

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Virologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kristýna Glendová

Molekulární testování nádorů hlavy a krku asociovaných s HPV infekcí

Molecular analysis of head and neck carcinomas associated with HPV infection

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ing. Libor Staněk

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 30.4.2018

Podpis

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ing. Liboru Staňkovi, za cenné rady a čas, který mi věnoval a bez něhož by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tereze Fiedlerové, Ph.D a Mgr. Olze Svobodové, za pomoc s vyhodnocováním multiplex qPCR u HPV a Mgr. Zdeňku Musilovi z Ústavu biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN za pomoc s analýzou Braf genu.

Dále společnosti Synlab czech s.r.o. za umožnění zpracovávat práci v jejich laboratořích a za finanční podporu, Fakultní Nemocnici Královské Vinohrady za poskytnutí materiálu a umožnění zpracovávat práci v jejich laboratořích.

Abstrakt

Nádory hlavy a krku (HNSCC) jsou vysoce heterogenní onemocnění, které je důsledkem dvou hlavních karcinogenů – tabáku a/nebo alkoholu, či infekcí HR HPV. Tato práce vycházela z 60 biopsií nádorů hlavy a krku zalitých do parafínu, po histologické verifikaci. Pomocí multiplex qPCR byla sledována HPV infekce, včetně konkrétních typů, v různých oblastech HNSCC. Následnou IHC se prokazovala exprese p16^{INK4A} a p53 jako možný diagnostický biomarker. Na základě údajů, že pacienti s HNSCC mohou profitovat z antiEGFR terapie pomocí Cetuximabu, avšak doposud bez definovaných prediktorů, byla provedena analýza bodových mutací genů rodiny Ras (Kras, Nras) a Braf. Tyto mutace byly sledovány jako potenciální prediktivní biomarkery, spolu v korelaci s pohlavím, věkem a jinými rizikovými faktory. Pro veškeré statistické zpracování byl použit Chí- x^2 test.

Klíčová slova: Nádory hlavy a krku, biopsie, typy HPV, PCR, p16^{INK4A}, p53, molekulární prediktory, Kras, Nras, Braf

Abstract

Head and neck cancers (HNSCC) are highly heterogeneous disease, results from two major carcinogens - tobacco and/or alcohol, or HR HPV infection. This thesis was based on 60 biopsies of head and neck tumours embedded into paraffin after histological verification. HPV infection, including particular types was monitored in different HNSCC regions by multiplex qPCR. Subsequent IHC demonstrated expression of p16^{INK4A} and p53 as a possible diagnostic biomarker. Based on the information, patients with HNSCC can benefit from antiEGFR therapy by Cetuximab, but so far without defined predictors, the analysis of point mutations of Ras gene family (Kras, Nras) and Braf gene was performed. These mutations were monitored as potential predictive biomarkers, in correlation with gender, age and other risk factors. For all statistical processing the Chi-x² test was used.

Key words: Head and neck cancers, biopsy, HPV types, PCR, p16^{INK4A}, p53, molecular predictors, Kras, Nras, Braf

Obsah

1	ÚVOD	17
2	CÍLE PRÁCE	18
3	PŘEHLED LITERATURY	19
3.1	HPV – LIDSKÉ PAPILOMAVIRY (HUMAN PAPILLOMAVIRUSES)	19
3.2	HISTORICKÉ MILNÍKY V OBJEVU PAPILOMAVIRŮ	21
3.3	INFEKCE A ŽIVOTNÍ CYKLUS HPV	22
3.3.1	Infekce	22
3.3.2	Životní cyklus	23
3.4	STRUKTURA PAPILOMAVIRŮ	25
3.4.1	Virion	25
3.4.2	Genom	26
3.4.3	Virové proteiny	27
3.5	ONKOLOGICKÝ POTENCIÁL A KARCINOGENEZE HPV	29
3.5.1	p16 ^{INK4A} - p16 inhibitor kinázy 4	29
3.5.2	Virové proteiny E6 a E7 HR HPV	29
3.5.3	Rozdíl mezi HR a LR HPV	32
3.6	ÚNIK HPV PŘED IMUNITNÍM SYSTÉMEM	33
3.7	EPIDEMIOLOGIE	34
3.7.1	Epidemiologie rakoviny děložního čípku	34
3.7.2	Epidemiologie nádorů hlavy a krku	36
3.7.3	HPV pozitivní nádory hlavy a krku	38
3.8	LÉČBA HNSCC	40
3.8.1	Molekulární aspekty EGFR u nádorů hlavy a krku	40
3.8.2	Cílená léčba nádorů hlavy a krku	41
3.8.3	Imunoterapie	42
4	MATERIÁL A METODY	44
4.1	SOUBOR PACIENTŮ	44
4.1.1	Použité chemikálie	45
4.1.2	Použité kity	45
4.2	METODY	48
4.2.1	Řezání parafínových bloků	48
4.2.2	Deparafinace a izolace DNA	48
4.2.3	Kvantitativní multiplex Real-Time PCR	49
4.2.4	Příprava histologických řezů pro následnou robotickou IHC	52

4.2.5	Imunohistochemický průkaz (IHC).....	52
4.2.6	Detekce Kras a Nras	52
4.2.7	Sangerovo sekvenování genu Braf	56
4.2.8	Statistická analýza	57
5	VÝSLEDKY	58
5.1	DETEKCE HPV	58
5.2	IHC DETEKCE P16 ^{INK4A}	60
5.3	IHC DETEKCE P53.....	62
5.4	MUTAČNÍ ANALÝZA GENU RAS	65
5.4.1	Kras	65
5.4.2	Nras	66
5.5	MUTAČNÍ ANALÝZA GENU BRAF	67
6	DISKUZE.....	68
7	SOUHRN.....	75
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
A	PŘÍLOHY.....	89

SEZNAM ZKRATEK

AA	Aminokyselina	Amino acid
Arg	Arginin	Arginine
Brd4	Protein 4 obsahující bromodoménu	Bromodomain-containing protein 4
CC	Clampingová kontrola	Clamping control
CDK	Cyklin dependentní kináza	Cyclin dependent kinase
CIN	Cervikální intraepiteliální neoplazie	Cervical intraepithelial neoplasia
CMV	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
CRPV	Shopeho virus papilomatózy králíků	Cottontail rabbit papillomavirus
CRS	Syndrom vypuštění cytokinů	Cytokine release syndrom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	Deoxyribonucleic acid
E2F	Eukaryotický transkripční faktor 2	Eucaryotic transcription factor 2
E6-AP	E6-asociovaný protein	E6-associated protein
EBV	Epstein-Barr virus	Epstein-Barr virus
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru	Epidermal growth factor receptor
EtOH	Etanol	Ethanol
Fadd	Fas asociovaný protein se smrtící doménou	Fas-associated protein with death domain
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv	Food and Drug Administration
FFPE	Formalínem fixovaná tkáň v parafínu	Formalin-fixed paraffin-embedded
FNKV	Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady	-
Gln	Glutamin	Glutamine
HB-EGF	Heparin vázající-epidermálnímu růstovému faktoru-podobný růstový faktor	Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor

HER	Receptor lidského epidermálního růstového faktoru	Human epidermal growth factor receptor
HNSCC	Dlaždicobuněčné nádory hlavy a krku	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Lidský papilomavirus	Human papillomavirus
HR	Vysokorizikový	High risk
HSV-2	Herpes simplex virus 2	Herpes simplex virus 2
IC	Interní kontrola	Internal control
IFN α	Interferon alfa	Interferon alpha
IFN β	Interferon beta	Interferon beta
IgG	Imunoglobulin G	Immunoglobulin G
IRF-1	Interferonový regulační faktor 1	Interferon regulated factor 1
IRF-3	Interferonový regulační faktor 3	Interferon regulated factor 3
Jak-STAT	Janusova kináza	Janus kinase-Signal transducers and activators of transcription
LCR	Dlouhá kontrolní oblast	Long control region
LR	Nízkorizikové	Low risk
MMP	Matrix metaloproteinázy	Matrix metalloproteinase
mRNA	Mediátorová RNA	Messenger RNA
non-OP	Ne-orofaryngeální	Non-oropharynx
NOR	Národní onkologický registr	-
nt	Nukleotid	Nucleotide
NTC	Negativní kontrola	Negative template control
OP	Orofaryng	Oropharynx
ORF	Otevřený čtecí rámec	Open reading frame
pAE	Časný polyadenylační signál	Early polyadenylation signal
pAL	Pozdní polyadenylační signál	Late polyadenylation signal

PC	Pozitivní kontrola	Positive control
PI3K/Akt	Fosfatidylinositol-3-fosfát/protein kináza B	Phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleová kyselina	Ribonucleic acid
rpm	Otáčky za minutu	Revolutions per minute
RRP	Rekurentní respirační papilomatóza	Recurrent respiratory papillomatosis
SP1	Specifický protein 1	Specifity protein 1
SVOD	Software pro vizualizaci onkologických dat	-
TGF alfa	Transformující růstový faktor alfa	Tumor growth factor alpha
TP53	Tumor supresorový protein p53	Tumor protein 53
Tyk2	Tyrosin kináza 2	Tyrosine kinase 2
URR	Upstream regulační oblasti	Upstream regulatory region
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor	vascular endothelial growth factor
VLPs	Viru podobné částice	Virus like particles
WHO	Světová zdravotní organizace	World Health Organization
WT	Divoký typ	Wild type

1 ÚVOD

Lidský papilomavirus (HPV) je dvouvláknový DNA virus, s tropismem k epitelíím pokožky a sliznic genitálního traktu nebo horních cest dýchacích. Je přenášen hlavně pohlavním stykem a vstupuje do těla skrz mikroléze. Na základě schopnosti papilomavirů indukovat rakovinu byly rozděleny na nízkorizikové (low-risk) a vysokorizikové (high-risk). Nízkorizikové typy jsou zodpovědné za bradavice. Vysokorizikové typy jsou spojovány s malignitami anogenitálních oblastí a oblastí hlavy a krku. Rakovina děložního čípku je u žen druhou nejčastější rakovinou. U více než 95 % případů rakoviny děložního čípku lze prokázat infekci onkogenními high-risk HPV typy (nejvíce HPV 16 a HPV 18). U rakoviny děložního čípku je popisována až 100 % nadprodukce proteinu p16^{INK4A}, která je jedním z nejspolehlivějších diagnostických markerů, pro transformační procesy probíhající ve virem infikovaných hostitelských buňkách děložního čípku.

První část této diplomové práce se tedy zabývá IHC detekcí exprese proteinu p16^{INK4A} u HPV pozitivních nádorů hlavy a krku a možnou korelací mezi nimi. Protein p53 je pravděpodobně počáteční genetickou změnou ve vývoji dlaždicobuněčných karcinomů. Dále se bude tedy tato práce zabývat z hlediska prognózy detekcí proteinu p53 v HPV pozitivních a HPV negativních HNSCC a korelací mezi nimi.

Na základě změny profilu pacientů s HNSCC se uvažuje, že papilomaviry zvyšují riziko pro vznik rakoviny a jsou kauzálně spojené s vývojem HNSCC, nezávisle na dvou hlavních karcinogenech – tabáku a alkoholu. HPV pozitivní pacienti s HNSCC mají odlišnou molekulární charakteristiku a jsou spojovány s lepší prognózou, reakcí na léčbu a s vyšším celkovým přežitím. Pacienti s HNSCC mohou profitovat z antiEGFR terapie pomocí Cetuximabu, avšak doposud bez definovaných prediktorů, jako je tomu u CRC.

Druhá část této diplomové práce se tedy bude zabývat testováním nádorů HNSCC právě na mutace v genech Kras, Nras a Braf, jako možný prediktor biologické léčby.

Výsledky této práce by měly přispět k porozumění incidence HPV infekce v různých oblastech HNSCC, za současné korelace exprese proteinu p16, popřípadě p53, jako potenciální diagnostický, či prognostický marker. Výsledky zmapování mutací genů Kras, Nras a braf, by mohly přispět k terapii, jako možný prediktor biologické léčby.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem první části této práce bude na základě retrospektivní studie sledovat HPV infekci a možné diagnostické biomarkery v různých lokalizacích u nádorů hlavy a krku. Z terapeutického hlediska budou v druhé části této práce sledovány bodové mutace v genech Kras, Nras a Braf, jako potenciální prediktory cílené terapie pomocí Cetuximabu.

Jednotlivé cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- Monitorovat HPV infekci v odlišných oblastech nádorů hlavy a krku
- Porovnat incidenci a frekvenci konkrétních typů HPV
- Stanovit expresi proteinu p16^{INK4A} a proteinu p53 a zjistit možnou korelaci s HPV infekcí
- Na základě těchto dat navrhnout jejich možné využití, jako potenciální diagnostické biomarkery
- Sledovat korelaci mezi expresí zmíněných proteinů a HPV infekce
- Testovat mutace genů rodiny RAS, konkrétně Kras a Nras v exonech 2; 3 a 4 a v případě genu Braf se bude sledovat mutace V600
- Sledovat korelaci mutací těchto genů spolu s rizikovými faktory a HPV infekcí

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 HPV – lidské papilomaviry (Human papillomaviruses)

Papilomaviry jsou malé, neobalené dvouvláknové DNA viry s vysokým hostitelským a tkáňovým tropismem. Doposud bylo identifikováno přes 240 odlišných typů HPV, lidských i zvířecích, které byly zařazeny do 37 evolučních rodů, na základě podobnosti DNA sekvence, s různými charakteristikami životního cyklu a asociacemi k nemocím. Mezi nimi je 5 evolučních rodů lidských papilomavirů – alfa, beta, gama, ný a mý (Obr. 1) (α , β , γ , μ , ν) (Coggin & Hausen, 1979).

Skupina alfa je největší a nejvíce prostudována. Papilomaviry jsou v ní rozděleny podle tropismu ke kožnímu, nebo slizničnímu epitelu. Na základě jejich schopnosti indukovat rakovinu, jsou papilomaviry infikující slizniční epitel dále rozděleny na nízkorizikové – LR (low-risk) a vysoce rizikové – HR (high-risk).

Kožní HPV typy ve skupině alfa jsou také „nízkorizikové“ a způsobují běžné bradavice, které jsou zřídka spojeny s malignitami. Beta, gama, ný a mý papilomaviry způsobují kožní léze, které mohou být obtížné pro pacienty s těžkou kombinovanou imunodeficiencí, epidermodysplasia verruciformis a u příjemců transplantovaných orgánů, či jinak imunosuprimovaných pacientů.

Nízkorizikové typy jsou zodpovědné za běžné bradavice, venerické bradavice na pohlavních orgánech, *condyloma acuminatum*, nebo za velmi malé změny buněk. S malignitami jsou spojovány velmi málo, nebo vůbec. Infekce LR HPV jsou zcela běžné a obecně platí, že léze jsou samy-limitující a většinou jsou vyčištěny imunitním systémem hostitele. Alfa typy, HPV 3 a HPV 10, jsou zodpovědné za ploché bradavice (Gross, Pfister, Hagedorn, & Gissmann, 1982; Pfister, Gross, & Hagedorn, 1979) a alfa typy, HPV 2, HPV 27 a HPV 57, jsou nejvíce převládající v běžných bradavicích, spolu s mý typem HPV 1 (Chen, Tsao, Lee, Sheu, & Liu, 1993). Za pohlavní bradavice mohou typy HPV 6, HPV 11 (Disorders, Island, Medical, Hyde, & Biology, 1989; Lutz Gissmann & Hausen, 1980), které jsou zodpovědné také za rekurentní respirační papilomatózu (RRP – recurrent respiratory papillomatosis). RRP je charakterizována proliferací benigních dlaždicových papilomů v aerodigestivním traktu, které mají tendenci metastazovat (Bennett & Powell, 1987; Mounts, Shah, & Kashimat, 1982).



