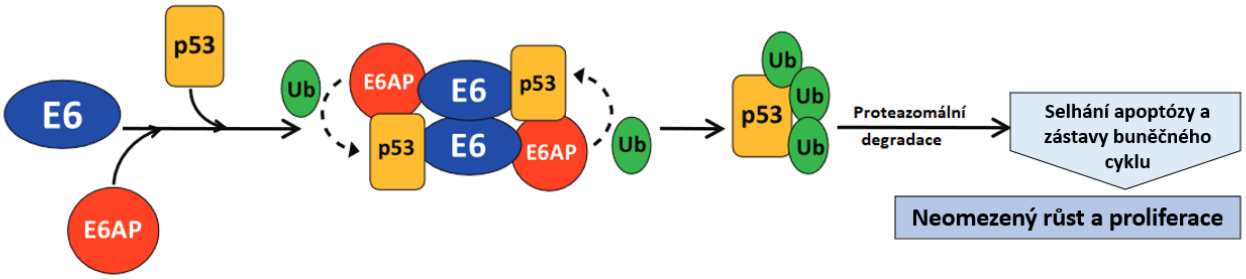
Jedna z funkcí E5 je schopnost interagovat s EGFR a zvyšovat tak jeho aktivitu. To vede k aktivaci MAP kináz, což posléze může vést až k buněčné proliferaci (Crusius et al., 1998). E5 protein je zároveň díky své hydrofobnosti schopný vázat mnoho proteinů, mimo jiné membránovou H+ ATPázu, uvažuje se tak o schopnosti E5 snížit její činnost a tím i snížit aciditu v endozomech, což by mohlo mimo jiné ovlivnit účinnost recyklace EGFR, to ale zatím nebylo dostatečně potvrzeno (Adam et al., 2000; Andresson et al., 1995). E5 může také blokovat apoptózu zprostředkovanou TRAIL nebo Fas ligandem (Kabsch & Alonso, 2002). Dále je také schopný snižovat množství MHC I proteinů vystavených na povrchu buňky, a tak snižovat pravděpodobnost rozpoznání antigenu CD8+ T lymfocyty (Campo et al., 2010).

Přestože E5 nedokáže sám o sobě vyvolat imortalizaci buněk, na myším modelu bylo prokázáno, že přítomnost E5, E6 a E7 indukuje tvorbu nádorů více než samotné proteiny E6 a E7 (Genther Williams et al., 2005).

2.5.2. Protein E6

Spolu s E7 je E6 nejzásadnějším papilomavirovým onkoproteinem a bylo prokázáno, že samotný E6 je schopný imortalizovat buňky, především díky degradaci p53 (Band et al., 1991). Jde o protein velký přibližně 150 aminokyselin, který má ve své struktuře dvě domény vázající zinek, z nichž každá obsahuje dvě zinek vázající sekvence Cystein-X-X-Cystein (X značí libovolnou aminokyselinu) (Barbosa et al., 1989). E6 může být transkribován jako mRNA celé délky, nebo jako nějaká z možných sestřižených variant E6 mRNA (PaVE).

Asi nejzásadnější schopností E6 HR-HPV je schopnost interagovat s proteinem p53 a indukovat jeho degradaci. P53 je transkripční faktor, který například při poškození DNA negativně reguluje buněčný cyklus a může iniciovat i apoptózu. Ztráta jeho funkce tak může výrazně přispět ke vzniku nádoru. Bylo zjištěno, že E6 protein vytváří komplex s E6AP, což je E3 ubikvitin ligáza. Tento komplex posléze váže p53 a ubikvitinyluje jej, což vede k jeho degradaci prostřednictvím buněčného ubikvitin-proteazomového systému (Obr. 3) (Scheffner et al., 1993). Nízkorizikvé typy HPV mohou též vázat p53, ale již neumí vyvolat jeho degradaci (Li & Coffino, 1996). E6 může ale snižovat transkripční aktivitu p53 i jinak, a to díky schopnosti interagovat s jeho koaktivátorem - proteinem p300 a CBP (Patel et al., 1999).



Obr 3.: Schéma interakce E6 a p53 a následná degradace p53, Ub je zkratka ubikvitinu, převzato z (Pinatti et al., 2017), upraveno

HR-HPV mají na C konci E6 navíc krátkou sekvenci aminokyselin schopnou interagovat s PDZ doménou jiných proteinů, například i dalších tumor supresorových proteinů, které jsou po vazbě ubikvitinylovány a degradovány obdobně jako p53 (Nakagawa & Huibregtse, 2000). Další z mnoha účinků onkoproteinu E6 je zvyšování aktivity buněčné telomerázy, a to především aktivací transkripce hTERT, což je její katalytická podjednotka (Oh et al., 2001).

2.5.3. Protein E7

E7 byl ze všech onkogenních HPV proteinů objevený jako první. Jde o relativně malý protein dlouhý přibližně 98 aminokyselin. Skládá se ze 3 konzervovaných oblastí označovaných CR1,2,3 (z angl. conserved region) a vykazuje značnou sekvenční podobnost s adenovirovým proteinem E1a (Phelps et al., 1988). CR2 oblast obsahuje motiv, který je důležitý pro interakci s pRb (Dyson et al., 1989), na C konci v oblasti CR3 se pak nachází doména obsahující dvě zinek vázající sekvence obdobné jako u E6. Tato oblast je zodpovědná za zinkem zprostředkovanou tvorbu homodimerů a za další interakce s pRb, p21 a dalšími proteiny (Ohlenschläger et al., 2006; Todorovic et al., 2012). Onkoprotein E7 se vyskytuje v cytoplazmě, nicméně byl zaznamenán i v jádře a předpokládá se jeho přítomnost i v jiných buněčných kompartmentech. Má poměrně krátký poločas života – okolo 1 hodiny a je degradován v proteazomu (Greenfield et al., 1991; Smotkin & Wettstein, 1987).

Jak již bylo naznačeno, E7 interaguje s pRb. Retinoblastomový protein je důležitý regulátor buněčného cyklu, který se váže na transkripční faktory z rodiny E2F. Při fosforylaci pRb pak dochází k uvolnění E2F a ty iniciují vstup buňky do S fáze. Onkoprotein E7 tuhle regulaci ale obchází - váže se na pRb, což vede k uvolnění E2F, který může posléze kontinuálně navozovat S fázi buněčného cyklu (Obr. 4). pRb může být především u HR-HPV následně ubikvitinylován a degradován v proteazomu (Boyer et al., 1996; Giarrè et al., 2001).

Obr 4.: Schéma interakce E7 a pRb (Rb), následuje uvolnění E2F a zahájení transkripce, převzato z (Pinatti et al., 2017), upraveno.

E7 interaguje ještě s celou řadou dalších proteinů důležitých pro regulaci buněčného cyklu, jako je například p21, p27 nebo p16 (Funk et al., 1997; Giarrè et al., 2001; Zerfass-Thome et al., 1996). Bylo popsáno i mnoho dalších interakcí a funkcí onkoproteinu E7, mimo jiné třeba modulace imunitní odpovědi inhibicí funkce IFN-α nebo TGF-β a dalších cytokinů (Barnard et al., 2000; Lee et al., 2002).

Všechny výše zmíněné vlastnosti mohou výrazně přispět ke vzniku nádoru a dělají tak z E7 významný virový onkoprotein.

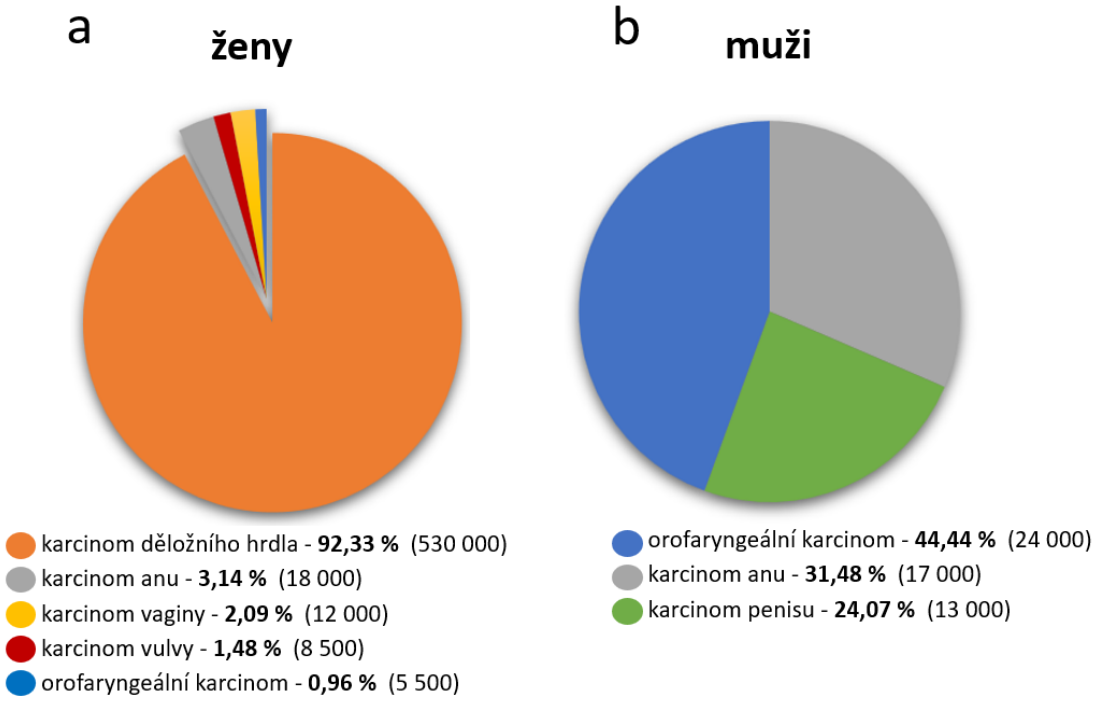
2.6. Nádory způsobené HPV

HPV se šíří především pohlavním stykem a jde pravděpodobně o nejčastější sexuálně přenosné onemocnění, nicméně epidemiologické údaje ukazují, že existují i různé nesexuální způsoby přenosu blízkým kontaktem, například přenos z matky na potomka při porodu (Plummer et al., 2007; Sabeena et al., 2017).