3.2 Historické milníky v objevu papilomavirů

Kožní a genitální bradavice byly dobře známe již od dob Hippokrata, kdy byly spojovány s homosexualitou a promiskuitou a již považované za infekční.

Jako první epidemiologické pozorování se dá považovat analýza italského lékaře Rigonio-Stterna o úmrtí, v důsledku rakoviny ve Veroně v období 1760-1839. Pozoroval větší výskyt karcinomu děložního čípku u vdancích žen, vdov a prostitutek a velmi malý u jeptišek. Tato pozorování ho vedla k domněnce, že tento typ rakoviny je přenosný sexuálně. Trvalo dalších 50 let, než byla popsána infekční povaha kožních bradavic (Payne, 1891). O několik let později, v roce 1907, provedl lékař G. Ciuffo pokus, ve kterém si sám naočkoval na své předloktí hrubý filtrát z bradavic a demonstroval tak přenosnou etiologii zodpovědného agens.

V roce 1933 byl izolován a charakterizován první papilomavirus u divokých králíků *Sylvilagus floridanus* – CRPV (cottontail rabbit papillomavirus) (Shope, Richard, & Weston, 1933) a o dva roky později, v roce 1935, bylo pozorováno, že papilomatózy indukované papilomavirem mají potenciál měnit se v maligní léze (Beard, 1935). Až v roce 1969 byly prokázány virové partikule v jádře dlaždicových buněk pomocí elektronové mikroskopie (Almeida, Oriel, & Stannard, 1969; Dunn & Ogilvie, 1968).

V 70. letech 19. století se začal věnovat papilomavirům Dr. Harald zur Hausen, který se stal jedním z průkopníků v jejich výzkumu. Prokázal, že za genitální a kožní bradavice mohou rozdílné typy papilomavirů a formuloval hypotézu, že papilomaviry jsou etiologické agens, zodpovědné za rakovinu cervixu (H Zur Hausen, 1977; Harald Zur Hausen, 1976).

K tomuto poznání přispěl i významný český vědec, profesor Vladimír Vonka. Koncem 60. let se předpokládalo, že etiologickým faktorem, majícím význam v rakovině děložního čípku, je herpes simplex virus typu 2 (HSV-2), kvůli vyšší prevalenci HSV-2 protilátek u žen s rakovinou děložního čípku (Janda, Kanka, Vonka, & Svoboda, 1973; Luce & Guest, 1970; Melnick & Rawlston, 1970). Profesor Vonka svou osmiletou studii, ve které bylo přes 10 000 žen, prokázal, že HSV-2 není zahrnut v patogenezi rakoviny děložního čípku (Vonka, Kanka, Hirsch, Zavadova, & Suchankoval, 1984) a tuto hypotézu vyvrátil.

Od 80. let 19. století získal výzkum v oblasti papilomavirů vyšší zájem. Byl izolován a charakterizován papilomavirus, způsobující genitální bradavice, HPV 6 (Lutz Gissmann & Hausen, 1980) a následně i HPV 11 (L Gissmann, Diehl, Schultzcoulon, & Zur Hausen, 1982). V roce 1983 byl izolován nejvýznamnější papilomavirus z nádoru děložního čípku, HPV 16 (Dürst, Gissmann, Ikenberg, & zur Hausen, 1983) a o rok později HPV 18 (Boshart *et al.*, 1984). V roce 1983, Syrjanen *et al.* podpořil teorii, že papilomavirus má etiologickou roli také u nádorů hlavy a krku. Detekoval strukturní proteiny v dlaždicových buňkách karcinomu dutiny ústní (Syrjanen, Pyrhonen, Syrjanen, & Lamberg, 1983).

3.3 Infekce a životní cyklus HPV

3.3.1 Infekce

Mezi rizikové faktory HPV infekce patří vyšší počet sexuálních partnerů, užívání tabákových výrobků či alkoholu, brzké zahájení sexuálního života nebo imunodeficiency. (J. Palefsky, 2007; J. M. Palefsky, Holly, Ralston, & Jay, 1998; Roset Bahmanyar *et al.*, 2012).

Lidské papilomaviry jsou nejčastější virovou infekcí reprodukční soustavy a většina sexuálně aktivních jedinců, ženy i muži, budou v určitém okamžiku svého života infikovány. Pohlavní styk se považuje za primární cestu přenosu genitální infekce HPV. Avšak přenos infekce není pouze sexuálním stykem (vaginálním, análním i orálním), ale i tělesným kontaktem (skin-to-skin). Zvýšené riziko přenosu je u narušeného povrchu kůže (oděrky, škrábance, strupy, ekzém). Riziko vertikální přenosu z matky na dítě je možné, ale relativně nízké (Castellsagué *et al.*, 2009). Nejčastěji se jedná o infekci dítěte během porodu, kdy má matka genitální bradavice. Následně může dojít k rozvinutí rekurentní respirační papilomatózy (Hajek, 1956). K infekci může dojít i prostřednictvím infikovaných předmětů. Virus může být infekční až 7 dní po odloučení keratinocyty (Roden, Lowy, & Schiller, 1997).

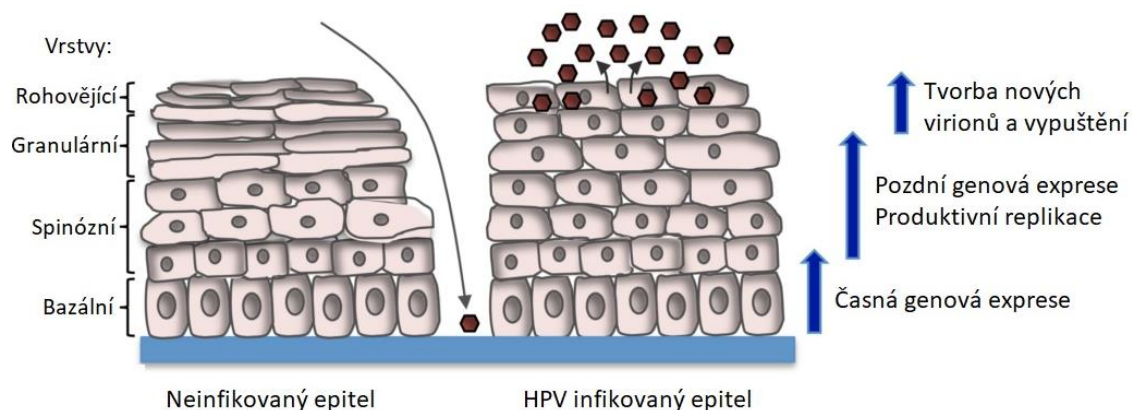
3.3.2 Životní cyklus

Životní cyklus papilomavirů a exprese jejich proteinů, je úzce propojena a koordinována s diferenciačním procesem hostitelských epitelálních buněk (Obr. 2). Cílem papilomavirů je stratifikovaný epitel. V přirozených podmínkách stratifikovaného epitelu je bazální buňka připojená k bazální membráně jedinou buňkou, která má potenciál proliferovat. Ta se rozděluje na novou bazální a dceřinnou buňku, která se oddělí od bazální membrány a zahajuje svůj diferenciační proces.

Lidské papilomaviry infikují buňky bazální membrány stratifikovaných epitelů skrz mikroléze, vzniklé kožním nebo slizničním traumatem, kde rozeznávají receptor pomocí majoritního kapsidového proteinu L1 a pravděpodobně ko-receptory. Receptorem jsou proteoglykany heparan sulfátu na povrchu epitelálních buněk nebo bazální membrány (Giroglou, Florin, Schafer, Streeck, & Sapp, 2001; Joyce *et al.*, 1999) a vstupuje do buňky endocytózou, do endosomu. Pro únik viru z endosomu hraje zásadní roli L2 kapsidový protein, který byl naštěpen furinem již při vstupu viru do buňky, což je zároveň důležité pro výstup komplexu L2 a virového genomu z endosomu (Kamper *et al.*, 2006; Richards, Lowy, Schiller, & Day, 2006). Následně je virus transportován po mikrotubulech k jádru, pomocí interakce L2 proteinu a dyneinu (Florin *et al.*, 2006). Protein L2 doprovází virový genom do jádra (Becker, Florin, Sapp, & Sapp, 2003; Darshan, Lucchi, Harding, & Moroianu, 2004; Fay *et al.*, 2004), avšak mechanismus, kterým virový genom vstupuje do jádra není dosud pochopen. V jádře genom papilomavirů přebývá jako extrachromozomální DNA (epizom) v nízkých hladinách, přibližně v 50-100 kopiích na buňku. Následuje transkripce časných genů z časného promotoru, lokalizovaného uvnitř LCR oblasti (long control region), pomocí buněčné RNA polymerázy II.

Po opuštění bazální membrány zahajují buňky diferenciační program, kdy ukončují svůj buněčný cyklus. Pro zajištění replikace virového genomu v buňce je potřeba reaktivace buněčného dělení v těchto buňkách. To je zprostředkováno virovými proteiny E6 a E7, které inaktivují tumor supresorové geny p53 a pRb, čímž umožňují buňkám udržet si svůj replikační potenciál. V horních epitelálních vrstvách následně dochází k výrazné expresi virových genů, potřebných pro

replikaci virového genomu (Hummel *et al.*, 1992, Ozbun a Meyers, 1997), který se tak amplifikuje na tisíce kopií na buňku (Bedell *et al.*, 1991). Po amplifikaci genomu, je v terminálně diferencovaných buňkách spuštěna syntéza pozdních, kapsidových proteinů L1 a L2, které tvoří spolu s virovou DNA nové viriony, které jsou následně uvolňovány do extracelulárního prostředí.



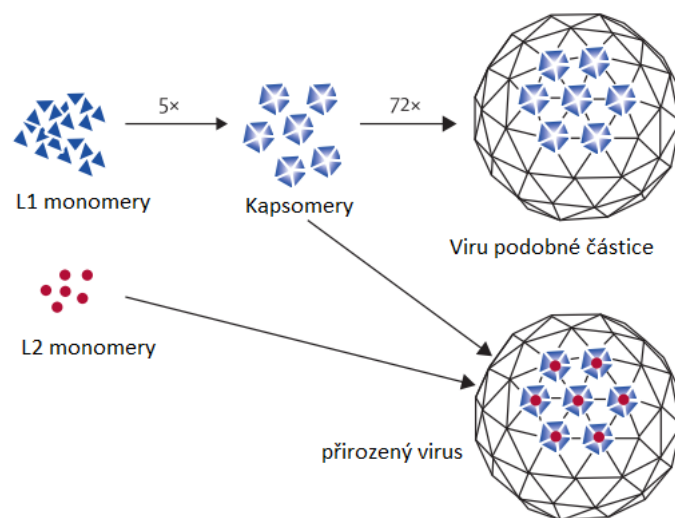
Obr. 2: Životní cyklus lidských papilomavirů.

Papilomaviry infikují keratinocyty v bazální vrstvě epitelu skrz mikroléze. Vlevo je normální, neinfikovaný epitel a vpravo epitel infikovaný HPV. Po infekci je virový genom udržován v jádře v nízkých počtech kopií jako episom, replikovány spolu s buněčnou DNA. Po rozdělení buněk jedna dceřinná buňka opouští bazální vrstvu podstupující diferenciaci a tento proces diferenciacie indukuje produktivní fázi virového životního cyklu. Za účelem aktivace mechanismu buněčné syntézy DNA jsou exprimovány virové E6 a E7 proteiny, které jsou odpovědné za deregulaci kontroly buněčného cyklu a tlačí diferenciacní buňky, aby vstoupily do S fáze buněčného cyklu. Replikace virového genomu se pak vyskytuje v buňkách, které by normálně prošly terminální diferenciací. Pozdní proteiny L1 a L2 jsou syntetizovány pouze v horních vrstvách epitelu a jsou shromážděny společně s virovými genomy za vzniku virionů, které se uvolňují na povrchu epitelu. Upraveno dle (Moody, 2017).

3.4 Struktura papilomavirů

3.4.1 Virion

Viriony papilomavirů jsou poměrně malé, neobalené partikule, složené ze 72 pentamerických kapsomerů, uspořádaných v $T = 7$ ikosahedrál ní mřížce (Finch & Klug, 1965) (Obr. 3). Každý kapsomer obsahuje pět monomerů majoritního kapsidového proteinu L1 (55 kDa) a 12 kopií L2 minoritního proteinu (74 kDa) (Finnen, Erickson, Chen, Garcea, & Finnen, 1965; Komly, Breitburd, Croissant, & Streeck, 1986; Sapp & Bienkowska-Haba, 2009; Trus *et al.*, 1997). Majoritní protein L1 je schopen se skládat do viru podobných částic VLPs (virus like particles), které mají velmi podobnou strukturu a imunologický charakter jako přirozený virion.



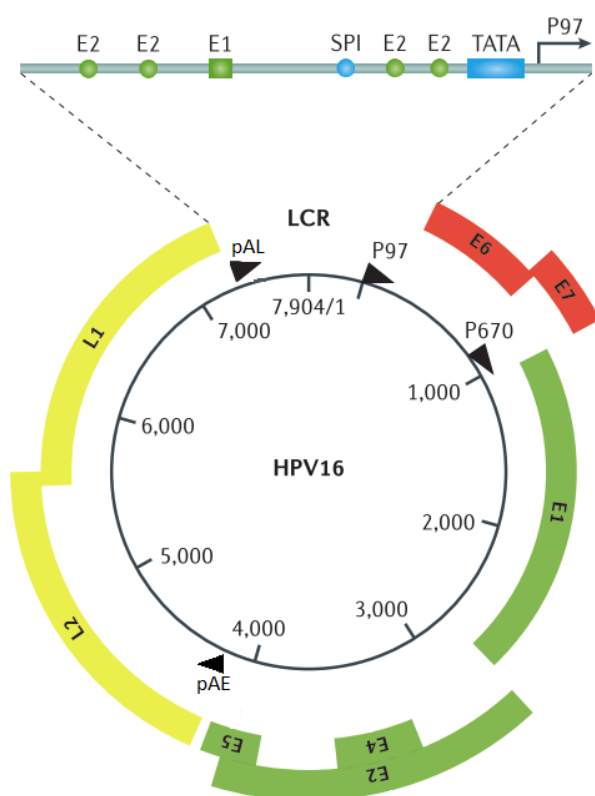
Obr. 3: Sestavení HPV virionů.

Kapsomery jsou složeny z pěti L1 je majoritních kapsidových proteinů, které mohou tvořit viru podobné částice (VLPs). L2 je minoritní kapsidový protein. Dohromady tvoří tyto proteiny virion. Upraveno dle (Schiller & Müller, 2015).

3.4.2 Genom

Genom papilomavirů je velký přibližně 8 kb. Jejich dvouřetězcová cirkulární DNA molekula obsahuje 8 otevřených čtecích rámců (ORF-open reading frame), které jsou transkribovány jako polycistronické zprávy z jediného řetězce DNA (Obr. 4) ukončeny časným (pAE) nebo pozdním (pAL) polyadenylačním signálem.

Otevřené čtecí rámce jsou rozděleny na oblasti časně (E-early), pozdní (L-late) a nekódující oblast (URR-upstream regulatory region, zvané také LCR-long control region), ve které jsou regulační sekvence. Časná oblast kóduje proteiny, které jsou zahrnuty v replikaci, transkripci a transformaci z časného promotoru (p97 u HPV 16). Jsou to proteiny E1, E2, E4, E5, E6 a E7 a pozdní oblast kóduje kapsidové proteiny L1 a L2 z pozdního promotoru (P670 u HPV 16).



Obr. 4: Organizace genomu HPV 16.