Většina papilomavirových infekcí je asymptomatická a spontánně odezní. Doba trvání se pohybuje okolo 10 měsíců u infekce děložního hrdla, u genitálních HPV infekcí mužů je to

o něco méně (Molano et al., 2003; Petca et al., 2020). V případě HR-HPV může ale infekce přetrvávat u některých jedinců dlouhodobě a přejít v nádorové onemocnění.

Jak již bylo řečeno, HR-HPV jsou nezanedbatelným původcem nádorů u žen i mužů, z dat Světové zdravotnické organizace vyplývá, že u žen je HPV nejčastějším infekčním původcem nádorů, u mužů pak čtvrtým nejčastějším. Celkově se uvádí, že HPV je hned po *Helicobacter pylori* nejvýznamnějším infekčním agens působícím rakovinu (de Martel et al., 2020). U žen je pak HPV celosvětově zodpovědný za 8,6 % nádorů, přičemž nejčastěji se jedná o karcinom děložního hrdla. U mužů jde o necelé 1 % nádorů a nejčastější je karcinom orofaryngu. (de Martel et al., 2017), (Obr. 5).



Obr 5.: Procentuální podíl jednotlivých typů karcinomů způsobených HPV a celkové počty případů ve světě v roce 2012, **a** - u žen, **b** - u mužů. Použitá data pochází z (de Martel et al., 2017).

U karcinomu děložního hrdla je téměř 100 % případů způsobeno infekcí HPV, u karcinomů orofaryngeální oblasti se uvádí 35-70 % v závislosti na zeměpisné poloze daného regionu. Dále z dat vyplývá, že u karcinomů konečníku je okolo 90 % případů způsobeno HPV, u karcinomů pochvy a vulvy přibližně 80 % a u karcinomu penisu zhruba 50 % případů (de Martel et al., 2017, 2020; Mariz et al., 2020). Všechny tyto nádory jsou obvykle působené HR-HPV typy, nejčastěji pak HPV 16 a 18.

V následujících dvou podkapitolách budou podrobněji probrány karcinom děložního hrdla, označován zkratkou CC (z angl. cervical carcinoma), a karcinom dlaždicových buněk orofaryngu, označovaný zkratkou OPSCC (z angl. oropharyngeal squamous cell carcinoma).

2.6.1 Karcinom děložního hrdla

Podle databáze Globocan má CC celosvětově devátou nejvyšší prevalenci a v roce 2020 bylo zaznamenáno 604 127 nových případů a 341 831 úmrtí na CC. Z dat dále vyplývá, že nejvyšší incidenci i mortalitu má CC v oblastech s nízkým indexem lidského rozvoje (HDI), přičemž ve východní Africe a některých státech střední a západní Afriky byl tento karcinom v roce 2020 vůbec nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu. V ČR byl CC v roce 2020 devatenáctým nejčastějším nádorovým onemocněním s 769 novými případy a 398 úmrtími (incidence 7,2 a mortalita 3,7 případů na 100 000 osob). Pětileté relativní přežití se u CC ve vyspělých zemích pohybuje okolo 65 %, vesměs ale koreluje s indexem lidského rozvoje dané země a se stádiem nádoru v době diagnózy (https://gco.iarc.fr/).

Uvádí se, že až 70 % případů CC je způsobeno HPV 16 a 18, původci mohou být ale i HPV typu 45, 31, 33, 52, 58, 35 a další (Muñoz et al., 2003). Častým jevem je integrace HPV do genomu hostitele, a to i ve více než v 80 % případů (Cullen et al., 1991). K infekcím HPV jsou nejnáchylnější buňky v transformační zóně děložního hrdla, tedy v oblasti přechodu mezi endo- a ektocervixem (Herfs et al., 2012; Radley et al., 2016). Dochází zde ke vzniku prekancerózních lézí, které mohou časem přejít v nádorové onemocnění. Včasnou detekcí a léčbou prekanceróz se dá ale vzniku CC účinně předcházet.

Primární prevencí proti rozvoji CC je především očkování. V současnosti jsou dostupné 3 vakcíny, které mají vysokou účinnost, a to především u mladých žen, které se před očkováním s HPV nesetkaly (Kamolratanakul & Pitisuttithum, 2021). V ČR je vakcinace plně hrazena 13letým dětem. Pro diagnostiku prekanceróz, či samotného CC jsou používaná cytologická vyšetření, jejich vyhodnocení bývá ale vysoce subjektivní. Další možností je detekce papilomavirové DNA ze stěru děložního hrdla. Jde o velmi přesnou metodu, která je výrazně citlivější, ovšem méně specifická než cytologické vyšetření (Arbyn et al., 2012). V ČR je test na přítomnost HPV DNA v současnosti hrazen u žen ve 35 a 45 letech a jako triážové vyšetření při suspektním cytologickém nálezu.

2.6.2 Orofaryngeální karcinom dlaždicových buněk

OPSCC zahrnuje karcinomy spodiny jazyka, tonzil nebo měkkého patra. Ty mohou být způsobeny infekcí HR-HPV, nebo jinými rizikovými faktory jako je kouření a konzumace alkoholu. OPSCC není celosvětově tak častým nádorovým onemocněním jako CC. V roce 2020 bylo zaznamenáno 98 412 případů a 48 143 úmrtí na OPSCC. Na rozdíl od CC má OPSCC vyšší incidenci a mortalitu v Evropě a Severní Americe než v dalších oblastech. Incidence navíc v posledních letech stoupá. V ČR bylo v roce 2020 zaznamenáno 524 nových případů a 216 úmrtí (incidence 4,9 a mortalita 2 případy na 100 000 osob) (https://gco.iarc.fr/). Pětileté relativní přežití se pohybuje okolo 63 %, záleží nicméně na stádiu a přesné lokalizaci nádoru (Du et al., 2019). OPSCC mají také poměrně velkou tendenci k relapsu, dochází k němu v intervalu pěti let po léčbě zhruba u 25 % pacientů. (Gillison et al., 2019).

Podíl OPSCC asociovaných HPV stále stoupá. Z dat vyplývá, že v Evropě a Severní Americe je v současnosti HPV infekce zodpovědná za zhruba 60 % případů OPSCC (Stein et al., 2015). V 87 % případů jde o infekci HPV 16 a i zde často dochází k integraci virové DNA do genomu buňky (Dayyani et al., 2010; Parfenov et al., 2014). Pacienti s HPV asociovaným OPSCC jsou průměrně mladší a mají výrazně lepší míru tříletého přežití i nižší pravděpodobnost recidivy (Rotnáglová et al., 2011). Zároveň je mezi těmito pacienty podstatně méně kuřáků, než je tomu u pacientů s HPV negativním OPSCC (Ang et al., 2010).

HPV status nádoru je důležitým prognostickým faktorem a k jeho zjištění se využívá detekce p16. Vysoké koncentrace p16 jsou markerem aktivní HPV infekce a lze je detekovat pomocí imunohistochemických metod (Duncan et al., 2013). Včasný záchyt onemocnění je u OPSCC komplikovanější než u CC především proto, že u OPSCC nejsou známy prekancerózní stavy.

3. Volná cirkulující DNA

Volná cirkulující DNA, zkráceně cfDNA (z angl. cell-free DNA), je obecné označení pro DNA, nacházející se v tělních tekutinách volně mimo buňku.

Přítomnost volných nukleových kyselin v krvi pacientů byla poprvé popsána již v roce 1948 (Mandel & Métais, 1948), tehdy ale nevzbudila velký zájem a tato studie byla částečně zapomenuta. Následně byla přítomnost volné DNA zjištěna ve vzorcích krve pacientů trpících systémovým lupem erythematodes, a to pomocí tělu vlastních protilátek proti DNA (Tan et al.,

1966). Později byla také cfDNA popsána u některých nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že v cfDNA lze detekovat specifické mutace, které by mohly sloužit jako nádorové markery (Sorenson et al., 1994). U těhotných žen byla v krevní plazmě pomocí PCR detekována sekvence DNA pocházející z Y chromozomu plodu. Tím byla objevena volná cirkulující DNA plodu a její potenciální význam pro neinvazivní prenatální diagnostiku. (Dennis Lo et al., 1997).

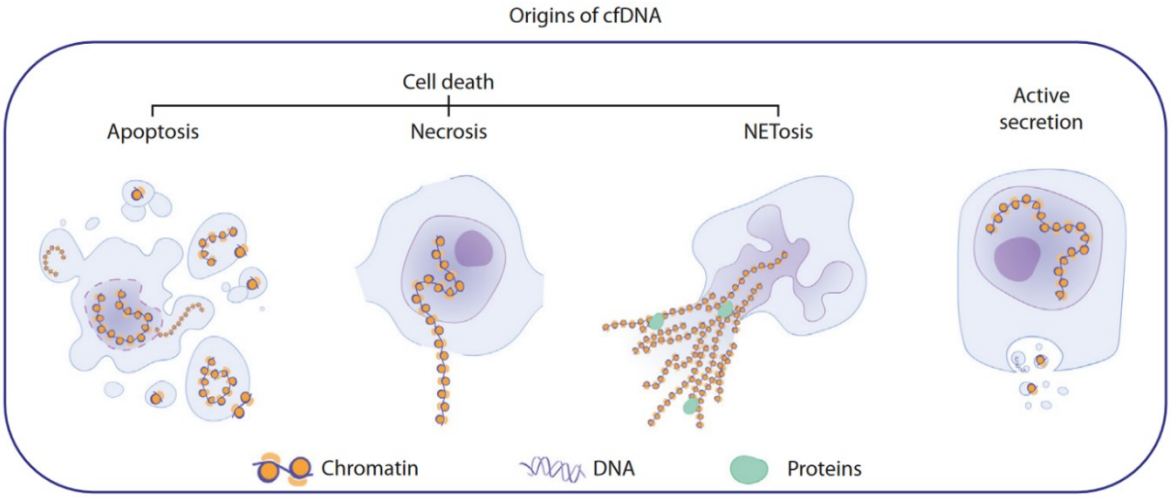
3.1. Struktura a vlastnosti cfDNA

Volná cirkulující DNA v krvi je tvořena obvykle dvouřetězcovou jadernou nebo mitochondriální DNA, může ale pocházet i z mikroorganismů, především z bakterií (Huang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Její délka se často pohybuje v rozmezí 40 až 200 párů bází, nejsou ale ani neobvyklé fragmenty dlouhé několik tisíc párů bází. (Snyder et al., 2016).