Zobrazený genom HPV-16 ukazuje obecnou organizaci HPV otevřených čtecích rámců (ORF) a regulačních oblastí. Jiné typy HPV mají organizaci genomu podobnou. Jsou znázorněny časně (P97) a pozdní (P670) promotory, označeny šipkami. Šest

počátečních otevřených čtecích rámců (ORF), E1, E2, E4 a E5 (zeleně) a E6 a E7 (červeně), jsou exprimovány z různých promotorů v různých stádiích během diferenciacie epitelálních buněk. L1 a L2 (žluté), jsou exprimovány z pozdního promotoru p670 (lokalizován v E7 kódující oblasti), jak se diferencuje infikovaná buňka. Dlouhá kontrolní oblast (LCR), na obrázku zvětšena pro lepší vizualizaci, je nekódující oblast genomu, která obsahuje počátek replikace a post-transkripční kontrolní sekvence, které přispívají k expresi virových genů. Jsou uvedeny vazebná místa pro virové genové produkty E1 a E2 a transkripční faktor SP1. Upraveno dle (Schiffman *et al.*, 2016).

3.4.3 Virové proteiny

Proteiny E1 a E2

Hlavní funkcí virových proteinů E1 a E2 je zajištění replikace virové DNA. E2 se váže jako transkripční aktivátor nebo represor na sekvence kolem počátku replikace (Mohr *et al.*, 1990) v regulačním regionu genomu viru. E1 je enzym DNA helikáza, jež hraje roli při zahájení syntézy virové DNA a při její elongaci (Liu, Kuo, Broker, & Chow, 1995). E2 protein podporuje a zvyšuje funkci E1 proteinu (Frattini & Laimins, 1994) a zajišťuje segregaci virové DNA do dělicích se buněk během mitózy (Bastien & McBride, 2000; Lehman & Botchan, 1998) tak, že váže virový genom k mitotickým chromozomům, pomocí Brd4 proteinu (bromodomain-containing protein 4) (You, Croyle, Nishimura, Ozato, & Howley, 2004), který má roli v regulaci buněčného růstu a při progresi buněčného cyklu (Houzelstein *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2002).

Protein E1^{E4}

Protein E4 je exprimován jako E1^{E4}, který je během počátečního virového replikačního cyklu v hostitelské buňce nedetekovatelný. Tento fakt a zjištění, že hladiny E4 se zvyšují s šířením viru, naznačují úlohu E4 v pozdních stádiích HPV replikačního cyklu (Doorbar, Medcalf, & Naphine, 1996; Peh *et al.*, 2002), kterou je rozrušení buněčné cytotokeratinové sítě (Doorbar, Ely, Sterling, McLean, & Crawford, 1991). Avšak funkce proteinu E1^{E4} stále ještě není úplně objasněna.

Protein E5

U některých virů je E5 čtecí rámec nepřítomen, tudíž se předpokládá, že pro životní cyklus není nezbytně důležitý (Schiffman *et al.*, 2005). Virový protein E5 iniciuje různé biochemické cesty, které nakonec vedou k transkripci a aktivaci protoonkogenů, jako jsou c-jun a c-fos, čímž dochází k růstu a proliferaci hostitelských buněk. Například protein E5 HPV-6 se může vázat na epidermální růstový faktor a receptory erbB2 (Conrad, Goldstein, Andresson, & Schlegel, 1994) a protein E5 HPV-16 prodlužuje poločas rozpadu aktivního receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) na povrchu buněk (Straight, Hinkle, Jewers, & McCance, 1993). I funkce proteinu E5 stále není do detailu objasněna, ale předpokládá se, že má tento protein roli v časných fázích HPV indukované karcinogeneze, protože v buňkách invazivního karcinomu již není exprimován (Baker *et al.*, 1987).

Proteiny E6 a E7

Proteiny E6 a E7 jsou hlavní transformační virové proteiny a jsou detailněji popsány v následující kapitole 3.5.2 Virové onkoproteiny E6 a E7 HR HPV.

Protein L1 a L2

Majoritní protein L1 a minoritní protein L2 tvoří virion papilomavirů a jsou popsány v předchozí kapitole 3.4.1 Virion.

3.5 Onkologický potenciál a karcinogeneze HPV

3.5.1 p16^{INK4A} - p16 inhibitor kinázy 4

Tumor supresorový protein p16^{INK4A} je inhibitor cyklin dependentních kináz a je nezbytný v regulaci buněčného cyklu, konkrétně přechodu z G1 do S fáze. Pro vstup do G1 fáze je potřeba komplexu cyklin dependentní kinázy (CDK) 4 a 6 a cyklinu D, který inaktivuje protein pRb jeho fosforylací a tím spustí proliferaci (Obr. 6). Za fyziologických podmínek protein p16^{INK4A}, který je negativně regulován pRb, vytváří negativní zpětnou vazbu a váže cyklin dependentní kinázy 4 a 6 a zabraňuje jejich interakci s cyklinem D (Bates *et al.*, 1994), čímž zabraňuje nadměrné expresi sama sebe a dalších genů, které jsou aktivovány E2F. Díky kontrolované expresi těchto genů zůstávají i hladiny p14^{ARF} nízké, což umožňuje proteinu MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) provádět svou normální roli, kterou je regulace p53 a buňka přirozeně proliferuje. Díky schopnosti virového onkogenu E7 inaktivovat pRb, dochází k nadměrné expresi p16^{INK4A}, který se tak stává účinným biomarkerem v cervikálních prekancerózách a nádorech vyvolaných HPV (Focchi *et al.*, 2007; Keating *et al.*, 2001).

3.5.2 Virové proteiny E6 a E7 HR HPV

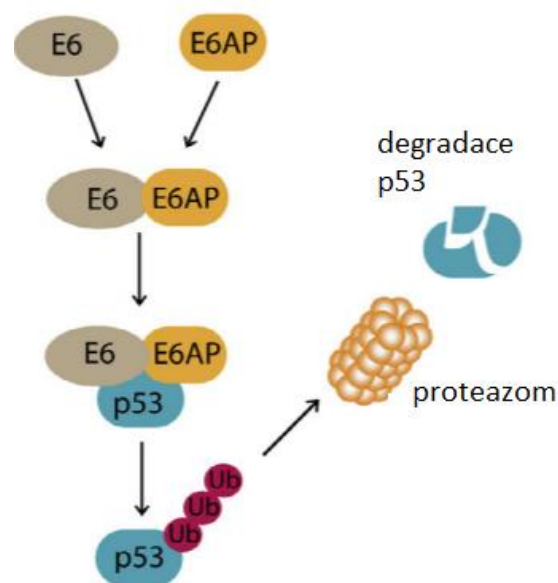
Jak již bylo zmíněno, proteiny E6 a E7 HR HPV typů imortalizují buňky, a právě jejich schopnost asociovat s tumorovými supresory p53 a pRB, byla navržena jako mechanismus, kterým tyto virové proteiny indukují nádory.

Virový protein E6

Onkoprotein E6 stimuluje degradaci tumor supresorového proteinu p53 (Obr. 5) (Werness, Levine, & Howley, 1990). Tumor supresorový protein p53, lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13), řídí růst buněk regulací progresu buněčného cyklu a reakcí na stres přes apoptózu (Agarwal *et al.*, 1998). Avšak je i dalším genem, který se uplatňuje v rámci karcinogeneze. K jeho dysregulaci dochází kromě vzniku mutací, také následkem HPV infekce a

virových příslušných proteinů, které jej inaktivují (E6). Následná neschopnost buňky inhibovat buněčný růst a indukovat apoptózu vede ke genetické nestabilitě.

Degradace je zprostředkována interakcí E6 virového proteinu s buněčným E6 asociovaným proteinem (E6-associated protein) (Huibregtse, Scheffner, & Howley, 1991). Tato interakce zvyšuje afinitu E6-AP k p53 a dochází k přenosu ubiquitinových peptidů na p53 protein (Scheffner & Huibregtse, 1993). Následuje degradace ve 26S proteazomu (Maki, Huibregtse, & Howley, 1996) a buňka může proliferovat. Protein E6 interferuje mimojiné i s dalšími pro-apoptotickými proteiny, jako jsou například Bak (M. Thomas & Banks, 1998), Fas-associated death domain (Fadd) a Prokaspázou 8 (Garnett, Filippova, & Duerksen-Hughes, 2007).



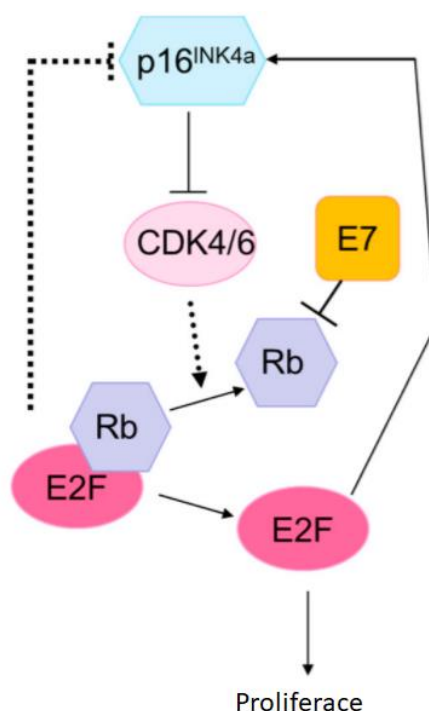
Obr. 5: Degradace tumor supresorového proteinu p53 HPV onkoproteinem E6.

Nejlépe charakterizovaná aktivita HPV E6 proteinu je asociace s ubiquitin proteinovou ligázou E6-AP. Dimerní komplex se váže na p53 a E6-AP katalyzuje multi-ubikvitinizaci p53 a následuje jeho degradace v proteazomu.

Virový protein E7

Virový onkoprotein E7 se váže na tumor supresorový genový produkt protein pRb (Obr. 6) (Dyson, Howley, Munger, & Harlow, 1989), který se v hypofosforylovaném stavu váže na transkripční faktor E2F, čímž reguluje progresi buněčného cyklu (Chellappan, Hiebert, Mudryj, Horowitz, & Nevins, 1991). Touto vazbou E7 na pRb se uvolní transkripční faktor E2F, dochází k proliferaci a zároveň ke zvýšené expresi p16^{INK4A} (Sano *et al.*, 2004), který je proteinem pRb negativně regulován.

Absence účinné inhibice progresu buněčného cyklu pomocí p16^{INK4A} může vést k jeho akumulaci v buňce a ke zvýšení hladin genů, které jsou aktivovány E2F a následovný nárůst hladin p14^{ARF} může ohrožovat funkci MDM2 při degradaci p53, což vede k jeho nadbytku a zastavení buněčného cyklu. To je však potlačeno vysoko rizikovým proteinem E6, který p53 degraduje.



Obr. 6: Deregulace přechodu G1/S fáze pomocí HPV onkoproteinu E7 a exprese p16.

E7 protein se váže na několik buněčných faktorů, přičemž nejlépe je charakterizována jeho asociace s proteinem retinoblastomu (pRb). G1 specifický komplex pRb a E2F působí jako transkripční represor na protein p16^{INK4A}. V klidových buňkách hypofosforylovaná forma pRb potlačuje transkripci genů závislých na E2F

přímou vazbou na transaktivní doménu E2F. Po vystavení mitogenním signálům dochází k fosforylaci pRB komplexem cyklinu D a CDK4/CDK6, což vede k uvolnění E2F a progresi buněčného cyklu. Vazba HR HPV onkoproteinu E7 na pRb narušuje komplex pRb a E2F, což vede ke konstitutivní expresi genů. V důsledku toho mohou buňky, které exprimují E7, vstupovat do S fáze bez mitogenních signálů. Upraveno dle (Litwin, Clarke, Dean, & Wentzensen, 2017).

3.5.3 Rozdíl mezi HR a LR HPV

Papilomaviry byly rozděleny na high risk a low risk podle jejich schopnosti způsobovat maligní nebo benigní léze. HPV pozitivní nádorové biopsie děložního čípku obsahují specifické transkripty ze dvou čtecích rámců, pocházejících z perzistující HPV DNA (Schwarz *et al.*, 1985). Tyto dva geny HR HPV typů, E6 a E7, immortalizují keratinocyty, což vede k intraepiteliálním neoplasiím (Hawley-Nelson, Vousden, Hubbert, Lowy, & Schiller, 1989; Munger, Phelps, Bubb, Howley, & Schlegel, 1989) a je běžně pozorována chromozomální nestabilita.

Aneuploidie byla detekovaná u HPV 16 a HPV 18 pozitivních klinických lézí, tedy HR HPV typů, ale nedetekovatelná u LR infekcí (Melsheimer, Vinokurova, Wentzensen, Bastert, & von Knebel Doeberitz, 2004). Transkripce a translace proteinů E6 a E7 jsou mezi HR a LR HPV typy regulovány odlišně. LR HPV mají promotor upstream od E6 a další upstream od E7, zatímco HR HPV mají jediný promotor upstream od E6 a je produkována polycistronická mRNA (Smotkin, Prokoph, & Wettstein, 1989). Proteiny pRb a p53 mají definovanou roli v buněčném cyklu a jejich ovlivnění virovými proteiny E6 a E7 vede k jeho dysregulaci. U LR infekcí je ovšem afinita oproti HR infekcím k těmto buněčným proteinům velmi slabá, nebo žádná. Díky těmto vlastnostem mají HR HPV větší potenciál vyvolat maligní léze.

3.6 Únik HPV před imunitním systémem

Papilomaviry jsou evolučně velmi staré a vyvíjejí se spolu s jejich hostitelem, tudíž jsou jako infekční agens evolučně úspěšní. Vyvinuly různé mechanismy imunitního úniku, které jim umožňují nejen modulovat imunitní odpověď hostitele, která by mohla vzniknout během infekce a vzniku prekancerózních lézí, ale také aby nebyly rozpoznány a zůstaly z velké části neviditelné pro obranné mechanismy hostitele. Virový životní cyklus je dokonale přizpůsoben k zajištění imunitní nevědomosti. Místo infekce je lokalizováno v bazální buňce a během permissivní infekce je virový genom udržován při nízkých počtech kopií. Tím se minimalizuje expozice antigenu pro imunocyty. Stejně je udržována i exprese virových časných proteinů. Pozdní protein L1, který je nejvíce považován za imunogenní (Kirnbauer, Booyt, Chengt, Lowy, & Schiller, 1992) není exprimován v bazálních buňkách, ale v horních vrstvách dlaždicobuněčného epitelu, kam nemají cirkulující imunitní buňky snadný přístup a účinná imunitní odpověď nemůže být zahájena.

Dále nedochází téměř k virémii a k virem indukované cytolýze nebo nekróze infikovaných buněk. Nově vytvořené viriony se uvolňují během přirozeně se vyskytující buněčné smrti diferencovaných keratinocytů. Infekce jsou bez závažných komplikací a hostitel obvykle není infekcí HPV znevýhodněn.

Mimoiné papilomaviry unikají imunitnímu dozoru i aktivním způsobem. Proteiny papilomavirů se přímo zaměřují na součásti vrozeného imunitního systému, které inhibují, např. ihned po HPV infekci dochází k inhibici IFN odpovědi typu I. IFN α je obvykle produkován infikovanými buňkami a navádí neutrofily, makrofágy, NK buňky (natural killer) a dendritické buňky do místa infekce. Protein E6 HPV 16 interaguje s interferonovým regulačním faktorem (IRF-3), který reguluje expresi IFN α a IFN β genů, čímž narušuje jeho schopnost působit jako transkripční aktivátor (Ronco, Karpova, Vidal, & Howley, 1998). Dále E6 váže tyrosin kinázu 2 (Tyk2-Tyrosine kinase 2), která je členem Jak-STAT dráhy a inhibuje její funkci (Li *et al.*, 1999). Podobně bylo ukázáno, že E7 váže interferonový regulační faktor 1 (IRF-1) a blokuje jeho funkci aktivovat expresi IFN β (Park *et al.*, 2000).

I přes schopnost papilomavirů unikat hostitelskému imunitnímu dozoru, či ho modulovat, je až v 80 % případů infekce během několika měsíců eliminována. Přičemž u LR-HPV je tato doba kratší, než u HR-HPV (Goodman *et al.*, 2009). HPV 16 má průměrnou délku perzistence delší, než většina ostatních, vysoce rizikových typů (Koshiol *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2010).

3.7 Epidemiologie

3.7.1 Epidemiologie rakoviny děložního čípku

Druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen je rakovina děložního hrdla. V České republice je ročně diagnostikováno 850-900 těchto nádorů a z nich 70 % karcinomů tvoří dlaždicové karcinomy a 25 % cervikální adenokarcinomy. Ostatní nádory jsou raritní a tvoří 1-2 %.

U více než 95 % případů lze prokázat infekci onkogenními HR HPV typy. (Bekkers *et al.*, 2003). Nejčastějším typem, nalézaným v nádorových buňkách děložního hrdla, je celosvětově nejvíce HPV 16 (ve více než 50 % případů) a HPV 18 (40 % případů), a dále sestupně HPV 45 a HPV 31, HPV 33, HPV 52, HPV 58, HPV 35 a HPV 59 (Pirog *et al.*, 2000).

Karcinomy mají téměř vždy přednádorová stadia (tzv. prekancerózy), což jsou buněčné změny, které jsou ohraničeny pouze na vrstvu epitelu a nemají ještě schopnost metastazovat. Většinu těchto infekcí odstraní imunitní systém ženy sám. Pouze u malé části se z této infekce vyvine přednádorový stav a pouze u zlomku změna pokračuje v zhoubný nádor (Richardson, Abrahamowicz, Tellier, & Kellsall, 2005). Přetrvávání viru v epitelu je největším rizikem pro vznik přednádorového stavu a karcinomu. Perzistentní HPV infekce způsobuje prekurzorové léze, tzv. cervikální intraepitelová neoplazie (CIN), které mohou vést k invazivnímu karcinomu. Dochází k poruše vyžívání epitelu s jadernými i buněčnými nepravidłnostmi, ztrátě polarizace a zvýšené mitotické aktivitě. Na základě výšky epitelu, kde je ještě zachovaná diferenciace jsou tyto prekancerózní změny rozděleny do tří progresivních rizikových skupin:

CIN I	mírná dysplazie epitelu, většinou dochází k likvidaci organismem, diferenciaci zachovaná v horních 2/3
CIN II	středně výrazná dysplazie, diferenciaci zachovaná v horní 1/2
CIN III	těžká dysplazie, jedná se o karcinom <i>in situ</i> , potřeba chirurgického zákroku (konizace), dysplastický epitel v celém rozsahu

Pouze malé procento CIN I lézí se může vyvinout v CIN II nebo CIN III a méně než polovina CIN III se vyvine v invazivní rakovinu (McCredie *et al.*, 2008).

Jak již bylo zmíněno výše, HR HPV dokáže funkčně inaktivovat protein pRb, pomocí virového proteinu E7 a ve výsledku dochází k nadprodukci p16^{INK4A}. CIN I, které prokazují pozitivní expresi p16^{INK4A}, se vyvinou v CIN II nebo CIN III s větší pravděpodobností, než p16^{INK4A} negativní léze (Negri *et al.*, 2004). Stupeň exprese p16 dobře koreluje se stupněm cervikální neoplasie, zvyšuje se s progresí onemocnění (Zhong *et al.*, 2015) a bývá popisována téměř u 100 % CIN III neoplazií (Agoff *et al.*, 2003). Detekce nadprodukce onkoproteinu p16^{INK4A} je jedním z nejspolehlivějších diagnostických markerů, pro transformační procesy probíhající ve virem infikovaných hostitelských buňkách děložního čípku (Klaes *et al.*, 2001). U cervikálních lézí, které nejsou spojené s HPV infekcí nebyla prokázána exprese p16^{INK4A} (Redman, Rufforny, Liu, Wilkinson, & Massoll, 2008).

Expresí proteinu p16^{INK4A} však byla prokázána i v řadě prekancerózních lézí i maligních nádorech, které nemají příčinnou souvislost s HPV infekcí. Jedná se např. o karcinomy trávicího traktu, konkrétně o tlusté střevo (Ayhan *et al.*, 2010) nebo žlučník (Choi, Yun, Kim, & Choi, 2010). Šlo o expresi převážně ve vyšších stadiích rakoviny. Zvýšená exprese byla detekována i v karcinomech vývodných cest močových opět ve vyšších stadiích rakoviny (Nakazawa *et al.*, 2009). V karcinomu žaludku a jícnu byla sledována spíše ztráta nebo snížená exprese p16^{INK4A} (Kishimoto *et al.*, 2008; Taghavi *et al.*, 2010). U karcinomu děložního čípku lze detekovat p16^{INK4A} již v časných stadiích, což přispívá k časnějšímu zachytu onemocnění. Zdá se, že je tomu tak i u HPV asociovaných nádorů hlavy a krku (J. Thomas & Primeaux, 2012).

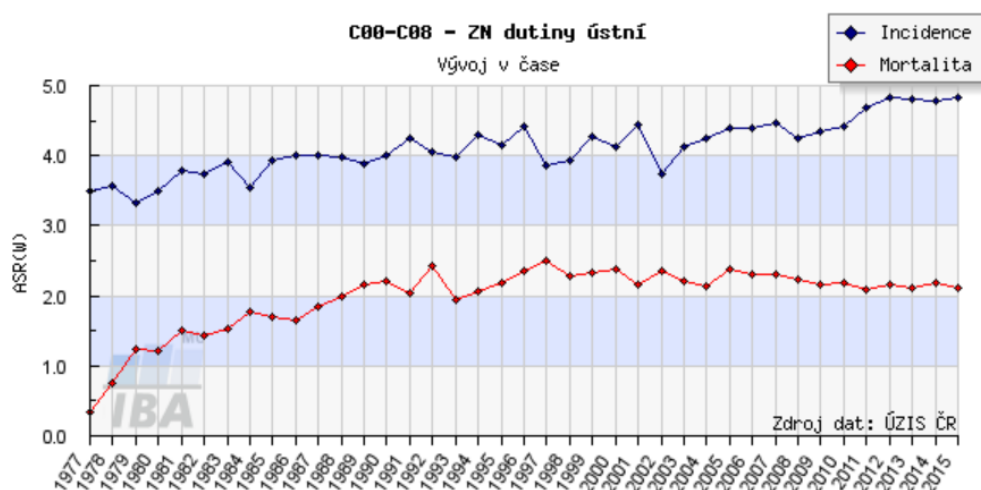
3.7.2 Epidemiologie nádorů hlavy a krku

Nádory hlavy a krku jsou čtvrtým nejčastějším typem nádorů u mužů v evropských zemích. V České republice bylo v roce 2015 do Národního onkologického registru ČR (NOR) nahlášeno celkem 1619 případů zhoubných nádorů hlavy a krku, z toho 1161 novotvarů u mužů a 458 u žen. Počet zemřelých byl u mužů 553 a u žen 190. Dle softwaru pro vizualizaci onkologických dat (SVOD) a údajů z Národního onkologického registru dat, zpracovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky v České republice (ÚZIS), incidence u obou pohlaví stále narůstá (Graf 1 a Graf 2).¹ Tato narůstající incidence byla zaznamenána i v dalších zemích Evropy či USA (Garnaes *et al.*, 2015; Hammarstedt *et al.*, 2007; Chaturvedi, Engels, Anderson, & Gillison, 2008).

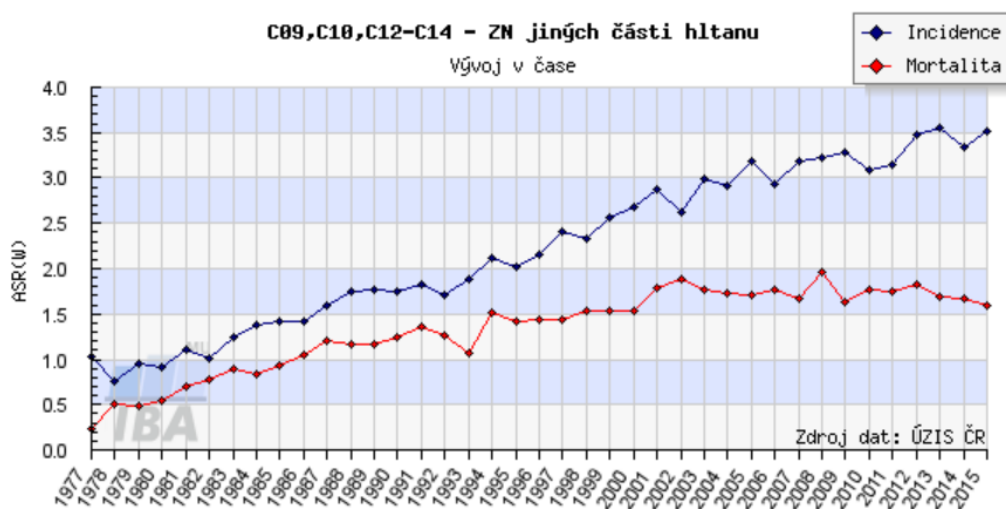
Nádory hlavy a krku vznikají v dutině ústní, nasofaryngu, orofaryngu, laryngu a hypofaryngu. V dutině ústní povrch sliznice tvoří tlustý vrstevnatý dlaždicový epitel, rohovatějící i nerohovatějící. Nasofaryng je vystlán víceřadým cylindrickým epitelem s řasinkami, který na přechodu do orofaryngu přechází ve vrstevnatý dlaždicový nerohovatějící epitel. Laryng je tvořen víceřadým cylindrickým epitelem s řasinkami a hypofaryng nerohovatějícím vrstevnatým dlaždicobuněčným epitelem.

Přibližně 90 % zhoubných nádorů hlavy a krku tvoří karcinomy, vznikající z dlaždicobuněčného epitelu sliznice výše zmíněných oblastí. Tradičně, v 80 % až 90 %, byl dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma) přisuzován dlouhodobé expozici tabáku a alkoholu. Mezi další rizikové faktory patří socioekonomický stav, dietní vzorce, vnější podmínky a viry mezi něž patří papilomavirus, Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) a lidský herpesvirus (HSV). Často dochází ke koinfekci dvou virů, nejčastěji EBV a HPV (Polz-gruszka, Stec, Dworzański, & Polz-dacewicz, 2015). Samotný EBV je asociován spíše s nádory nasofaryngu (Wolf, Zur Hausen, & Becker, 1973) a o něco méně se vyskytuje u nádorů dutiny ústní a orofaryngu (Goldenberg *et al.*, 2004).

¹ <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>



Graf 1: V grafu je zahrnuta celá populace ČR mezi lety 1977 až 2015. Diagnóza: C01–C08 – dutina ústní.²



Graf 2: V grafu je zahrnuta celá populace ČR mezi lety 1977 až 2015. Diagnóza: C09-C10 – orofaryng, C12-C14 – hypofaryng.³

² <http://www.svod.cz/>

³ <http://www.svod.cz/>

3.7.3 HPV pozitivní nádory hlavy a krku

Avšak epidemiologie rakoviny hlavy a krku se mění. Na základě změny profilů pacientů se uvažuje, že papilomaviry zvyšují riziko pro vznik HNSCC, nezávisle na karcinogenních účincích tabáku a alkoholu, a to odlišným způsobem od samotných karcinogenních účinků (Zandberg, Bhargava, Badin, & Cullen, 2013). Dříve byli pacienti spíše starší, konzumenti alkoholu a tabáku, s horším socioekonomickým statutem. V dnešní době jsou pacienti spíše vzdělaní lidé mladého věku, nekuřáci, nekonzumující alkohol.

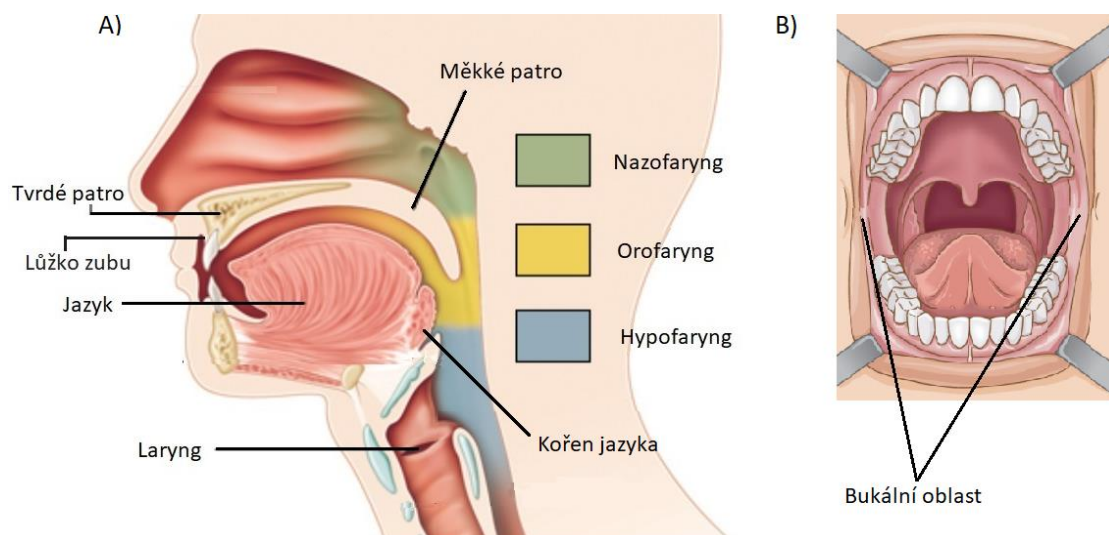
Rozdíly v HPV pozitivních a HPV negativních HNSCC jsou i z hlediska molekulárního. V HPV negativních nádorech hlavy a krku, je běžně mutován tumor supresorový gen p53 (Nigro *et al.*, 1989), či dochází ke ztrátě chromozomální oblasti 17p13, kde je gen TP53 lokalizovaný (González, Pello, & López-Larrea, 1995). Ztráta funkce p53 v důsledku mutace příslušného genu má za následek také buněčné přežívání, genetickou nestabilitu a zvýšenou expresi survivinu (Mirza *et al.*, 2002), který tak slouží jako marker horší prognózy těchto nádorů. Podobně dochází i ke ztrátě chromozomální oblasti 9p21, kde je lokalizovaný tumor supresorový gen p16^{INK4A}, již v začátku karcinogeneze, což vede také k jeho ztrátě (Reed *et al.*, 1996).

U HPV pozitivních nádorů hlavy a krku jsou mutace TP53 genu méně pravděpodobné než u nádorů HPV negativních. Většinou dochází pomocí HPV proteinu E6 spíše k inaktivaci proteinu p53, než k jeho mutaci (Werness *et al.*, 1990). Dále u těchto tumorů není pozorována ztráta p16^{INK4A}, ale díky degradaci pRb proteinem E7 dochází naopak k jeho nadprodukci. Rozpoznání rozdílných molekulárních genetických profilů, které jsou vyvolány odlišnými expozicemi prostředí, podporuje vznikající názor, že HNSCC tvoří heterogenní skupinu nádorů, které lze kategorizovat podle stavu HPV.

Podobně jako u rakoviny děložního čípku, HPV 16 se vyskytuje u převážné většiny případů nádorů hlavy a krku (v 68–87 % celosvětově) a dále HPV 18. Další typy papilomavirů se vyskytují více vzácně, jsou to HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59 a HPV 68 (Kreimer *et al.*, 2005).