K uvolňování cfDNA může docházet během apoptózy, čemuž nasvědčují fragmenty okolo 150 pb, odpovídající kaspázami zprostředkovanému štěpení (Moss et al., 2018). Dále se může cfDNA uvolňovat z buněk při nekróze. Souvislost s nekrózou mívají naopak delší fragmenty cfDNA (Chen et al., 2012; Gang et al., 2010). V neposlední řadě může být cfDNA sekretována aktivně extracelulárními váčky. Nejčastěji jde o exozomy, které nesou cfDNA uvnitř, nebo i na svém povrchu (Fernando et al., 2017). DNA se v krvi vyskytuje v komplexech s proteiny nebo asociovaná se zmíněnými váčky. Jaderná DNA se v krvi obvykle nachází jako celé mono- nebo oligonukleozomy (Snyder et al., 2016). CfDNA se může vyskytovat i úplně volně, v takovém případě je ale velmi rychle degradována nukleázami.

Podle metylačních vzorců cfDNA bylo prokázáno, že u zdravých osob většina pochází z leukocytů (55 %) a z progenitorů erytrocytů (30 %). V případě leukocytů se může jednat i o DNA uvolněnou řízeně ve formě tzv. NETs (z angl. neutrophil extracellular traps- extracelulární pasti neutrofilů) (Moss et al., 2018), (Obr. 6). U pacientů s nádory je množství cfDNA v krvi často výrazně zvýšené a většina celkové cfDNA pochází obvykle právě z nádorových buněk. Taková DNA je označována jako cirkulující nádorová DNA (ctDNA) (Bettegowda et al., 2014). Zvýšená hladina cfDNA v krvi nemusí být ale způsobena jen nádorovým onemocněním, dalšími příčinami mohou být i sepse, infarkt, cévní mozková příhoda nebo operace či jiné poškození tkání (O'Connell et al., 2017; Wilson et al., 2018). Koncentrace cfDNA se u zdravých osob pohybuje mezi 0 až 100 ng/ml, zatímco u pacientů s nádorovým onemocněním často přesahuje 100 ng/ml a může dosahovat i více než 1000 ng/ml (Fleischhacker & Schmidt, 2007)

Hladina cfDNA v krvi je dána rovnováhou mezi jejím odbouráváním a uvolňováním. Poločas jejího života záleží na mnoha faktorech, obecně se ale pohybuje v rozmezí několika minut až dvou hodin (Khier & Lohan, 2018). K odbourávání může docházet přímo v krvi, zde hrají hlavní roli cirkulující enzymy jako například DNáza I. U pacientů s nádory bylo prokázáno že hladina DNázy I nepřímou úměrou souvisí s koncentrací cfDNA v krvi (Tamkovich et al., 2006). K eliminaci cfDNA dále dochází v játrech, ledvinách, slezině a dalších orgánech (Tsumita & Iwanaga, 1963). Hlavním orgánem pro odstranění nukleozomů jsou játra, na myším modelu bylo prokázáno, že právě játra jsou zodpovědná až za 84 % nukleozomů odstraněných z krve za 10 minut (Gauthier et al., 1996). Samotná degradace je zprostředkovaná především Kupfferovými buňkami v játrech a makrofágy v případě sleziny (Du Clos et al., 2001).



Obr 6.: Schéma uvolňování cfDNA z buněk během apoptózy, nekrózy a ve formě NETs nebo sekrecí, převzato z (Han & Lo, 2021).

3.2. Cirkulující nádorová DNA

Cirkulující nádorová DNA, zkráceně označovaná jako ctDNA (z angl. circulating tumor DNA), je podmnožina volné cirkulující DNA, která pochází z buněk nádoru a tím pádem může nést i všechny nádorové mutace. U pacientů s nádory mívá cfDNA vyšší integritu, tedy poměr dlouhých a krátkých DNA fragmentů téhož lokusu. To by mohlo nasvědčovat původu ctDNA z nekrotických buněk nádoru (Chen et al., 2012; Gang et al., 2010). Studiem buněčných linií odvozených z karcinomu prsu bylo ale *in vitro* zjištěno, že koncentrace cfDNA neodpovídá počtu nekrotických nebo apoptotických buněk, naopak odpovídá počtu buněk v G1 fázi. U těchto buněk byla pozorována aktivní sekrece DNA v exosomech, která stimulovala proliferaci buněk (Wang et al., 2017). Proti primárně nekrotickému původu ctDNA mluví i korelace mezi

množstvím ctDNA v krvi a metabolickou aktivitou nádoru měřenou metodou PET/CT u pacientů s metastazujícím melanomem (McEvoy et al., 2018).

3.3. Význam detekce ctDNA

V současné onkologii zažívá velký rozvoj tekutá biopsie, neboli vyšetření cirkulujících nádorových buněk a fragmentů nádorové DNA v krvi. Tekuté biopsie jsou na rozdíl od klasické tkáňové biopsie neinvazivní. ctDNA pochází z různých buněk nádoru a může tak odrážet všechny mutace, které se v nádorech vyskytují. Může proto lépe, než tkáňová biopsie, poskytnout komplexní informace o heterogenních nádorech nebo metastázách. Zároveň může ctDNA také sloužit k detekci důležitých mutací i u nádorů, které nejsou dostupné tkáňové biopsii nebo u nádorů s neznámým primárním zdrojem (Kato et al., 2017). V současnosti již byl Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schválen test pro detekci mutace EGFR z krve. Mutace EGFR je sledována u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a její přítomnost rozhoduje o použití léku Tarceva (https://www.fda.gov/).

Výzkumy zároveň naznačují, že by sledování koncentrace ctDNA prostřednictvím nádorově specifických mutací mohlo sloužit k hodnocení progrese nádoru, účinnosti léčby nebo předpovědi recidivy. U pacientů s kolorektálním karcinomem podstupujících chemoterapii byla například prokázána korelace poklesu hladiny ctDNA s příznivými výsledy vyšetření počítačovou tomografií (Tie et al., 2015). Stejně tak u pacientů s karcinomem prsu byl pokles ctDNA až na nedetekovatelnou hladinu spojen s účinnou léčbou, zatímco u žen, které zůstávaly i v průběhu chemoterapie ctDNA pozitivní, bylo významně zvýšeno riziko recidivy (Magbanua et al., 2021). Podobně i u pacientů po chirurgickém odstranění peritoneálních metastáz korelovala zvýšená hladina ctDNA s vyšším rizikem recidivy a kratší dobu přežití bez progrese (Baumgartner et al., 2018). Vhodným markerem může být též stanovení metylace ctDNA. Například u hepatocelulárního karcinomu byly identifikovány charakteristické metylační profily, které se shodovaly s metylačními profily ctDNA v krvi pacientů a stádiem nádoru či odpovědí na léčbu. Mohly by tak sloužit nejenom k diagnostice, ale i sledování během léčby a stanovení prognózy (Xu et al., 2017). Uplatnění v klinické praxi může mít i sledování velikosti fragmentů volné cirkulující DNA. Ukazuje se totiž, že ctDNA vykazuje variabilnější délku než ostatní volná cirkulující DNA. Fragmentační profily by tak mohly být použité pro identifikaci nádoru (Cristiano et al., 2019).

Tekutá biopsie zaměřená na detekci ctDNA má samozřejmě také svá omezení. Především to může být nedostatečná citlivost detekčních metod v případě, kdy se ctDNA

uvolňuje do krve jen v malém množství. Zároveň u vysoce heterogenních a rychle mutujících nádorů může být velmi obtížné identifikovat mutace, které by byly charakteristické pro celý nádor nebo jeho metastáze a mohly být tak použity pro sledování stavu onemocnění. Zároveň ne všechny detekované mutace v celkové volné DNA musejí nutně pocházet z buněk nádoru (Diehl et al., 2005; Myint et al., 2018).

4. Volná cirkulující HPV DNA

Volná cirkulující HPV DNA, zkráceně cfHPV DNA se nachází volně v krvi pacientů. Její přítomnost je spojována s výskytem nádorů asociovaných s HPV a podobně jako u ctDNA i u cfHPV DNA výzkumy poukazují na klinický potenciál její detekce. CfHPV DNA by mohla sloužit jako biomarker progrese nádoru, účinnosti léčby nebo relapsu nádorového onemocnění. Při sledování koncentrace cfHPV DNA se detekce obvykle zaměřuje na HPV 16 a 18, konkrétně na DNA kódující proteiny E7, E6, případně L1 (Kang et al., 2017). Proto zde, na rozdíl od analýz ctDNA, odpadá problém identifikace specifických mutací, které by reprezentovaly daný nádor. Nádory asociované s HPV navíc obvykle obsahují mnoho kopií genomu HPV, a to jak v extrachromozomální formě, tak i integrované do hostitelské DNA (Holmes et al., 2016).

V následujících kapitolách bude probrán význam detekce cfHPV DNA zvlášť u pacientů s CC a pacientů s OPSCC.

4.1. Detekce cfHPV DNA u pacientů s CC

Úspěšnost detekce cfHPV DNA velmi záleží na použité metodě. Oproti výsledkům starších studií používajících qPCR (quantitative PCR) úspěšnost vzrostla díky použití nových metod, jako je ddPCR (droplet digital PCR) (Jeannot et al., 2016). Za pomocí ddPCR se v novějších studiích podařilo detekovat přítomnost cfHPV DNA v krvi průměrně u 70 % pacientů s CC asociovaným s HPV 16 nebo 18 (Cheung et al., 2019; Jeannot et al., 2016; Kang et al., 2017). Zatímco Cocuzza a kol. detekovali cfHPV DNA pomocí qPCR jen u 34,2 % pacientů s CC (Cocuzza et al., 2017). U žen s prekancerózními lézemi na cervixu není cfHPV DNA detekovatelná, nebo jen v malém procentu případů (0 % - 29 %) (Cocuzza et al., 2017; Jeannot et al., 2016). U zdravých žen s normálním cytologickým nálezem není cfHPV DNA detekovatelná vůbec (Bønløkke et al., 2022; Jeannot et al., 2016).

cfHPV DNA v krvi pacientů bývá studována jednak v době diagnózy pro určení stádia nádoru nebo prognózy a jednak během léčby nebo po ní pro určení úspěšnosti léčby a vyhodnocení rizika rekurencí onemocnění nebo metastáz.