Ze všech nádorů hlavy a krku jsou papilomaviry nejvíce spojovány s rakovinou dutiny ústní a orofaryngu (Kreimer *et al.*, 2005) a více než 90 % tvoří

nádory dlaždicobuněčného epitelu. Dutina ústní zahrnuje rty a jejich vnitřní část, vnitřní tváře (bukální sliznici), dásně, první dvě třetiny jazyka s podjazykovou oblastí a tvrdé patro. Orofaryng je část hrtanu, která zahrnuje kořen jazyka (zadní třetina jazyka), měkké patro, krční mandle a zadní stěnu krku (Obr.7).



Obr. 7: Znáznornění vybraných lokalizací nádorů dutiny ústní a orofaryngu.

A) Znáznornění jednotlivých lokalizací nádorů dutiny ústní a orofaryngu. Upraveno dle ⁴.

B) Znáznornění bukální oblasti (vnitřní strana tváří). Upraveno dle ⁵.

Jako hlavní rizikový faktor HPV infekce se považuje sexuální chování jedince. Tam spadá brzké zahájení sexuální aktivity (vaginální, anální i orální), nebo vyšší počet sexuálních partnerů, či sex s osobou stejného pohlaví (převážně muži) (Heck *et al.*, 2010).

Některé studie nenalezly souvislost mezi rizikem nádorů hlavy a krku, konkrétně dutiny ústní a hltanu, a sexuálním chováním jedince, což bylo pravděpodobně způsobeno odlišným sběrem dat, zařazení HPV negativních vzorků či nedostatečného počtu vzorků (Garrote *et al.*, 2001; Talamini *et al.*, 2000).

⁴ <https://www.health.harvard.edu/cancer/throat-cancer-larynx-and-pharynx>

⁵ <https://headandneckcancerguide.org/teens/cancer-basics/explore-cancer-types/oral-cancers/palatomaxillary-cancer/>

Mezi nejvýznamnější klinické přínosy je zjištění, že HPV pozitivní nádory jsou spojeny s lepší prognózou a mají odlišné molekulární charakteristiky. Tito pacienti reagují lépe na léčbu a mají vyšší míru přežití než pacienti s HPV negativními nádory (Ang *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2009; Psyrri, Rampias, & Vermorken, 2014).

Další studie dánských vědců naznačuje, že HPV status u tumorů lokalizovaných mimo orofaryng, nemá prognostický efekt na výsledek primární radioterapie. Dle této studie lze u pacientů s HPV pozitivními nádory orofaryngu zlepšit kvalitu života, použitím méně agresivní léčby.

3.8 Léčba HNSCC

Základ léčby nemetastazujících nádorů hlavy a krku je v lokálních metodách léčby, chirurgické léčbě a radioterapii, popřípadě jejich kombinaci, dále kombinovaných s chemoterapií či biologickou léčbou v závislosti na jejich stádiu a přítomných rizikových faktorech. Velká snaha je tedy věnována nejen hledání příčin vzniku nádorů, ale i nových nádorových markerů a sledování jejich diagnostického, prognostického a prediktivního významu pro jejich využití léčbě.

3.8.1 Molekulární aspekty EGFR u nádorů hlavy a krku

Je známo několik mechanismů nádorové transformace epiteliální buňky v nádorovou buňku. Mezi nejčastější patří genetické změny v jejichž důsledku dochází k alteraci genových produktů a k následné deregulaci a narušení signálních drah v buňce, která tímto získává proliferační výhody. Doposud jsou důkladněji sledovány alterace genů pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR-epidermal growth factor receptor), p16, a p53.

EGFR (erbB1, HER1), protein na povrchu buněk o velikosti 170 kDa, reguluje růst a diferenciaci buněk. Je členem rodiny erbB receptorových tyrosinkináz, čtyř úzce příbuzných buněčných membránových receptorů: EGFR (HER1 nebo erbB1), erbB2 (HER2), erbB3 (HER3) a erbB4 (HER4).

EGFR se podílí i na patogenezi HNSCC a je nadměrně exprimován až u 90% karcinomů hlavy a krku (Grandis & Tweardy, 1993). Součástí EGFR je extracelulární doména, na kterou se váže ligand (EGFR ligand, TGF-alfa, HB-EGF, či v terapeutickém případě monoklonální protilátka) a intracelulární doménu, která prostřednictvím tyrosinkinázové aktivity umožňuje přenos signálu do buňky. Mezi hlavní přenašeče signální dráhy EGFR patří Ras/Raf/MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivující proliferaci buněk, JAK-STAT (Janus-kinase/signal transducers and activators of transcription) a PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt) s vlivem na přežívání buněk.

EGFR tak hraje klíčovou roli v kancerogenezi, aktivaci buněčného dělení, inhibici apoptózy, angiogenezi, metastazování, ale i rezistenci na radioterapii, chemoterapii a hormonální léčbu. Vzhledem k funkčnímu zapojení EGFR do různých buněčných procesů by se mohly mechanismy, kterými dochází k aktivaci EGFR stát potenciální strategií k downregulaci EGFR a léčbě těchto nádorů.

3.8.2 Cílená léčba nádorů hlavy a krku

Receptor EGFR se tedy jeví jako významný terapeutický cíl. V současné době se používají dva odlišné terapeutické přístupy pro cílení EGFR v malignitách: 1) monoklonální protilátky, které se vážou na extracelulární doménu, stabilizují vázanou konformaci, blokují prodloužený stav a přímo inhibují vazbu ligandu a dimerizaci receptoru (Schmiedel, Blaukat, Li, Knoechel, & M, 2009) a 2) inhibitory tyrosinkináz, zaměřeny na intracelulární doménu (Remon, Steuer, Ramalingam, & Felip, 2018). To má za následek inhibici růstu buněk, indukci apoptózy, snížení produkce matrix metaloproteináz (MMP) a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). AntiEGFR terapie již prokázala účinky u několika solidních karcinomů, včetně HNSCC (Leoncini *et al.*, 2014)

Pozornost se tedy zaměřuje na výběr pacientů s možnou sensitivitou na Cetuximab. Cetuximab (Erbix®) je rekombinantní chimerická monoklonální IgG-1 protilátka, schválena v březnu 2006 FDA pro kombinaci s radioterapií pro léčbu nádorů hlavy a krku, nebo v monoterapii u nemocných již dříve léčených

cisplatinou. Bezpečnostní profil Cetuximabu je velmi příznivý, ale přesto při jeho aplikaci může dojít k anafylaktické či anafylaktoidní reakci nebo syndromu uvolnění cytokinů (cytokine release syndrome, CRS). Symptomy se mohou objevit kdykoli při či po podání Cetuximabu.

Doba selhání léčby u pacientů léčených Cetuximabem a cisplatinou se pohybuje v rozmezí přibližně pěti měsíců navzdory udržování léčby přípravkem Cetuximab (Vermorken *et al.*, 2008). To naznačuje, že mechanismy primární a získané rezistence značně omezují klinický přínos Cetuximabu u HNSCC.

Je tedy nutné pochopit molekulární mechanismy, které vedou k rezistenci vůči Cetuximabu, aby se maximalizovala pravděpodobnost pozitivní odpovědi na léčbu. Toho lze docílit výběrem pacientů pomocí biomarkerů, predikujících tuto odpověď.

V této souvislosti bylo studováno mnoho potenciálních molekulárních změn a drah způsobujících rezistenci v HNSCC. Aktivace mutací genů Kras a Nras downstream od EGFR tvoří důležitý mechanismus primární rezistence na protilátky u antiEGFR terapie u kolorektálního karcinomu (Di Nicolantonio *et al.*, 2008; Lièvre *et al.*, 2006; Lièvre & Laurent-Puig, 2009). U HNSCC je zatím málo studií, zaměřených na výskyt těchto prediktivních biomarkerů pro výběr pacientů. Snahou je tedy identifikovat nové prognostické a prediktivní markery pro strategii individuální biologické léčby u nádorů hlavy a krku, stejně jako je tomu například u kolorektálního karcinomu. Jako vhodné prediktory se jeví mutační změny v genech pro Kras, Nras, Braf.

3.8.3 Imunoterapie

Imunoterapie využívá imunitního systému k léčbě rakoviny. Jedním ze znaků nádorů je jejich únik imunitnímu systému organismu. Imunita eliminuje vlastní tělesné buňky. Nádorové buňky se chovají jako buňky těla vlastní, a tak dokáží přirozenou imunitní reakci obejít.

PD-1 je buněčný povrchový receptor, který patří mezi imunoglobuliny, a je kódovaný PDCD1 genem. Je exprimován na aktivovaných T lymfocytech, B lymfocytech nebo NK buňkách. Je to imunitní kontrolní bod (checkpoint), který udržuje periferní toleranci, spuštěním apoptózy v cytotoxických T-lymfocytech a zároveň snížením apoptózy regulačních T-lymfocytů.

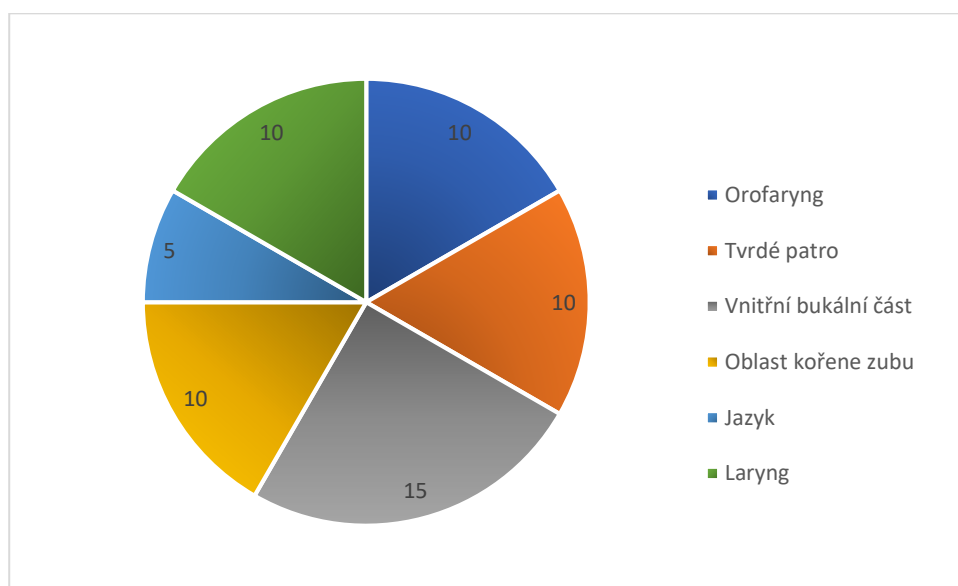
PD-1 váže dva ligandy PD-L1 a PD-L2. Nová skupina látek používaných v léčbě nádorových onemocnění jsou PD-1 inhibitory, které blokují PD-1 a aktivují imunitní systém k boji proti nádorovým onemocněním s různým efektem u nádorů hlavy a krku. Dostupné studie prokazují, že nádory s HPV etiologií a p16 expresí jsou zcela jinou jednotkou, a přímo korelují s expresí PDL-1, která je prediktorem pro zahájení imunoterapie (Balermipas *et al.*, 2017).

4 Materiál a metody

4.1 Soubor pacientů

Vzorky biopsií, fixované ve formolu a zalité v parafínu pochází z archivu Ústavu patologie, Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady (FNKV), odebrané v letech 2012-2017, převážně na oddělení ORL FNKV.

Celková kohorta sestávala z 60 pacientů s histologicky potvrzenými nádory hlavy a krku. Zahrnovala nádory dutiny ústní (orální-zubní lůžko, tvrdé patro, bukální oblast a jazyk), orofaryngu (OP-oropharyngeal) a laryngu (non-OP – nonoropharyngeal) (Graf 3).



Graf 3: Počet vzorků z jednotlivých lokalizací HNSCC.

Z 60 pacientů, ve věkovém rozmezí 29-96 let, bylo 48 (80 %) mužů, věkový medián 64,89 let a 12 (20 %) žen, věkový medián 59,16 let. 8 pacientů již nežije. Z celkového počtu 60 případů mělo 32 (53,4 %) pacientů v minulosti užívání tabáku. Procento pacientů, které mělo v minulosti konzumaci alkoholu nešlo definovat, jedná se o retrospektivní studii a výběr pacientů nebyl na základě dotazníku. Histologické typy nádorů byly ve skoro naprosté většině dlaždicobuněčné karcinomy (85 %) (Příloha A.1, A.2 a A.3), dále papilomy

(8,33 %), fibrolipomy (3,33 %), granulom (1,67 %) a lymfom (1,67 %). U všech pacientů pocházela tkáň pro analýzu z primárního místa nádoru, včetně resekčních okrajů a v některých případech spádových uzlin a okolní tkáně.

4.1.1 Použité chemikálie

Chemikálie	Popis, (dodavatel)
Ethanol	96% EtOH, (VWR International S.A.S.)
Xylen	Směs izomerů (Lach: Ner)
H ₂ O	Sterilní, neobsahuje nukleázu (nuclease free) (VWR International S.A.S.)
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý (Thermo Fisher Scientific™)
PCR pufr	(Thermo Fisher Scientific™)
Taq DNA polymeráza	(Thermo Fisher Scientific™)
dNTP Mix	dATP, dCTP, dGTP a dTTP (Thermo Fisher Scientific™)

4.1.2 Použité kity

QIAamp® DNA blood Mini Kit (250)

- Izolace DNA
- Kit byl skladován při pokojové teplotě. Proteináza K byla skladována při 2–8° C

Kit obsahuje:

Popis	Objem
AL pufr	2 x 33ml
AW1 pufr (koncentrát)*	98 ml
AW2 pufr (koncentrát)**	66 ml
AE pufr	128 ml
ATL pufr	50 ml
Proteináza K	6 ml
Sběrné zkumavky	750 ks
Kolonky s membránou	250 ks

* Před prvním použitím se přidalo 130 ml ethanolu (96% EtOH)

** Před prvním použitím se přidalo 160 ml ethanolu (96% EtOH)

Souprava HPV High Risk Real-Time PCR kit (96)

- Kit byl skladován při teplotě -20° C

Kit obsahuje:

Zkumavka	Objem
HPV High Risk Premix II A	1 x 60 µl
HPV High Risk Premix II B	1 x 60 µl
UniPremix I A	3 x 1750 µl
Taq DNA polymeráza	1 x 100 µl
IC Premix II A	1 x 40 µl
HPV High Risk kvantifikační standard A (10 ⁸ kopií cílové sekvence/ µl)	1 x 13 µl
HPV High Risk kvantifikační standard B (10 ⁸ kopií cílové sekvence/ µl)	1 x 13 µl
IC kvantifikační standard A (10 ⁸ kopií cílové sekvence/ µl)	1 x 13 µl

QClamp™ NRAS Codon Specific Mutation Detection Kit (Exons 2, 3, 4)

- Kit byl skladován při teplotě -20° C

Kit obsahuje:

Zkumavka	Objem
Externí kontrola primerů	1 x 216 µl
G12 Mix Primerů	1 x 216 µl
G12 XNA	1 x 108 µl
G13 Mix Primerů	1 x 216 µl
G13 XNA	1 x 108 µl
Q61 Mix Primerů	1 x 216 µl
Q61 XNA	1 x 108 µl
A146 Mix Primerů	1 x 216 µl
A146 XNA	1 x 108 µl
2X PCR Master Mix	2 x 1,35 ml
Clamping kontrola	1 x 120 µl
NRAS pozitivní kontrola	1 x 120 µl
Nuclease -free H ₂ O	1 x 102 µl

QClamp™ KRAS Codon Specific Mutation Detection Kit (Exons 2, 3, 4)

- Kit byl skladován při teplotě -20° C

Kit obsahuje:

Zkumavka	Objem
Externí kontrola primerů	1 x 216 µl
G12 Mix Primerů	1 x 216 µl
G12 XNA	1 x 108 µl
G13 Mix Primerů	1 x 216 µl
G13 XNA	1 x 108 µl
Q61 Mix Primerů	1 x 216 µl
Q61 XNA	1 x 108 µl
A146 Mix Primerů	1 x 216 µl
A146 XNA	1 x 108 µl
Kras 117 Mix Primerů	1 x 216 µl
Kras 117 XNA	1 x 108 µl
2X PCR Master Mix	3 x 1,08 ml
Clamping kontrola	1 x 120 µl
NRAS pozitivní kontrola	1 x 120 µl
Nuclease -free H ₂ O	1 x 228 µl

4.2 Metody

4.2.1 Řezání parafínových bloků

Řezy velké 10 µm se prováděli na mikrotomu Leica SM 2010R, ve Fakultní Nemocnici Královské Vinohrady, na oddělení patologie. Před použitím byly mikrotomový nůž, pracovní plocha a pracovní nástroje očištěny ethanolem. Parafínový blok (pokojové teploty) byl vložen do držáku mikrotomu. Nejdříve bylo odřezáno několik řezů, aby se nastavila správná pozice bloku. Do označené ependorfy bylo přendáno 3-6 řezů (v závislosti na ploše fixované tkáně) pomocí sterilní pinzety. Po každém bloku byly mikrotomový nůž a pracovní nástroje očištěny ethanolem.