4.1.1. Význam detekce v době diagnózy u pacientů s CC

V případě měření v době diagnózy se ukazuje, že u pacientů s CC souvisí vyšší hladina cfHPV DNA před léčbou s vyšším počtem kopií HPV v nádoru, s pokročilejším stádiem nádoru, s velikostí nádoru a také byla popsána její souvislost s výskytem metastáz v lymfatických uzlinách (Cabel et al., 2021; Jeannot et al., 2021).

Cheung a kol. ve své studii zjistili, že pacienti s CC s více než 20 kopiemi E7 nebo L1 na 20 µl reakčního objemu vzorku před zahájením léčby měli zvýšené riziko recidivy a úmrtí během následujících 5 let (Cheung et al., 2019). Jiné studie ovšem korelaci mezi výchozí hodnotou cfHPV DNA a prognózou nepotvrdily (Jeannot et al., 2021). Na základě současných výsledků lze uzavřít, že neexistuje shoda v tom, zda lze výchozí hladiny cfHPV DNA naměřené před zahájením léčby využít jako prognostický biomarker u pacientů s CC.

4.1.2. Význam detekce během léčby a po ní u pacientů s CC

V současné době má nejslibnější klinické využití sledováním koncentrace cfHPV DNA během léčby nebo po ní a výzkumy ukazují, že jde o potenciální biomarker účinnosti léčby nebo také biomarker recidivy. U pacientů s CC například Cabael a kol. prokázali, že koncentrace cfHPV DNA v krvi během chemoradioterapie klesá a její detekce i po ukončení léčby je spojena s kratším přežitím bez nemoci a kratším celkovým přežitím pacienta (Cabel et al., 2021). Podobně i Jeannot a kol. u pacientů léčených kombinací chemo a radioterapie během 18měsíčního sledování zjistili, že pokles cfHPV DNA na nezachytitelnou úroveň do konce léčby souvisel s delším přežitím bez progrese. Konkrétně u 26 z 33 pacientů s nedetekovatelnou hladinou cfHPV DNA po léčbě nedošlo k relapsu. Naopak u 9 z 11 pacientů, u kterých byla cfHPV DNA detekována i po léčbě, k relapsu došlo s mediánem 10 měsíců od detekce (Jeannot et al., 2021). Podobné výsledky byly pozorovány i na malém vzorku pacientů s CC léčených imunoterapií pomocí lymfocytů infiltrujících nádor. I zde koreloval pokles cfHPV DNA s účinnou léčbou (Kang et al., 2017).

4.2. Detekce cfHPV DNA u pacientů s OPSCC

Detekce cfHPV DNA je u OPSCC velmi úspěšná. V novějších studiích daří pomocí ddPCR detekovat cfHPV DNA u 95 % pacientů s HPV asociovaným OPSCC (Damerla et al., 2019; Tanaka et al., 2022). I zde je vidět rozdíl v použitých metodách, například Ahn a kol. při použití qPCR detekoval cfHPV DNA jen u 67 % pacientů s HPV asociovaným OPSCC (Ahn et al., 2014).

4.2.1. Význam detekce v době diagnózy u pacientů s OPSCC

U pacientů s HPV asociovaným OPSCC byla u dvou studií také popsána souvislost mezi vyšší hladinou cfHPV DNA v krvi před léčbou a pokročilejším stádiem a také velikostí nádoru (Damerla et al., 2019; Veyer et al., 2020). Stejně jako u CC, ani zde ale nebyla dostatečně prokázána souvislost mezi výchozí hodnotou cfHPV DNA a prognózou (Dahlstrom et al., 2015; Veyer et al., 2020).

Úspěšnost detekce cfHPV DNA v době diagnózy je zde velmi vysoká a ukazuje se, že jde o spolehlivější metodou pro určení HPV statusu u OPSCC, než je běžně používaná detekce p16. Zjištěný statistický Youdenův index byl 0,937 oproti 0,707 při detekci p16. Na rozdíl od vyšetření p16 je detekce cfHPV DNA navíc neinvazivní, levnější a časově méně náročnou metodu (Siravegna et al., 2022). V budoucnu by tedy mohlo jít o vhodnou alternativu k detekci p16.

4.2.2. Význam detekce během léčby a po ní u pacientů s OPSCC

Výzkumy ukazují, že sledování koncentrace cfHPV DNA během léčby a po ní má u pacientů s OPSCC asociovaným s HPV ještě větší klinický potenciál než u pacientů s CC. Například O'Boyle a kol. měřili pooperační koncentraci cfHPV DNA u 33 pacientů s HPV asociovaným OPSCC, přičemž u pacientů bez rizikových faktorů recidivy se během prvního dne po operaci koncentrace cfHPV DNA rychle snížila na méně než 1 kopii/ml. Oproti tomu u pacientů s rizikovými faktory pro makroskopické reziduální ložiska, jako jsou extranodální rozšíření, vyšší počet postižených lymfatických uzlin nebo pokročilejší stádium nádoru, byla naopak koncentrace cfHPV DNA první den od operace vyšší než 350 kopií/ml. (O'Boyle et al., 2022). Rutkowski a kol. zase sledovali 66 pacientů s HPV asociovaným OPSCC a pokud byla

cfHPV DNA detekována i po skončení radioterapie, léčba se ukázala jako neúspěšná. Negativní a pozitivní prediktivní hodnota zde byla 100 % a 83 % (Rutkowski et al., 2020).

V jiné studii Chera a kol. sledovali 115 pacientů s nemetastazujícím OPSCC asociovaným s HPV léčených kombinací chemo a radioterapie. Pacienti podstoupili 3 měsíce po léčbě PET/CT, každých 6 měsíců bylo prováděno rentgenové zobrazování hrudníku a každých 6 až 9 měsíců byly odebírány vzorky krve pro analýzu cfHPV DNA pomocí ddPCR. Odběry probíhaly průměrně 23,7 měsíců (rozmezí 6,1-54,7 měsíců). 87 pacientů mělo ve všech krevních odběrech po ukončení léčby nedetekovatelnou cfHPV DNA a ani u jednoho z nich nedošlo k rekurenci. U 28 pacientů byla po léčbě při odběru detekována cfHPV DNA, ovšem u části z nich při následujícím odběru již cfHPV DNA detekována nebyla. Pouze u 16 pacientů byly pozitivní alespoň 2 po sobě jdoucí testy. U 15 z těchto 16 pacientů se poté vyvinula biopticky prokázaná recidiva, a to s mediánem 3,9 měsíce od prvního pozitivního testování. Negativní prediktivní hodnota zde tedy vychází 100 % a pozitivní prediktivní hodnota 94 %. U 10 pacientů byla cfHPV DNA detekována před diagnózou recidivy a u 4 pacientů s detekovatelnou cfHPV DNA se nepodařilo pomocí radiologického vyšetření recidivu zachytit vůbec. Oproti tomu ale nebyl nezaznamenán žádný případ, kdy by nebyla recidiva zachycena pomocí PET/CT. (Chera et al., 2020). Podobné výsledky uvádí i další publikace, i při použití amplikonového sekvenování nové generace namísto ddPCR (Lee et al., 2017; Veyer et al., 2020).

4.3. Metody detekce cfHPV DNA

V současnosti je detekce cfHPV DNA zaměřena především na HPV16, HPV18 a případně na další typy HR-HPV (Chera et al., 2020; Kang et al., 2017; O'Boyle et al., 2022). Kromě široce rozšířené metody qPCR se v současnosti k detekci cfHPV DNA začínají běžně používat i metody digitální PCR, především ddPCR. Ta spočívá v rozdělení PCR roztoku do několika desítek tisíc kapiček o nanolitrových objemech, aby v každé z nich mohla proběhnout samostatná PCR reakce. Pomocí fluorescence je poté vyhodnoceno v kolika kapičkách PCR reakce proběhla, respektive v kolika kapičkách byla přítomna alespoň 1 molekula detekované DNA sekvence. Množství DNA ve vzorku je posléze dopočteno statistickou metodou pomocí Poissonova zákona malých čísel (Baker, 2012; Dube et al., 2008). Na rozdíl od qPCR se zde tedy vzorky nevyhodnocují vůči standardu o známé koncentraci. ddPCR je navíc více robustní a odolnější vůči inhibitorům než qPCR (Dingle et al., 2013) a zároveň má větší citlivost i přesnost. Zatímco u qPCR se limit detekce (LoD) pohybuje okolo 0,12 %, u ddPCR je limit

detekce 0,01 % (Link-Lenczowska et al., 2018). Jeannot a kol. byli například pomocí qPCR schopni detekovat cfHPV DNA u 69 % pacientů s CC, zatímco při použití ddPCR byla detekována u 87 % pacientů. Zároveň také ukázali, že u vzorků pacientů uchovávaných v -80 °C byla úspěšnost detekce vyšší než u vzorků uchovávaných v -20 °C (Jeannot et al., 2016).

Další metodou pro detekci cfHPV DNA je sekvenování nové generace, zkráceně NGS (z angl. Next-generation sequencing). V současnosti je běžně využívanou metodou amplikonové sekvenování Illumina. Při sekvenování touto metodou jsou molekuly jednovláknové DNA pomocí adaptéru přichycené k sekvenační destičce, následně se každá molekula DNA mnohonásobně amplifikuje a vytvoří kolonii identických molekul. Destička je tak pokryta mozaikou různých kolonií jednovláknových molekul DNA. Samotná sekvenace probíhá syntézou komplementárního vlákna za pomoci fluorescenčně značených nukleotidů. Nukleotid po navázání zastaví reakci, senzor detekuje fluorescenci dané kolonie molekul DNA, posléze dojde k enzymatickému odštěpení fluorescenční značky a sekvenace může pokračovat. Výzkumy naznačují, že NGS má srovnatelnou, nebo ještě větší citlivost, než ddPCR. Při detekci cfHPV DNA v krevním séru pacientů s HPV asociovaným OPSCC byla zjištěná velmi podobná citlivost při aplikaci amplikonového NGS a ddPCR, zatímco u qPCR byla výrazně nižší (Mattox et al., 2022). Han a kol. oproti tomu ve své studii na pacientech s CC uvádějí, že jejich NGS s biotinylovanými hybridizačními sondami selektivně identifikující cfHPV DNA má 10x nižší spodní mez detekce než ddPCR (Han et al., 2019). Výhodou NGS je kromě stanovení hladiny cfHPV DNA i identifikace variant viru a také identifikace délky fragmentů cfHPV DNA. NGS je ale zároveň dražší a časově náročnější metoda než ddPCR.

5. Závěr

Lidské vysoce-rizikové typy HPV, především pak HPV 16 a 18 způsobují téměř 5 % všech případů nádorů vůbec, přičemž nejčastější je karcinom děložního hrdla u žen a orofaryngeální karcinom u mužů (de Martel et al., 2020). Pro boj s nádorovými onemocněními je potřeba vhodných biomarkerů, které by u pacientů indikovaly stav nádoru, úspěšnost léčby a rekurenci. V současnosti se jako vhodný krevní biomarker jeví volná cirkulující DNA.

U nádorů asociovaných s HPV je papilomavirová DNA často mnohokrát integrovaná v hostitelském genomu a může se v buňkách vyskytovat i v extrachromozomální formě (Holmes et al., 2016). Z toho důvodu se cfHPV DNA může z buněk nádoru uvolňovat ve velké míře a je tak dobře detekovatelným a dostatečně specifickým biomarkerem HPV asociovaných

nádorů. S nástupem nových, velmi citlivých, metod detekce jako je ddPRC se v novějších studiích daří detekovat cfHPV DNA i u více než 70 % pacientů s CC a 95 % pacientů s HPV asociovanými OPSCC (Damerla et al., 2019; Jeannot et al., 2016). U pacientů s OPSCC by tak například cfHPV DNA mohla být alternativní metodou k detekci p16 pomocí imunohistochemie pro stanovení HPV statusu nádorů (Siravegna et al., 2022). Výzkumy zabývající se sledováním koncentrace cfHPV DNA v krvi během léčby a po ní ukazují, že u pacientů s CC, a především pak u pacientů s OPSCC, koreluje hladina cfHPV DNA po léčbě s pravděpodobností rekurence nádorového onemocnění. CfHPV DNA by tak mohla sloužit jako biomarker účinnosti léčby a jako velmi spolehlivý časný biomarker recidivy, vhodný ještě před detekcí rekurence pomocí PET/CT (Chera et al., 2020; Jeannot et al., 2021). K zavedení do klinické praxe je nicméně potřeba ještě dalších, rozsáhlejších studií, které by přesně stanovily kritické hladiny cfHPV DNA korelující s rizikem recidivy a časové intervaly kdy detekci provádět.

6. Použitá literatura

Adam, J. L., Briggs, M. W., & McCance, D. J. (2000). A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H+-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology*, *272*(2), 315–325. https://doi.org/10.1006/VIRO.2000.0376

Ahn, S. M., Chan, J. Y. K., Zhang, Z., Wang, H., Khan, Z., Bishop, J. A., Westra, W., Koch, W. M., & Califano, J. A. (2014). Saliva and Plasma Quantitative Polymerase Chain Reaction–Based Detection and Surveillance of Human Papillomavirus–Related Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *140*(9), 846–854. https://doi.org/10.1001/JAMAOTO.2014.1338

Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., Rocco, J. W., Teknos, T. N., Kumar, B., Wangsa, D., He, D., Ried, T., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, *24*(2), 185–199. https://doi.org/10.1101/gr.164806.113

Andresson, T., Sparkowski, J., Goldstein, D. J., & Schlegel, R. (1995). Vacuolar H+-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein.

Journal of Biological Chemistry, *270*(12), 6830–6837. https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6830

Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, *363*(1), 24–35. https://doi.org/10.1056/NEJMOA0912217/SUPPL_FILE/NEJMOA0912217_DISCLOSURES.PDF

Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., Chris, C. J. L., Poljak, M., Ogilvie, G., Koliopoulos, G., Naucler, P., Sankaranarayanan, R., & Peto, J. (2012). Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Vaccine*, *30*(SUPPL.5), F88–F99. https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.06.095

Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods 2012 9:6*, *9*(6), 541–544. https://doi.org/10.1038/nmeth.2027

Band, V., De Caprio, J. A., Delmolino, L., Kulesa, V., & Sager', R. (1991). Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, *65*(12), 6671. https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6671-6676.1991

Barbosa, M. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology*, *63*(3), 1404–1407. https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1404-1407.1989

Barnard, P., Payne, E., & McMillan, N. A. J. (2000). The Human Papillomavirus E7 Protein Is Able to Inhibit the Antiviral and Anti-growth Functions of Interferon-α. *Virology*, *277*(2), 411–419. https://doi.org/10.1006/VIRO.2000.0584

Baumgartner, J. M., Raymond, V. M., Lanman, R. B., Tran, L., Kelly, K. J., Lowy, A. M., & Kurzrock, R. (2018). Preoperative Circulating Tumor DNA in Patients with Peritoneal Carcinomatosis is an Independent Predictor of Progression-Free Survival. *Annals of Surgical Oncology*, *25*(8), 2400–2408. https://doi.org/10.1245/S10434-018-6561-Z/TABLES/4

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., Le, D., Giuntoli, R. L., Goggins, M., Hogarty, M. D., Holdhoff, M., Hong, S. M., Jiao, Y., Juhl, H. H., Kim, J. J., Siravegna, G., Laheru, D. A., Lauricella C., Lim, M., Lipson, E. J., Marie, S. K. N., Netto, G. J., Oliner, K. S., Olivi, A., Olsson, L., Riggins, G. J., Sartore-Bianchi, A.,

Schmidt, K., Shih, M., Oba-Shinjo, S. M., Siena, S., Theodorescu, D., Tie, J., Harkins, T. T., Veronese, S., Wang, T. L., Weingart, J. D., Wolfgang, C. L., Hruban, R. H., Schmidt, C. M., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Diaz, L. A. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, *6*(224), 224ra24. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3007094

Bønløkke, S., Stougaard, M., Sorensen, B. S., Booth, B. B., Høgdall, E., Nyvang, G. B., Lindegaard, J. C., Blaakær, J., Bertelsen, J., Fuglsang, K., Strube, M. L., Lenz, S., & Steiniche, T. (2022). The Diagnostic Value of Circulating Cell-Free HPV DNA in Plasma from Cervical Cancer Patients. *Cells*, *11*(14). https://doi.org/10.3390/CELLS11142170

Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*, *56*(20), 4620–4624. https://aacrjournals.org/cancerres/article/56/20/4620/502691/E7-Protein-of-Human-Papilloma-Virus-16-Induces

Bubb, V., McCance, D. J., & Schlegel, R. (1988). DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology*, *163*(1), 243–246. https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90259-0

Buck, C. B., Cheng, N., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Steven, A. C., Schiller, J. T., & Trus, B. L. (2008). Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *Journal of Virology*, *82*(11), 5190. https://doi.org/10.1128/JVI.02726-07

Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *Journal of Virology*, *79*(5), 2839. https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005

Cabel, L., Bonneau, C., Bernard-Tessier, A., Héquet, D., Tran-Perennou, C., Bataillon, G., Rouzier, R., Féron, J. G., Fourchotte, V., Le Brun, J. F., Benoît, C., Rodrigues, M., Scher, N., Minsat, M., Legrier, M. E., Bièche, I., Proudhon, C., Sastre-Garau, X., Bidard, F. C., & Jeannot, E. (2021). HPV ctDNA detection of high-risk HPV types during chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer. *ESMO Open*, *6*(3). https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2021.100154

Campo, M. S., Graham, S. V., Cortese, M. S., Ashrafi, G. H., Araibi, E. H., Dornan, E. S., Miners, K., Nunes, C., & Man, S. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, *407*(1), 137–142. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2010.07.044

Chen, H., Sun, L. Y., Zheng, H. Q., Zhang, Q. F., & Jin, X. M. (2012). Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology*, *44*(4), 318–324. https://doi.org/10.1097/PAT.0B013E328353A24C

Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., & Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell*, *5*(3), 557–567. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80449-9

Chera, B. S., Kumar, S., Shen, C., Amdur, R., Dagan, R., Green, R., Goldman, E., Weiss, J., Grilley-Olson, J., Patel, S., Zanation, A., Hackman, T., Blumberg, J., Patel, S., Thorp, B., Weissler, M., Yarbrough, W., Sheets, N., Mendenhall, W., Tan, X. M., Gupta, G. P. (2020). Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(10), 1050. https://doi.org/10.1200/JCO.19.02444

Cheung, T. H., Yim, S. F., Yu, M. Y., Worley, M. J., Fiascone, S. J., Chiu, R. W. K., Lo, K. W. K., Siu, N. S. S., Wong, M. C. S., Yeung, A. C. M., Wong, R. R. Y., Chen, Z. G., Elias, K. M., Chung, T. K. H., Berkowitz, R. S., Wong, Y. F., & Chan, P. K. S. (2019). Liquid biopsy of HPV DNA in cervical cancer. *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *114*, 32–36. https://doi.org/10.1016/J.JCV.2019.03.005

Chow, L. T., Reilly, S. S., Broker, T. R., & Taichman, L. B. (1987). Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *Journal of Virology*, *61*(6), 1913. https://doi.org/10.1128/JVI.61.6.1913-1918.1987

Clower, R. V., Hu, Y., & Melendy, T. (2006). Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology*, *348*(1), 13–18. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2006.02.018

Cocuzza, C. E., Martinelli, M., Sina, F., Piana, A., Sotgiu, G., Dell'Anna, T., & Musumeci, R. (2017). Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia. *PLOS ONE*, *12*(11), e0188592. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188592

Conger, K. L., Liu, J.-S., Kuo, S.-R., Chow, L. T., & Wang, T. S.-F. (1999). Human Papillomavirus DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(5), 2696–2705. https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2696