4.2.2 Deparafinace a izolace DNA

Deparafinace parafínových řezů se provádělo v laminárním boxu, v místnosti sloužící pouze pro izolaci DNA. K nakrájeným vzorkům, o velikosti 10 µm, bylo přidáno 500 µl xylenu a každý vzorek byl vortexován pod dobu 10 sekund a ponechány 2-5 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly centrifugovány při 12 500 rpm, 2 minuty. Následně byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 600 µl EtOH (použitý 96% EtOH), centrifugace při 12 500 rpm, 2 minuty, odstraněn supernatant a otevřené zkumavky byly sušeny při 37° C, po dobu 10 minut. Pelet byl následně resuspendován se 180 µl ATL. Poté bylo přidáno 20 µl proteinázy K a celý obsah zkumavky byl vortexován 10 sekund. Vzorky byly inkubovány přes noc v termobloku, při 56° C.

Kvůli ověření čistoty práce byla s analyzovanými vzorky nadále zpracovávána i negativní kontrola (H₂O – nuclease free). Po natrávení bylo přidáno 200 µl AL pufru, který byl před použitím důkladně protřepán a 200 µl EtOH (použitý 96% EtOH). Vzorky byly 10 sekund vortexovány a následně centrifugovány při 12 500 rpm. Lyzát byl přenesen na kolonku s membránou. Bylo žádoucí, aby zůstaly okraje kolonky suché a špičkou se nepoškodila membrána. Následně byl lyzát centrifugován při 8000 rpm, 1 minutu. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a bylo přidáno 500 µl pufru AW1

a centrifugováno při 8000 rpm, 1 minutu. Kolonka byla opět přenesena do nové sběrné zkumavky a na membránu bylo přidáno 500 µl AW2 a centrifugováno při 8000 rpm, 1 minutu. Následovalo sušení v nové sběrné zkumavce centrifugací, při 12 500 rpm, 3 minuty. Vysušená kolonka byla přenesena do eluční 1,5 ml označené zkumavky. Bylo přidáno 50 µl AE. Inkubovalo se 1 minutu a následovala centrifugace při 12 500 rpm, 1 minutu. Finální eluční objem byl 50 µl izolované DNA, která byla zamražena v -20° C. Přístroje využívané při deparafinaci a izolaci jsou vypsány v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přístrojové vybavení pro deparafinaci a izolaci DNA:

Přístroj	Typ (výrobce)
Laminární box	FlowFast (Schoeller)
Centrifuga	Eppendorf Mini Spin (Eppendorf)
Termoblok	Cube Dry Bath (Cleaver Scientific Ltd)
Vortex	Wizard IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica)

4.2.3 Kvantitativní multiplex Real-Time PCR

Izolovaná DNA byla podrobena amplifikaci kvantitativní multiplex polymerázovou řetězcovou reakcí v reálném čase (quantitative multiplex real-time polymerase chain reaction – multiplex qPCR), kitem HPV High Risk Real-Time PCR (96), který je optimalizován pro izoláty DNA získané pomocí izolační soupravy QIAamp® DNA blood Mini Kit.

Diagnostická souprava HPV High Risk Real-Time PCR kit je založena na systému patogen-specifických primerů a sond, které v průběhu kvantitativní Real-Time PCR rozeznávají svůj specifický cíl (Tabulka 2). Interní kontrola (IC) detekuje autentický lidský gen. Z důvodu zachování maximální senzitivity diagnostické soupravy je interní kontrola amplifikována v oddělené zkumavce. V případě nepřítomnosti amplifikačního signálu IC při vyhodnocování křivek je potřeba provést znovu přípravu PCR templátu.

Tabulka 2: Diagnostická souprava detekuje následující HPV typy:

HPV High Risk Zkumavka A		HPV High Risk Zkumavka B	
Fluorofor	Detekovaný typ	Fluorofor	Detekovaný typ
FAM	HPV 16	FAM	HPV 18
HEX	HPV 45	HEX	HPV 31
ROX	HPV 26, HPV 51, HPV 82	ROX	HPV 33, HPV 35, HPV 58
Cy5	HPV 68, HPV 73	Cy5	HPV 52, HPV 53
IRDye700	HPV 59, HPV 66	IRDye700	HPV 39, HPV 56
Zkumavka IC A			
Fluorofor	Detekovaný typ		
FAM	Interní kontrola (IC) A (detekuje autentický lidský gen)		

Amplifikační reakce byla připravována v místnosti sloužící pouze pro přípravu PCR Premixu v PCR boxu. Reagencie Unipremix I A, HPV High risk Premix II A, HPV High risk Premix II B a Interní kontrola Premix II A byly před použitím rozmrazeny, zvortexovány a stočeny ve stolní centrifuze. Taq DNA polymeráza byla uchována v mraženém bloku a před přidáním pouze stočena.

Směs reagensů (Tabulka 3, 4 a 5) byla rozpipetována do jednotlivých zkumavek v namraženém bločku na 0,1 ml stripu, dle předem připraveného pipetovacího protokolu. Následující práce pokračovala mimo PCR box.

Rozmražená DNA z ruční izolace byla lehce zvortexována a stočena. Vždy jako první byly k reakční směsi přidány 2 µl negativní kontroly, vytvořené po trávení, která byla okamžitě zavíčkována. Stejně byly přidány i 2 µl izolované DNA k reakční směsi. V post-PCR místnosti byly již rozmražené kvantifikační standardy HPV High Risk A, HPV High Risk B a IC A zvortexovány, stočeny a také přidány, po 2 µl každý. Analýza probíhala v PCR rotoru, na předdefinovaném programu (tabulka 6). Použité přístroje jsou vypsány v Tabulce 7.

Tabulka 3:

Rozpis 1 PCR reakce pro amplifikaci HPV High Risk, A:

17,0 µl	UniPremix I A	
0,6 µl	HPV High Risk Premix II A	
0,4 µl	Taq DNA polymeráza	
18 µl	Celkový objem	+ 2 µl DNA templátu

Tabulka 4:

Rozpis 1 PCR reakce pro amplifikaci HPV High Risk, B:

17,0 µl	UniPremix I A	
0,6 µl	HPV High Risk Premix II B	
0,4 µl	Taq DNA polymeráza A	
18 µl	Celkový objem	+ 2 µl DNA templátu

Tabulka 5:

Rozpis 1 PCR reakce pro amplifikaci IC:

17,0 µl	UniPremix I A	
0,6 µl	IC Premix II A	
0,4 µl	Taq DNA polymeráza A	
18 µl	Celkový objem	+ 2 µl DNA templátu

Tabulka 6: Teplotní profil Real-Time PCR reakce:

Krok	Teplota	Čas (sekundy)	Cykly
Úvodní fáze	94° C	300	1
Denaturace	94° C	20	X55
Hybridizace	58° C	30 (snímání fluorescence)	
Elongace	72° C	30	

Tabulka 7: Přístrojové vybavení pro kvantitativní multiplex Real-Time PCR:

Přístroj	Typ (výrobce)
PCR box	Aura PCR (EuroClone)
Stolní centrifuga	Spectrafuge™ Mini (Labnet)
PCR rotor	Rotor-Gene Q (Qiagen)
Vortex	Wizard IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica)

4.2.4 Příprava histologických řezů pro následnou robotickou IHC

Tkáň fixovaná ve formolu a zalitá do parafínu byla po histologické verifikaci (barvení hematoxylin-eosinem) nakrájena na řezy o tloušťce jedné vrstvy buněk cca 4-8 μm na mikrotomu Leica SM 2010R, ve Fakultní Nemocnici Královské Vinohrady, na oddělení patologie. Nakrájené řezy byly na vodní hladině napnuty a nanášeny na podložní sklo superfrost, kde se nechaly zaschnout. Následně byl z řezů pomocí xylenu odstraněn parafin a byly zavodněny v alkoholové řadě.

4.2.5 Imunohistochemický průkaz (IHC)

IHC p16 bylo provedeno pomocí myší monoklonální protilátky od firmy GenomeME, klon IHC016 a IHC p53 pomocí protilátky od firmy Roche, klon DO-7, na přístroji BenchMark ULTRA (společnost Ventana Medical Systems). Vyhodnocení a nafočení snímků bylo provedeno na světelném mikroskopu Olympus.

4.2.6 Detekce Kras a Nras

Pro detekci bodových somatických mutací lidského genu Kras a Nras kodon 12/13 v exonu 2, kodonu 61 v exonu 3 a kodonu 146 v exonu 4 byl použit kit QClamp™ KRAS a NRAS Codon Specific Mutation Detection Kit (Tabulky 8a, 8b a 8c, popřípadě 9a, 9b a 9c). Byla analyzována DNA izolována z formolem fixované tkáně zalité do parafínu FFPE (formalin fixed paraffin embedded).

Tabulka 8a: Seznam detekovatelných mutací v genu Kras exon 2. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
2	G12>A	35G>C
	G12>R	34G>C
	G12>D	35G>T
	G12>C	34G>A
	G12>S	34G>T
	G12>V	35G>T
	G13>D	38G>A
	G13>C	37G>T
	G13>R	37G>C

Tabulka 8b: Seznam detekovatelných mutací v genu Kras exon 3. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
3	Q61>K	181C>A
	Q61>L	182A>T
	Q61>R	182A>G
	Q61>H	183A>C & 183A>T

Tabulka 8c: Seznam detekovatelných mutací v genu Kras exon 4. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
4	K117>N	351A>C/T
	A146>T	436G>A
	A146>V	437C>T
	A146>P	436G>C
	K117>R	350A>G
	K117>E	349A>G

Tabulka 9a: Seznam detekovatelných mutací v genu Nras exon 2. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
2	G12>D	c.35G>A
	G12>C	c.34G>T
	G12>S	c.34G>A
	G12>R	c.37G>C
	G12>V	c.38G>T

Tabulka 9b: Seznam detekovatelných mutací v genu Nras exon 3. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
3	Q61>K	181C>A
	Q61>L	182A>T
	Q61>R	182A>G
	Q61>H	c.183A>C & c.183A>T

Tabulka 9c: Seznam detekovatelných mutací v genu Nras exon 4. AA – aminokyselina (amino acid), nt – nukleotid.

Exon	Záměna AA	Záměna nt
4	A146>T	c.436G>A

Amplifikační reakce byla připravována v místnosti sloužící pouze pro přípravu PCR reakce, v laminárním boxu. Všechny komponenty kitu, tj. XNA, pozitivní kontrola, WT Clamping, voda a 2x PCR mastermix se nejdříve rozmrazily a následně důkladně zvortexovaly, s výjimkou PCR Master Mixu, který byl promíchán pouze invertováním zkumavky. Po rozmrazení se komponenty kitu udržovaly v namraženém bloku. Od začátku přípravy PCR reakce se současně zpracovávala i negativní kontrola (nuclease free H₂O). Směs reagensů (Tabulka 10 a 11), byla namíchána nejdříve bez primerů. Primery byly do směsi přidány v PCR boxu, ve kterém se i směs rozpipetovala na 96 jamkovou destičku (Tabulka 12). Další práce pokračovala mimo PCR box. Byla přidána Clamping kontrola (pozitivní kontrola reakce), negativní kontrola (nuclease free H₂O), izolovaná DNA a jako poslední Kras či Nras pozitivní kontrola.

Destička byla vložena do PCR přístroje s nastaveným teplotním profilem (Tabulka 13). Využité přístroje jsou sepsány v Tabulce 14.

Tabulka 10:

Rozpis 1 PCR reakce pro amplifikaci Kras:

10 µl	2X PCR Master mix	
4 µl	Primer Mix	
2 µl	XNA	
16µl	Celkový objem	+ 4 µl DNA templátu/kontroly

Tabulka 11:

Rozpis 1 PCR reakce pro amplifikaci Nras:

10 µl	2X PCR Master mix	
4 µl	Primer Mix	
2 µl	XNA	
16µl	Celkový objem	+ 4 µl DNA templátu/kontroly

Tabulka 12: Pipetovací protokol pro směs reagensů.

NTC – negativní kontrola (negative template control, PC – pozitivní kontrola (positive control),
CC – clamping controla (clamping control), S_{1,2...n} – vzorek (sample).

	1	2	3	4	5	6
A	NTC EXT CM	PC EXT CM	CC EXT CM	S1 EXT CM	S2 EXT CM	S3 EXT CM
B	NTC G12 Mix	PC G12 Mix	CC G12 Mix	S1 G12 Mix	S2 G12 Mix	S3 G12 Mix
C	NTC G13 Mix	PC G13 Mix	CC G13 Mix	S1 G13 Mix	S2 G13 Mix	S3 G13 Mix
D	NTC Q61 Mix	PC Q61 Mix	CC Q61 Mix	S1 Q61 Mix	S2 Q61 Mix	S3 Q61 Mix
E	NTC A146 Mix	PC A146 Mix	CC A146 Mix	S1 A146 Mix	S2 A146 Mix	S3 A146 Mix

Tabulka 13: Teplotní profil PCR reakce pro detekci mutací Kras i Nras.

Krok	Teplota	Čas (sekundy)	Cykly
Preinkubace	95° C	300	1
Denaturace	95° C	20	x40
Hybridizace	70° C	40	
Nasedání primerů	62° C	30	
Prodlužování	72° C	30	
Tání	95° C	10	1
	65° C	60	
	97° C	1	
Chlazení		1	1

Tabulka 14: Přístrojové vybavení pro detekci Kras/Nras.

Přístroj	Typ (výrobce)
Laminární box	FlowFast (Schoeller)
Centrifuga	Eppendorf Mini Spin (Eppendorf)
PCR box	Aura PCR (EuroClone)
Vortex	Wizard IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica)
PCR přístroj	LightCycler 480 II Roche

4.2.7 Sangerovo sekvenování genu Braf

Pro detekci mutací v exonu 15 genu Braf bylo použito Sangerovo sekvenování. Primery byly navrženy na základě sekvencí GenBank pomocí softwaru Primer 3 ⁶, včetně hranic intron-exonu (Tabulka 15).

Amplifikační reakce byla připravována v místnosti sloužící pouze pro přípravu PCR v laminárním boxu. Směs reagensů (Tabulka 16) byla namíchána nejdříve bez primerů. Primery byly přidány až v PCR boxu.

Mimo PCR box byla přidána izolovaná DNA. Destička byla vložena do PCR přístroje ThermoCycler Eppendorf, s nastaveným teplotním profilem (Tabulka 17).

⁶ <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/nuc-primer.html>

Následně byly PCR produkty v postPCR místnosti purifikovány a sekvenovány za použití BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) na přístroji ABI Prism 3130 Avant Genetic Analyzer.

Tabulka 15: Primery navržené na základě sekvencí GenBank.

Rezevzní primer	5'CTGTTCAAACCTGATGGGACCC 3'
Forward primer	5'TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG 3'

Tabulka 16:

Rozpis 1 PCR reakce:

13 µl	2x PCR Master mix	
1,0 µl	Primeru	
4,0 µl	dNTP	
1,0 µl	MgCl ₂	
1,0 µl	Taq DNA polymeráza	
20 µl	Celkový objem	+ 5 µl DNA templátu

Tabulka 17: Teplotní profil PCR reakce pro detekci mutace Braf.

Krok	Teplota	Čas (sekundy)	Cykly
Denaturace	94° C	30	x35
Hybridizace	60° C	45	
Elongace	72° C	40	
Tání	72° C	10	1

4.2.8 Statistická analýza

K testování asociací HPV, p16, p53 a mutací genů Kras, Nras a Braf a rizikových faktorů byl použit Chí-test. Pro statistickou analýzu byl použit software Excel, Microsoft®. Proměnné s $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

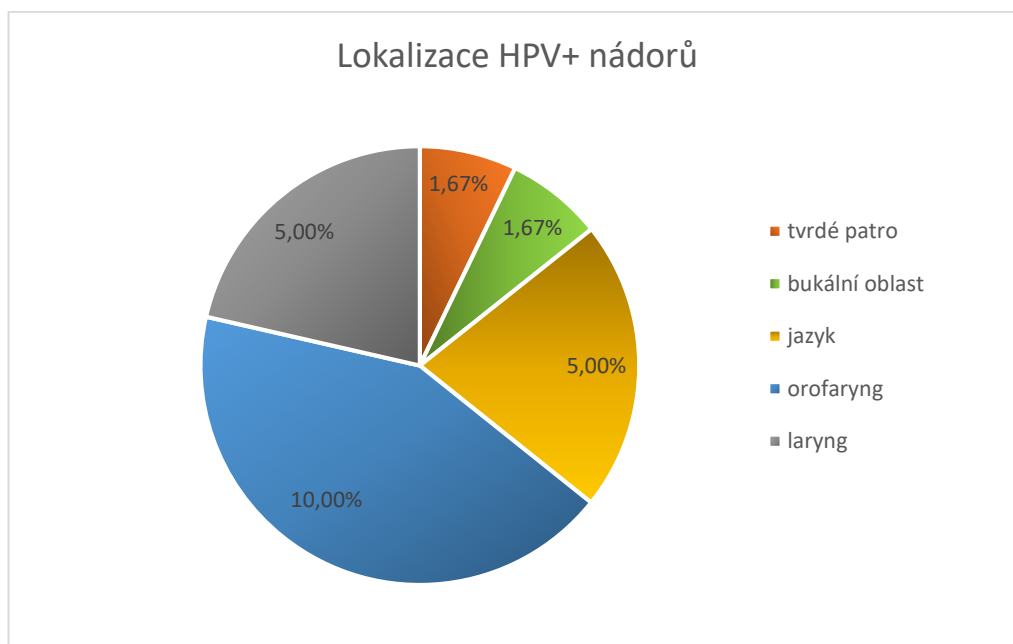
5 Výsledky

5.1 Detekce HPV

HPV genom byl detekován u 14/60 (23,34 %) případů a ve 14/14 (100 %) případů byl identifikován typ HPV 16. Detekce HPV positivity v konkrétních lokalizacích HNSCC byla rozdílná (Graf 4).

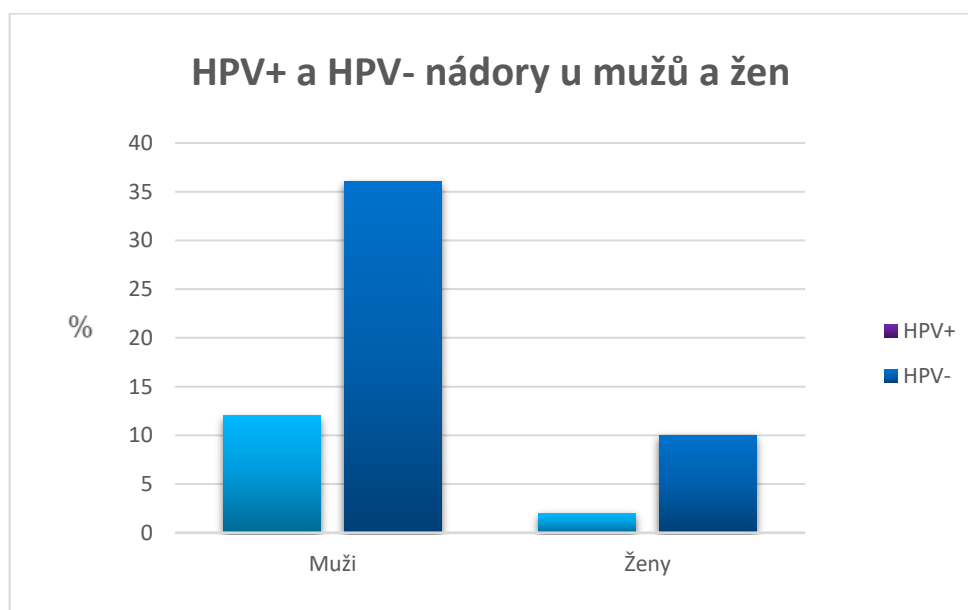
Byl zaznamenán rozdíl v prevalenci HPV mezi orálními, OP a non-OP karcinomy. Z orálních karcinomů bylo 5/40 HPV pozitivních, 6/10 OP karcinomů bylo HPV pozitivních a non-OP karcinomů byly HPV pozitivní 3/10.

Korelace mezi lokalizací nádorů a HPV statusem byla nalezena pouze v případě orofaryngu ($p = 0,006$) a jazyka ($p = 0,052$), u kterého byla pouze hraniční. Nebyla nalezena žádná interakce u ostatních lokalizací nádorů HNSCC.



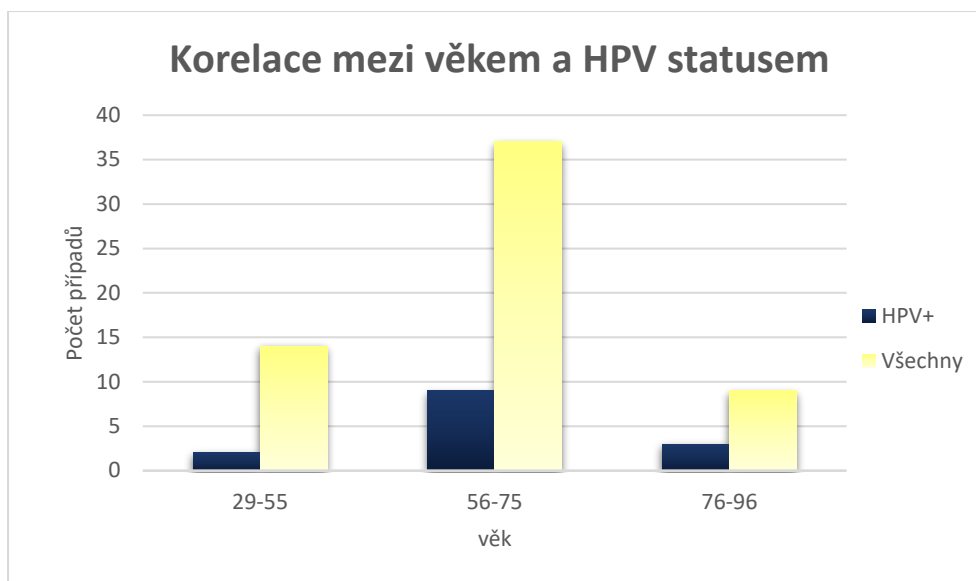
Graf 4: Procenta HPV pozitivních nádorů v jednotlivých oblastech HNSCC. Zubní lůžko nezobrazeno (0 %).

HPV pozitivní HNSCC převažovali více u mužů (85,7 %) než u žen (14,3 %) a byla nalezena silná korelace s pohlavím ($p = 0,003$), oproti tomu u HPV negativních nádorů korelace nalezena nebyla ($p = 0,768$) (Graf 5). Silná asociace byla mezi HPV pozitivními nádory HNSCC u mužů a jejich lokalizací ($p = <0,001$), avšak věk mužů již roli v lokalizaci HPV pozitivních nádorů nehrál ($p = 0,720$).



Graf 5: Zastoupení HPV pozitivních (HPV+) a HPV negativních (HPV-) nádorů HNSCC u mužů (12; 36 případů) a žen (2; 10 případů) v procentech.

Korelace věku a výskytu HPV pozitivních nádorů HNSCC u obou pohlaví byla hraniční ($p = 0,065$). Lokalizace HPV pozitivních nádorů s věkem nekorelovala ($p = 0,405$), oproti lokalizaci všech nádorů hlavy a krku, kde věk má roli ($p = <0,001$) (Graf 6). Mezi kouřením a HPV statusem byla nalezena korelace pouze u nádorů orofaryngu ($p = 0,001$).

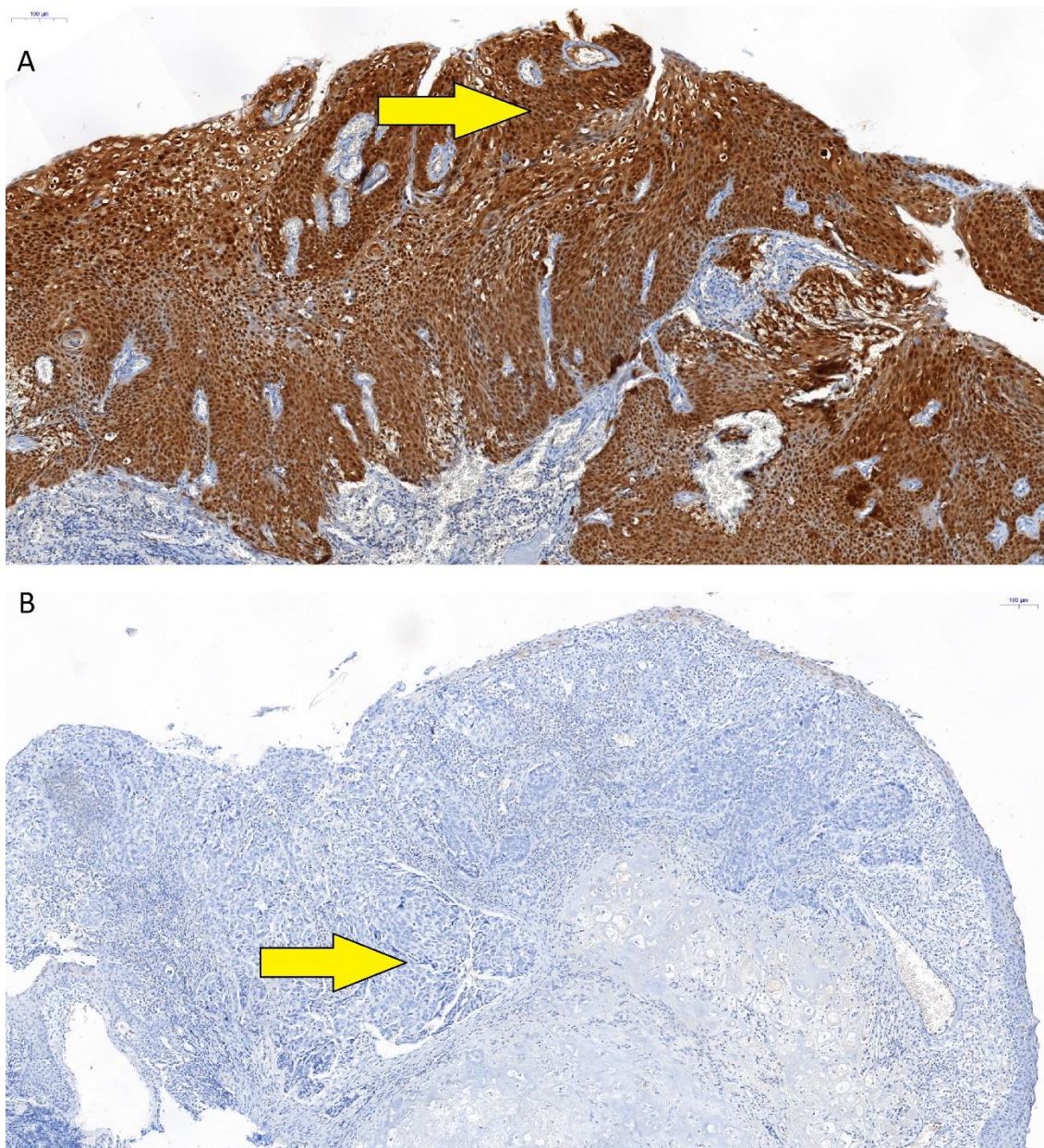


Graf 6: Zastoupení HPV pozitivních nádorů HNSCC (HPV+), v jednotlivých věkových kategoriích u obou pohlaví (2; 9; 3 případy). Pro přehlednost zobrazeny všechny nádory v jednotlivých věkových skupinách.

5.2 IHC detekce p16^{INK4A}

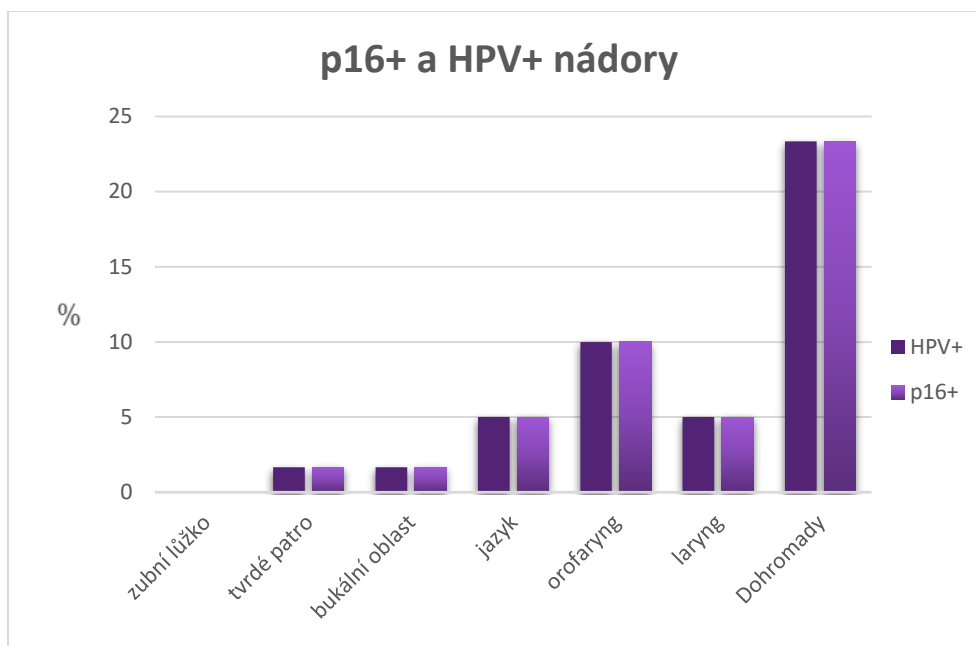
Pozitivní exprese byla detekována u 17/60 (28,33 %) případů HNSCC. p16^{INK4A} exprese nebyla detekována u 43/60 (71,67 %) (Obr. 8) a u 2/43 (4,65 %) nebylo možné expresi specifikovat, tudíž jsou považovány za negativní.