Conrad, M., Bubb, V. J., & Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-

forming protein. *Journal of Virology*, *67*(10), 6170–6178. https://doi.org/10.1128/JVI.67.10.6170-6178.1993

Coursen, J. D., Bennett, W. P., Gollahon, L., Shay, J. W., & Harris, C. C. (1997). Genomic Instability and Telomerase Activity in Human Bronchial Epithelial Cells during Immortalization by Human Papillomavirus-16 E6 and E7 Genes. *Experimental Cell Research*, *235*(1), 245–253. https://doi.org/10.1006/EXCR.1997.3670

*Coursey, T. L., & McBride, A. A. (2019). Hitchhiking of Viral Genomes on Cellular Chromosomes. *Annual Review of Virology*, *6*(1), 275. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-092818-015716

Cristiano, S., Leal, A., Phallen, J., Fiksel, J., Adleff, V., Bruhm, D. C., Jensen, S. Ø., Medina, J. E., Hruban, C., White, J. R., Palsgrove, D. N., Niknafs, N., Anagnostou, V., Forde, P., Naidoo, J., Marrone, K., Brahmer, J., Woodward, B. D., Husain, H., van Rooijen, K. L., Ørntoft, M. B. W., Madsen, A. H., Cats, A., van Grieken, N. C. T., Koopman, M., Fijneman, R. J. A., Johansen, J. S., Nielsen, H. J., Meijer, G. A., Andersen, C. L., Scharpf, R. B., Velculescu, V. E. (2019). Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature 2019 570:7761*, *570*(7761), 385–389. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6

Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaissert, H., & Alonso, A. (1998). The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Experimental Cell Research*, *241*(1), 76–83. https://doi.org/10.1006/EXCR.1998.4024

Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M., & Lorinczl, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of Virology*, *65*(2), 606–612. https://doi.org/10.1128/JVI.65.2.606-612.1991

Dahlstrom, K. R., Li, G., Hussey, C. S., Vo, J. T., Wei, Q., Zhao, C., & Sturgis, E. M. (2015). Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*, *121*(19), 3455–3464. https://doi.org/10.1002/CNCR.29538

Damerla, R. R., Lee, N. Y., You, D., Soni, R., Shah, R., Reyngold, M., Katabi, N., Wu, V., McBride, S. M., Tsai, C. J., Riaz, N., Powell, S. N., Babady, N. E., Viale, A., & Higginson, D. S. (2019). Detection of Early Human Papillomavirus-Associated Cancers by Liquid Biopsy. *JCO Precision Oncology*, *3*(3), 1–17. https://doi.org/10.1200/PO.18.00276

Davy, C. E., Jackson, D. J., Wang, Q., Raj, K., Masterson, P. J., Fenner, N. F., Southern, S., Cuthill, S., Millar, J. B. A., & Doorbar, J. (2002). Identification of a G2 Arrest Domain in the E1∧E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *Journal of Virology*, *76*(19), 9806. https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9806-9818.2002

Day, P. M., Thompson, C. D., Schowalter, R. M., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2013). Identification of a Role for the trans-Golgi Network in Human Papillomavirus 16 Pseudovirus Infection. *Journal of Virology*, *87*(7), 3862. https://doi.org/10.1128/JVI.03222-12

Dayyani, F., Etzel, C. J., Liu, M., Ho, C. H., Lippman, S. M., & Tsao, A. S. (2010). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head and Neck Oncology*, *2*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-15/TABLES/5

de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, *8*(2), e180–e190. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7

de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, *141*(4), 664. https://doi.org/10.1002/IJC.30716

*De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17–27. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.03.033

Dennis Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*, *350*(9076), 485–487. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0

Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L. A., Goodman, S. N., David, K. A., Juhl, H., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(45), 16368–16373. https://doi.org/10.1073/PNAS.0507904102/SUPPL_FILE/INDEX.HTML

DiGiuseppe, S., Luszczek, W., Keiffer, T. R., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. M., & Sapp, M. J. (2016). Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(22), 6289–6294. https://doi.org/10.1073/PNAS.1600638113/-/DCSUPPLEMENTAL

Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of droplet-digital PCR versus real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical Chemistry*, *59*(11), 1670. https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2013.211045

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature 1991 352:6338*, *352*(6338), 824–827. https://doi.org/10.1038/352824a0

Dowhanick, J. J., Mcbride, A. A., & Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *Journal of Virology*, *69*(12), 7791. https://doi.org/10.1128/JVI.69.12.7791-7799.1995

*Dreer, M., van de Poel, S., & Stubenrauch, F. (2017). Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^E2 protein. *Virus Research*, *231*, 96–102. https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2016.11.005

Du Clos, T. W., Volzer, M. A., Hahn, F. F., Xiao, R., Mold, C., & Searles, R. P. (2001). Chromatin clearance in C57Bl/10 mice: interaction with heparan sulphate proteoglycans and receptors on Kupffer cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *117*(2), 403–411. https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1999.00976.X

Du, E., Mazul, A. L., Farquhar, D., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Weissler, M. C., Hayes, D. N., Olshan, A. F., & Zevallos, J. P. (2019). Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *The Laryngoscope*, *129*(11), 2506. https://doi.org/10.1002/LARY.27807

Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLOS ONE*, *3*(8), e2876. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002876

Duensing, S., & Münger, K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Research*, *62*(23), 7075–7082. https://aacrjournals.org/cancerres/article/62/23/7075/509413/The-Human-Papillomavirus-Type-16-E6-and-E7

Duncan, L. D., Winkler, M., Carlson, E. R., Heidel, R. E., Kang, E., & Webb, D. (2013). P16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *71*(8), 1367–1375. https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.02.019

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., & Harlow, E. (1989). The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science*, *243*(4893), 934–937. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2537532

Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., & Ryan, W. L. (2017). New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183915. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0183915

*Fleischhacker, M., & Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1775*(1), 181–232. https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2006.10.001

Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., & Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Development*, *11*(16), 2090–2100. https://doi.org/10.1101/GAD.11.16.2090

Gang, F., Guorong, L., An, Z., Anne, G. P., Christian, G., & Jacques, T. (2010). Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-free DNA in Serum. *Urology*, *75*(2), 262–265. https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2009.06.048

Gauthier, V. J., Tyler, L. N., & Mannik, M. (1996). Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *The Journal of Immunology*, *156*(3), 1151–1156. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.156.3.1151

Genther Williams, S. M., Disbrow, G. L., Schlegel, R., Lee, D., Threadgill, D. W., & Lambert, P. F. (2005). Requirement of Epidermal Growth Factor Receptor for Hyperplasia Induced by E5, a High-Risk Human Papillomavirus Oncogene. *Cancer Research*, *65*(15), 6534–6542. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0083

Giarrè, M., Caldeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leão, M. J., & Tommasino, M. (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *Journal of Virology*, *75*(10), 4705–4712. https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4705-4712.2001

Gillison, M. L., Trotti, A. M., Harris, J., Eisbruch, A., Harari, P. M., Adelstein, D. J., Sturgis, E. M., Burtness, B., Ridge, J. A., Ringash, J., Galvin, J., Yao, M., Koyfman, S. A., Blakaj, D. M., Razaq, M. A., Colevas, A. D., Beitler, J. J., Jones, C. U., Dunlap, N. E., Seaward, S. A., Spencer, S., Phan, J., Dignam, J. J., Le, Q. T. (2019). Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *The Lancet*, *393*(10166), 40–50. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32779-X

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

Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., & Stanley, M. (1991). Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(24), 11217–11221. https://doi.org/10.1073/PNAS.88.24.11217

Gustafson, K. S., Furth, E. E., Heitjan, D. F., Fansler, Z. B., & Clark, D. P. (2004). DNA methylation profiling of cervical squamous intraepithelial lesions using liquid-based cytology specimens: an approach that utilizes receiver-operating characteristic analysis. *Cancer*, *102*(4), 259–268. https://doi.org/10.1002/CNCR.20425

Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S., & Galloway, D. A. (1994). Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *Journal of Virology*, *68*(7), 4503. https://doi.org/10.1128/JVI.68.7.4503-4505.1994

Hagensee, M. E., Yaegashi, N., & Galloway, D. A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *Journal of Virology*, *67*(1), 315. https://doi.org/10.1128/JVI.67.1.315-322.1993

Han, D. S. C., & Lo, Y. M. D. (2021). The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends in Genetics*, *37*(8), 758–770. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2021.04.005

Han, K., Leung, E. W., Zou, J., Wang, T. T., Yu, C., Zhao, Z., Zheng, Y., Huang, S. H., Liu, F. F., Waldron, J. N., Siu, L., Pugh, T., & Bratman, S. V. (2019). Viral Genome Sequencing for Ultrasensitive Detection of Circulating Tumor DNA. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, *105*(1), S177. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.06.214

Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M. R., McLaughlin-Drubin, M. E., Münger, K., Feldman, S., McKeon, F. D., Xian, W., & Crum, C. P. (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(26), 10516–10521. https://doi.org/10.1073/PNAS.1202684109/-/DCSUPPLEMENTAL

Holmes, A., Lameiras, S., Jeannot, E., Marie, Y., Castera, L., Sastre-Garau, X., & Nicolas, A. (2016). Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *Npj Genomic Medicine 2016 1:1*, *1*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/npjgenmed.2016.4

Huang, Y. F., Chen, Y. J., Fan, T. C., Chang, N. C., Chen, Y. J., Midha, M. K., Chen, T. H., Yang, H. H., Wang, Y. T., Yu, A. L., & Chiu, K. P. (2018). Analysis of microbial

sequences in plasma cell-free DNA for early-onset breast cancer patients and healthy females. *BMC Medical Genomics*, *11*(1), 33–41. https://doi.org/10.1186/S12920-018-0329-Y/FIGURES/1

Hughes, F. J., & Romanos, M. A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research*, *21*(25), 5817. https://doi.org/10.1093/NAR/21.25.5817

Jeannot, E., Becette, V., Campitelli, M., Calméjane, M. A., Lappartient, E., Ruff, E., Saada, S., Holmes, A., Bellet, D., & Sastre-Garau, X. (2016). Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, *2*(4), 201. https://doi.org/10.1002/CJP2.47

Jeannot, E., Latouche, A., Bonneau, C., Calmejane, M. A., Beaufort, C., Ruigrok-Ritstier, K., Bataillon, G., Cherif, L. L., Dupain, C., Lecerf, C., Popovic, M., de la Rochefordiere, A., Lecuru, F., Fourchotte, V., Jordanova, E. S., von der Leyen, H., Tran-Perennou, C., Legrier, M. E., Dureau, S., Raizonville, L., Roufai, D. B., Le Tourneau, C., Bieche, I., Rouzier, R., Berns, E. M. J. J., Kamal, M., Scholl, S. (2021). Circulating HPV DNA as a Marker for Early Detection of Relapse in Patients with Cervical Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *27*(21), 5869–5877. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0625

Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U., & Keller, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(9), 5810–5822. https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5810

Kabsch, K., & Alonso, A. (2002). The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in HaCaT Cells by Different Mechanisms. *Journal of Virology*, *76*(23), 12162. https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12162-12172.2002

Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., & Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *The EMBO Journal*, *26*(8), 2180. https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601665

Kamal, M., Lameiras, S., Deloger, M., Morel, A., Vacher, S., Lecerf, C., Dupain, C., Jeannot, E., Girard, E., Baulande, S., Dubot, C., Kenter, G., Jordanova, E. S., Berns, E. M. J. J., Bataillon, G., Popovic, M., Rouzier, R., Cacheux, W., Le Tourneau, C., Nicolas, A., Servant, N., Scholl, S. M., Bièche, I., (2021). Human papilloma virus (HPV) integration signature in Cervical Cancer: identification of MACROD2 gene as HPV hot spot

integration site. *British Journal of Cancer*, *124*(4), 777. https://doi.org/10.1038/S41416-020-01153-4

Kamolratanakul, S., & Pitisuttithum, P. (2021). Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. *Vaccines*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/VACCINES9121413

Kang, Z., Stevanovic, S., Hinrichs, C. S., & Cao, L. (2017). Circulating cell-free DNA for metastatic cervical cancer detection, genotyping, and monitoring. *Clinical Cancer Research*, *23*(22), 6856–6862. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1553/73738/AM/CIRCULATING-CELL-FREE-DNA-FOR-METASTATIC-CERVICAL

Kato, S., Krishnamurthy, N., Banks, K. C., De, P., Williams, K., Williams, C., Leyland-Jones, B., Lippman, S. M., Lanman, R. B., & Kurzrock, R. (2017). Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Research*, *77*(16), 4238–4246. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0628/652813/AM/UTILITY-OF-GENOMIC-ANALYSIS-IN-CIRCULATING-TUMOR

*Khier, S., & Lohan, L. (2018). Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: Critical appraisal of the literature. *Future Science OA*, *4*(4). https://doi.org/10.4155/FSOA-2017-0140/SUPPL_FILE/FSOA-04-295-S2.DOCX

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(24), 12180–12184. https://doi.org/10.1073/PNAS.89.24.12180

Lai, M.-C., Teh, B. H., & Tarn, W.-Y. (1999). A Human Papillomavirus E2 Transcriptional Activator. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(17), 11832–11841. https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11832

Lee, D. K., Kim, B. C., Kim, I. Y., Cho, E. A., Satterwhite, D. J., & Kim, S. J. (2002). The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-β signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(41), 38557–38564. https://doi.org/10.1074/jbc.M206786200

Lee, J. Y., Garcia-Murillas, I., Cutts, R. J., De Castro, D. G., Grove, L., Hurley, T., Wang, F., Nutting, C., Newbold, K., Harrington, K., Turner, N., & Bhide, S. (2017). Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma. *British Journal of Cancer 2017 117:6*, *117*(6), 876–883. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.258

Li, X., & Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of Virology*, *70*(7), 4509. https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4509-4516.1996

Link-Lenczowska, D., Pallisgaard, N., Cordua, S., Zawada, M., Czekalska, S., Krochmalczyk, D., Kanduła, Z., & Sacha, T. (2018). A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. *Annals of Hematology*, *97*(12), 2299. https://doi.org/10.1007/S00277-018-3451-1

Magbanua, M. J. M., Swigart, L. B., Wu, H. T., Hirst, G. L., Yau, C., Wolf, D. M., Tin, A., Salari, R., Shchegrova, S., Pawar, H., Delson, A. L., DeMichele, A., Liu, M. C., Chien, A. J., Tripathy, D., Asare, S., Lin, C. H. J., Billings, P., Aleshin, A., Sethi, H., Louie, M., Zimmermann, B., Esserman, L. J., van 't Veer, L. J. (2021). Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Annals of Oncology*, *32*(2), 229–239. https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.11.007

Mandel, P., & Métais, P. (1948). Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l' homme. *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie et de Ses Filiales*. 1948, 142, 241-243.

*Mariz, B. A. L. A., Kowalski, L. P., William, W. N., de Castro, G., Chaves, A. L. F., Santos, M., de Oliveira, T. B., Araújo, A. L. D., Normando, A. G. C., Ribeiro, A. C. P., Brandão, T. B., Vargas, P. A., Lopes, M. A., & Santos-Silva, A. R. (2020). Global prevalence of human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma following the ASCO guidelines: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *156*, 103116. https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2020.103116

Mattox, A. K., D'Souza, G., Khan, Z., Allen, H., Henson, S., Siewert, T. Y., Koch, W., Pardoll, D. M., & Fakhry, C. (2022). Comparison of next generation sequencing, droplet digital PCR, and quantitative real-time PCR for the earlier detection and quantification of HPV in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, *128*. https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2022.105805

McEvoy, A. C., Warburton, L., Al-Ogaili, Z., Celliers, L., Calapre, L., Pereira, M. R., Khattak, M. A., Meniawy, T. M., Millward, M., Ziman, M., & Gray, E. S. (2018). Correlation between circulating tumour DNA and metabolic tumour burden in metastatic melanoma patients. *BMC Cancer*, *18*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/S12885-018-4637-6/TABLES/3

Molano, M., van den Brule, A., Plummer, M., Weiderpass, E., Posso, H., Arslan, A., Meijer, C. J. L. M., Muñoz, N., Franceschi, S. (2003). Determinants of Clearance of Human

Papillomavirus Infections in Colombian Women with Normal Cytology: A Population-based, 5-Year Follow-up Study. *American Journal of Epidemiology*, *158*(5), 486–494. https://doi.org/10.1093/AJE/KWG171

Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2009). Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *PLoS Pathogens*, *5*(10), 1000605. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000605

Moss, J., Magenheim, J., Neiman, D., Zemmour, H., Loyfer, N., Korach, A., Samet, Y., Maoz, M., Druid, H., Arner, P., Fu, K. Y., Kiss, E., Spalding, K. L., Landesberg, G., Zick, A., Grinshpun, A., Shapiro, A. M. J., Grompe, M., Wittenberg, A. D., Glaser, B., Shemer, R ., Kaplan, T ., Dor, Y. (2018). Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-018-07466-6

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., & Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *348*(6), 518–527. https://doi.org/10.1056/NEJMOA021641

Myint, N. N. M., Verma, A. M., Fernandez-Garcia, D., Sarmah, P., Tarpey, P. S., Al-Aqbi, S. S., Cai, H., Trigg, R., West, K., Howells, L. M., Thomas, A., Brown, K., Guttery, D. S., Singh, B., Pringle, H. J., McDermott, U., Shaw, J. A., & Rufini, A. (2018). Circulating tumor DNA in patients with colorectal adenomas: assessment of detectability and genetic heterogeneity. *Cell Death & Disease 2018 9:9*, *9*(9), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0934-x

Nakagawa, S., & Huibregtse, J. M. (2000). Human Scribble (Vartul) Is Targeted for Ubiquitin-Mediated Degradation by the High-Risk Papillomavirus E6 Proteins and the E6AP Ubiquitin-Protein Ligase. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(21), 8244. https://doi.org/10.1128/MCB.20.21.8244-8253.2000

O'Boyle, C. J., Siravegna, G., Varmeh, S., Queenan, N., Michel, A., Pang, K. C. S., Stein, J., Thierauf, J. C., Sadow, P. M., Faquin, W. C., Wang, W., Deschler, D. G., Emerick, K. S., Varvares, M. A., Park, J. C., Clark, J. R., Chan, A. W., Busse, P. M., Corcoran, R. B., Wirth, L. J., Lin, D. T., Iafrate, A. J., Richmon, J. D., Faden, D. L. (2022). Cell-free human papillomavirus DNA kinetics after surgery for human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer*, *128*(11), 2193–2204. https://doi.org/10.1002/CNCR.34109

O'Connell, G. C., Petrone, A. B., Tennant, C. S., Lucke-Wold, N., Kabbani, Y., Tarabishy, A. R., Chantler, P. D., & Barr, T. L. (2017). Circulating extracellular DNA levels are

acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02699052.2017.1312018*, *31*(10), 1369–1375. https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1312018

Oh, S. T., Kyo, S., & Laimins, L. A. (2001). Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein: Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression through Myc and GC-Rich Sp1 Binding Sites. *Journal of Virology*, *75*(12), 5559–5566. https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001/ASSET/B9320397-A3E0-4695-BA12-0949CD09A41B/ASSETS/GRAPHIC/JV1210205006.JPEG

Ohlenschläger, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., Baum, M., Korbas, M., Meyer-Klaucke, W., Dürst, M., & Görlach, M. (2006). Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene 2006 25:44*, *25*(44), 5953–5959. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209584

Parfenov, M., Pedamallu, C. S., Gehlenborg, N., Freeman, S. S., Danilova, L., Bristow, C. A., Lee, S., Hadjipanayis, A. G., Ivanova, E. V., Wilkerson, M. D., Protopopov, A., Yang, L., Seth, S., Song, X., Tang, J., Ren, X., Zhang, J., Pantazi, A., Santoso, N., Xu, A. W., Mahadeshwar, H., Wheeler, D. A., Haddad, R. I., Jung, J., Ojesina, A. I., Issaeva, N., Yarbrough, W. G., Hayes, D. N., Grandism, J. R., El-Naggar, A. K., Meyerson, M., Park, P. J., Chin, L., Seidman, J. G., Hammerman, P. S., Kucherlapati, R. (2014). Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(43), 15544–15549. https://doi.org/10.1073/PNAS.1416074111/SUPPL_FILE/PNAS.1416074111.SD01.XLSX

Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A., & McCance, D. J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO Journal*, *18*(18), 5061–5072. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.18.5061

*Petca, A., Borislavschi, A., Zvanca, M. E., Petca, R.-C., Sandru, F., & Dumitrascu, M. C. (2020). Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *20*(6), 1–1. https://doi.org/10.3892/ETM.2020.9316

Phelps, W. C., Yee, C. L., Münger, K., & Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, *53*(4), 539–547. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90570-3

Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2017). Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *97*(6), 691–700. https://doi.org/10.1177/0022034517744213

Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P. E., Maucort-Boulch, D., & Wheeler, C. M. (2007). A 2-Year Prospective Study of Human Papillomavirus Persistence among Women with a Cytological Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *The Journal of Infectious Diseases*, *195*(11), 1582–1589. https://doi.org/10.1086/516784

Radley, D., Saah, A., & Stanley, M. (2016). Persistent infection with human papillomavirus 16 or 18 is strongly linked with high-grade cervical disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *12*(3), 768. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1088616

Ren, S., Gaykalova, D. A., Guo, T., Favorov, A. V., Fertig, E. J., Tamayo, P., Callejas-Valera, J. L., Allevato, M., Gilardi, M., Santos, J., Fukusumi, T., Sakai, A., Ando, M., Sadat, S., Liu, C., Xu, G., Fisch, K. M., Wang, Z., Molinolo, A. A., Gutkind, J. S., Ideker, T., Koch, W. M., Califano, J. A. (2020). HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers. *Oncogene*, *39*(40), 6327. https://doi.org/10.1038/S41388-020-01431-8

Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1522. https://doi.org/10.1073/PNAS.0508815103

Roden, R. B., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1996). In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *Journal of Virology*, *70*(9), 5875. https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.5875-5883.1996

Rotnáglová, E., Tachezy, R., Saláková, M., Procházka, B., Košl'Abová, E., Veselá, E., Ludvíková, V., Hamšíková, E., & Klozar, J. (2011). HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *International Journal of Cancer*, *129*(1), 101–110. https://doi.org/10.1002/IJC.25889

Rutkowski, T. W., Mazurek, A. M., Śnietura, M., Hejduk, B., Jędrzejewska, M., Bobek-Billewicz, B., D'Amico, A., Pigłowski, W., Wygoda, A., Składowski, K., Kołosza, Z., & Widłak, P. (2020). Circulating HPV16 DNA may complement imaging assessment of early treatment efficacy in patients with HPV-positive oropharyngeal cancer. *Journal of Translational Medicine 2020 18:1*, *18*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/S12967-020-02330-Y

Sabeena, S., Bhat, P., Kamath, V., & Arunkumar, G. (2017). Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *43*(3), 429–435. https://doi.org/10.1111/JOG.13248

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, *75*(3), 495–505. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3

Sedman, T., Sedman, J., & Stenlund, A. (1997). Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *Journal of Virology*, *71*(4), 2887. https://doi.org/10.1128/JVI.71.4.2887-2896.1997

Siravegna, G., O'Boyle, C. J., Varmeh, S., Queenan, N., Michel, A., Stein, J., Thierauf, J., Sadow, P. M., Faquin, W. C., Perry, S. K., Bard, A. Z., Wang, W., Deschler, D. G., Emerick, K. S., Varvares, M. A., Park, J. C., Clark, J. R., Chan, A. W., Arasa, V. C. A., Sakai, O., Lennerz, J., Corcoran, R. B., Wirth, L. J., Lin, D. T., Iafrate, A. J., Richmon, J. D., Faden, D. L. (2022). Cell free HPV DNA provides an accurate and rapid diagnosis of HPV-associated head and neck cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *28*(4), 719. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3151

Smotkin, D., & Wettstein, F. O. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *Journal of Virology*, *61*(5), 1686–1689. https://doi.org/10.1128/JVI.61.5.1686-1689.1987

Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., & Shendure, J. (2016). Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, *164*(1–2), 57–68. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.050

Sorenson, G. D., Pribish, D. M., Valone, F. H., Memoli, V. A., Bzik, D. J., & Yao, S. L. (1994). Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *3*(1), 67–71. https://aacrjournals.org/cebp/article/3/1/67/158072/Soluble-normal-and-mutated-DNA-sequences-from

*Stanley, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*, *117*(2), S5–S10. https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2010.01.024

*Stein, A. P., Saha, S., Kraninger, J. L., Swick, A. D., Yu, M., Lambert, P. F., & Kimple, R. J. (2015). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a systematic review. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *21*(3), 138. https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000115

Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., & Laimins, L. A. (2000). The E8^E2C Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes. *Journal of Virology*, *74*(3), 1178–1186. https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1178-1186.2000

Sverdrup, F., & Khan, S. A. (1994). Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *Journal of Virology*, *68*(1), 505. https://doi.org/10.1128/JVI.68.1.505-509.1994

Tamkovich, S. N., Cherepanova, A. V., Kolesnikova, E. V., Rykova, E. Y., Pyshnyi, D. V., Vlassov, V. V., & Laktionov, P. P. (2006). Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1075*(1), 191–196. https://doi.org/10.1196/ANNALS.1368.026

Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., & Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, *45*(11), 1732–1740. https://doi.org/10.1172/JCI105479

Tanaka, H., Suzuki, M., Takemoto, N., Fukusumi, T., Eguchi, H., Takai, E., Kanai, H., Tatsumi, M., Horie, M., Takenaka, Y., Yachida, S., & Inohara, H. (2022). Performance of oral HPV DNA, oral HPV mRNA and circulating tumor HPV DNA in the detection of HPV-related oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary. *International Journal of Cancer*, *150*(1), 174–186. https://doi.org/10.1002/IJC.33798

Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H. L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C. S., Desai, J., Tran, B., Strausberg, R. L., Diaz, L. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Gibbs, P. (2015). Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, *26*(8), 1715–1722. https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV177

Todorovic, B., Hung, K., Massimi, P., Avvakumov, N., Dick, F. A., Shaw, G. S., Banks, L., & Mymryk, J. S. (2012). Conserved Region 3 of Human Papillomavirus 16 E7 Contributes to Deregulation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. *Journal of Virology*, *86*(24), 13313–13323. https://doi.org/10.1128/JVI.01637-12/ASSET/D06000A6-6858-4626-9926-E0F7F3D3A229/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990969230009.JPEG

Tsumita, T., & Iwanaga, M. (1963). Fate of Injected Deoxyribonucleic Acid in Mice. *Nature 1963 198:4885*, *198*(4885), 1088–1089. https://doi.org/10.1038/1981088a0

Veyer, D., Wack, M., Mandavit, M., Garrigou, S., Hans, S., Bonfils, P., Tartour, E., Bélec, L., Wang-Renault, S. F., Laurent-Puig, P., Mirghani, H., Rance, B., Taly, V., Badoual, C., &

Péré, H. (2020). HPV circulating tumoral DNA quantification by droplet-based digital PCR: A promising predictive and prognostic biomarker for HPV-associated oropharyngeal cancers. *International Journal of Cancer*, *147*(4), 1222–1227. https://doi.org/10.1002/IJC.32804

Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T., Xie, H., Zhou, W., & Wang, S. (2017). Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*, *8*(26), 43180. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17858

Wang, X., Liu, H., Ge, H., Ajiro, M., Sharma, N. R., Meyers, C., Morozov, P., Tuschl, T., Klar, A., Court, D., & Zhenga, Z. M. (2017). Viral DNA Replication Orientation and hnRNPs Regulate Transcription of the Human Papillomavirus 18 Late Promoter. *MBio*, *8*(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.00713-17

Wilson, I. J., Burchell, R. K., Worth, A. J., Burton, S. E., Gedye, K. R., Clark, K. J., Crosse, K. R., Jack, M., Odom, T. F., De Grey, S. J., McGlade, K. M. S., Tomlin, S. C., Lopez-Villalobos, N., & Gal, A. (2018). Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(1), 157–164. https://doi.org/10.1111/JVIM.14901

Xu, R. H., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flagg, K., Yi, S., Shi, W., Quan, Q., Li, K., Zheng, L., Zhang, H., Caughey, B. A., Zhao, Q., Hou, J., Zhang, R., Xu, Y., Cai, H., Li, G., Hou, R., Zhong, Z., Lin, D., Fu, X., Zhu, J., Duan, Y., Yu, M., Ying, B., Zhang, W., Wang, J., Zhang, E., Zhang, C., Li, O., Guo, R., Carter, H., Zhu, J. K., Hao, X., Zhang, K. (2017). Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nature Materials 2017 16:11*, *16*(11), 1155–1161. https://doi.org/10.1038/nmat4997

Xue, X. Y., Majerciak, V., Uberoi, A., Kim, B. H., Gotte, D., Chen, X., Cam, M., Lambert, P. F., & Zheng, Z. M. (2017). The full transcription map of mouse papillomavirus type 1 (MmuPV1) in mouse wart tissues. *PLoS Pathogens*, *13*(11), e1006715. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006715

*Yu, L., Majerciak, V., & Zheng, Z. M. (2022). HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4943. https://doi.org/10.3390/IJMS23094943

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., & Jansen-Dürr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, *13*(11), 2323–2330. https://europepmc.org/article/med/8957073

Zhang, R., Nakahira, K., Guo, X., Choi, A. M. K., & Gu, Z. (2016). Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep36097

Zhou, N., Yuan, S., Wang, R., Zhang, W., & Chen, J. J. (2015). Role of dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B (Dyrk1B) in S-phase entry of HPV E7 expressing cells from quiescence. *Oncotarget*, *6*(31), 30745. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5222

* sekundární citace

Internetové odkazy :

FDA approves first blood test to detect gene mutation associated with non-small cell lung cancer | FDA. (n.d.). Retrieved April 29, 2023, from https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-blood-test-detect-gene-mutation-associated-non-small-cell-lung-cancer

Global Cancer Observatory. (n.d.). Retrieved April 30, 2023, from https://gco.iarc.fr/

PaVE. (n.d.). Retrieved March 10, 2023, from https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/human_genomes