Expres p16^{INK4A} byla detekována u 14/14 HPV pozitivních vzorků (100 %) a současně byla detekována u 3/46 případů, které byly HPV negativní (6,52 %). Mezi pozitivní expresí p16^{INK4A} a HPV statusem byla silná korelace ($p = <0,001$) (Graf 7). Korelace mezi expresí p16^{INK4A} a pohlavím a věkem kopíruje incidenci HPV.



Obr. 8: Řez dlaždicobuněčného karcinomu.

A) HPV pozitivní s expresí p16^{INK4A} (žlutá šipka). B) HPV negativní bez prokázané exprese p16^{INK4A} (žlutá šipka).



Graf 7: Výskyt pozitivní exprese proteinu p16^{INK4A} (p16+) v jednotlivých lokalizacích nádorů HNSCC (14 případů). Pro přehlednost zobrazeno s HPV pozitivními (HPV+) nádory HNSCC (14 případů) v procentech.

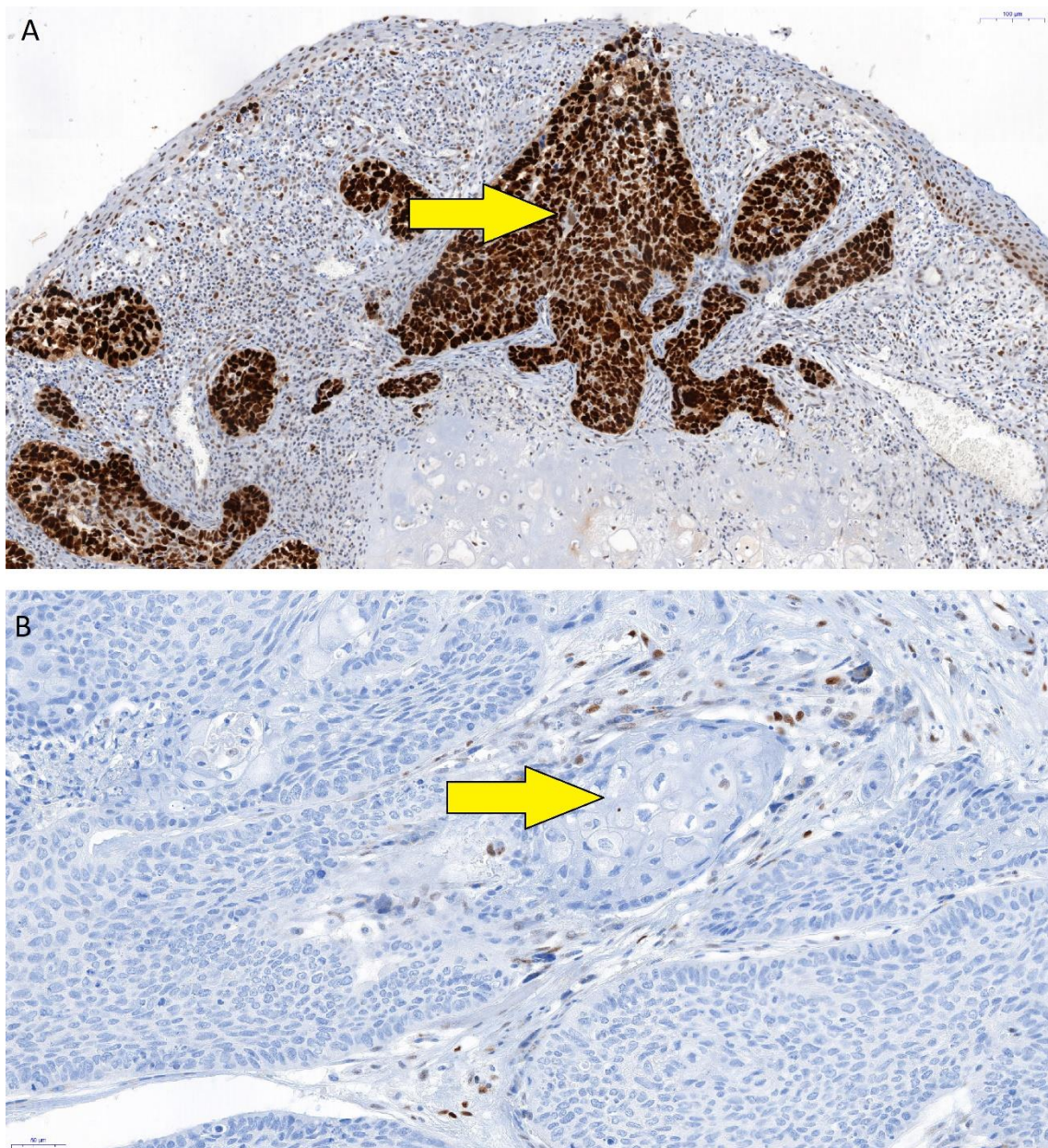
5.3 IHC detekce P53

Pozitivní exprese byla detekována u 25/60 případů (41,7 %) případů HNSCC. P53 exprese nebyla detekována u 35/60 (58,3 %) (Obr. 9) a u 5/35 (14,3 %) nebylo možné expresi specifikovat, tudíž jsou považovány za negativní.

Expres p53 byla detekována u 2/14 HPV pozitivních vzorků (14,3 %) a současně byla detekována u 23/46 případů, které byly HPV negativní (50 %). Ve 2 případech byla prokázána pozitivní exprese jak proteinu p16, tak i proteinu P53 u HPV pozitivních nádorů a u jednoho HPV negativního nádoru.

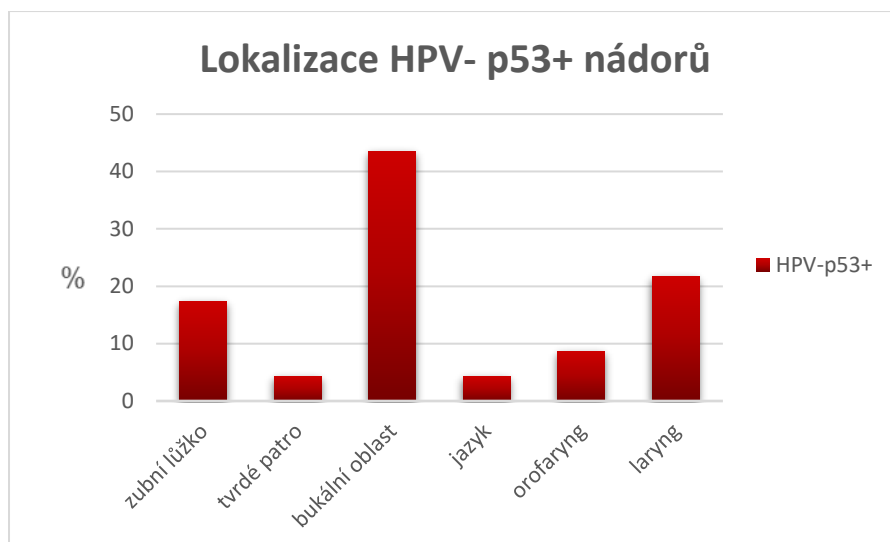
Mezi pozitivní expresí p53 a HPV negativním nádory byla hraniční korelace ($p = 0,069$) (Graf 8). Mezi lokalizací HPV negativních nádorů a pozitivní expresí p53 byla interakce nalezena pouze u tvrdého patra ($p = 0,042$) a bukalní oblasti ($p = 0,049$). Korelace mezi věkem a pozitivní expresí p53 nebyla nalezena ($p = 0,328$), podobně jako u pohlaví ($p = 0,317$) a kouření ($p = 0,590$).

Přehledné zobrazení výsledků detekce p16, p53 a statusu HPV je shrnuto v Tabulce 14.



Obr. 9: Řez dlaždicobuněčným karcinomem.

A) HPV negativní s pozitivní expresí p53 (žlutá šipka). B) HPV pozitivní bez prokázané exprese p53 (žlutá šipka).



Graf 8: Procentuální zastoupení p53 pozitivní exprese (p53+) u HPV negativních nádorů HNSCC (HPV-) v jednotlivých lokalizacích: zubní lůžko (4 případy), tvrdé patro (1 případ), bukální oblast (10 případů), jazyk (1 případ), orofaryng (2 případy) a laryng (5 případů).

Tabulka 14: Přehledné zobrazení výsledků detekce p16^{INK4A}, p53 a statusu HPV.

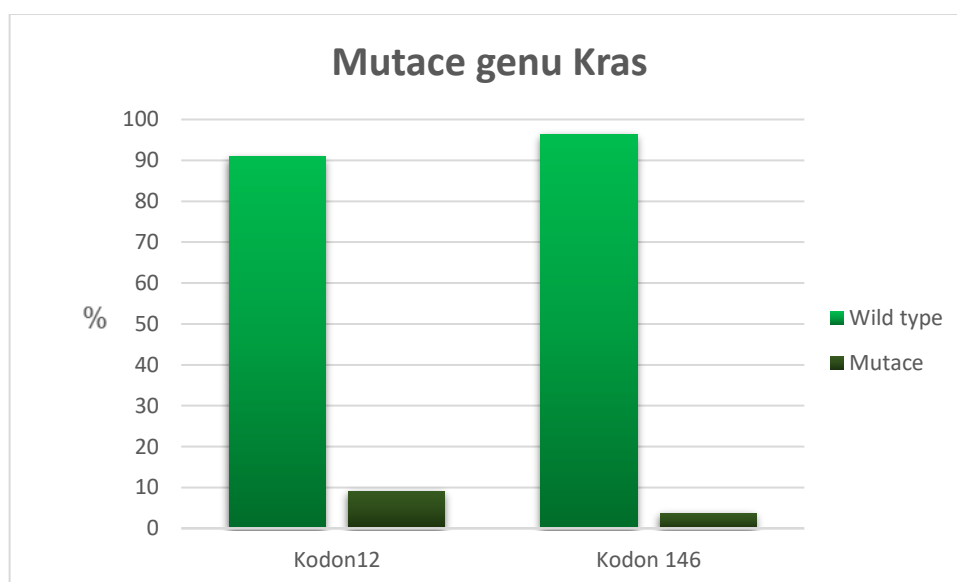
	p16 ^{INK4A} + N = 17 (%)	p16 ^{INK4A} - N = 43 (%)	P53+ N = 25 (%)	P53- N = 35 (%)	HPV+ N = 14 (%)	HPV- N = 46 (%)
Status p16 ^{INK4A}						
negativní	-	-	22 (88)	22 (62,85)	0 (0)	44 (95,65)
pozitivní	-	-	3 (12)	13 (37,15)	14 (100)	2 (4,35)
Status p53						
negativní	14 (82,35)	21 (48,83)	-	-	12 (85,71)	23 (50)
pozitivní	3 (17,65)	22 (51,17)	-	-	2 (14,29)	23 (50)
Status HPV						
negativní	3 (17,64)	43 (100)	23 (92)	23 (65,72)	-	-
pozitivní	14 (82,36)	0 (0)	2 (8)	12 (34,28)	-	-

5.4 Mutační analýza genu Ras

5.4.1 Kras

5/60 případů není nadále zahrnuto do výsledků, z důvodů invalidního výsledku Real Time PCR. Počítá se tedy s celkovou kohortou 55 případů.

Mutace genu Kras byla detekována u 7/55 nádorů (12,72 %). 48/55 nádorů (87,28 %) bylo detekováno jako wild type. Mutace byly detekovány ve dvou kodonech, a to v kodonu 12 exon 2 a v kodonu 146 exon 4. Mutace v kodonu 12 byla u 5/7 nádorů (71,42 %) a v kodonu 146 u 2/7 nádorů (28,58 %) (Graf 9).



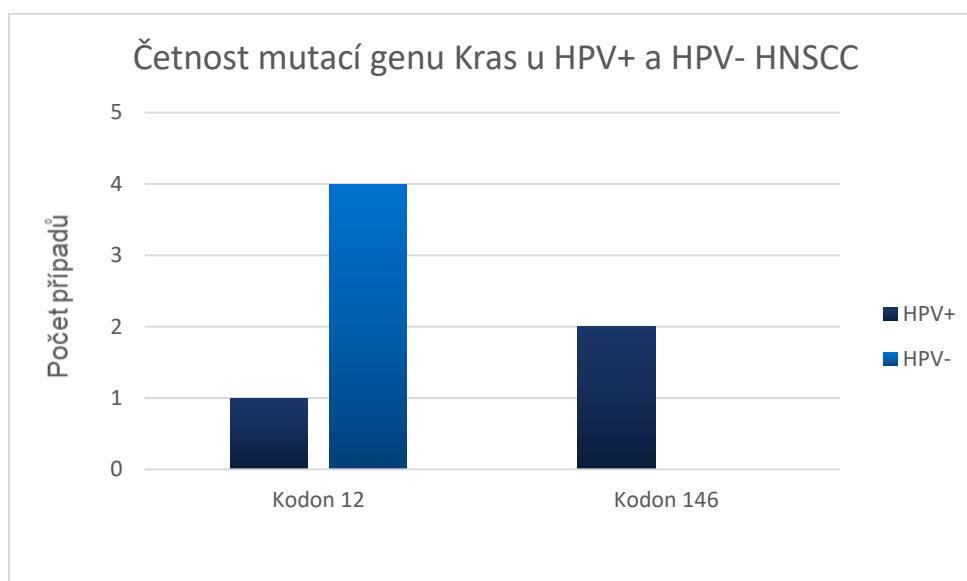
Graf 9: Procentuální znázornění mutací genu Kras ve dvou kodonech, kodonu 12 (5 mutací) a kodonu 146 (2 mutace).

Pohlaví ani věk s mutacemi v kodonu 12 ($p = 0,263$; $p = 0,525$), ani v kodonu 146 ($p = 0,479$; $p = 0,487$), nesouviselo.

Korelace mezi lokalizací nádorů a mutací v kodonu 12 byla nalezena pouze v případě orofaryngu ($p = <0,011$). Výskyt mutací u národu orofaryngu koreloval i u kodonu 146 ($p = < 0,003$) a tato korelace byla dokonce výraznější, než u kodonu 12.

Vůči HPV statusu se zjistilo, že mutace kodonu 12 se vyskytovala pouze u jednoho HPV pozitivního případu ($p = 0,779$) a mutace kodonu 146 u dvou HPV

pozitivních případů ($p = 0,041$) a dochází ke korelaci mutace kodonu 146 s HPV pozitivními nádory (Graf 10).



Graf 10: Četnost HPV pozitivních (HPV+) a HPV negativních (HPV-) nádorů HNSCC s mutovanými kodony (kodon 12 – 1;4 případy HPV+ a kodon 146 – 2 případy HPV+).

Výskyt mutací genu Kras (kodon 12 i kodon 146) vysoce korelovalo s kouřením ($p = <0,001$).

5.4.2 Nras

6/60 případů není nadále zahrnuto do výsledků, z důvodů invalidního výsledku Real Time PCR. Počítá se tedy s celkovou kohortou 54 případů.

Mutace genu Nras exon 2 byla detekována u 2/54 nádorů (3,7 %). U 52/54 nádorů (96,3 %) byl Nras detekován jako wild type (wt). Mutace byly detekovány pouze v kodonu 12.

Interakce nebyla nalezena mezi mutací kodonu 12 a pohlavím ($p = 0,298$) a mutací kodonu 12 a věkem ($p = 0,476$). Avšak byla nalezena korelace mezi mutací kodonu 12 a lokalizací nádorů u případů s rakovinou jazyka ($p = 0,053$).

Mutace kodonu 12 se vyskytovala pouze u jednoho HPV pozitivního případu ($p = 0,437$). Kouření nebylo s mutací genu Nras spojeno.

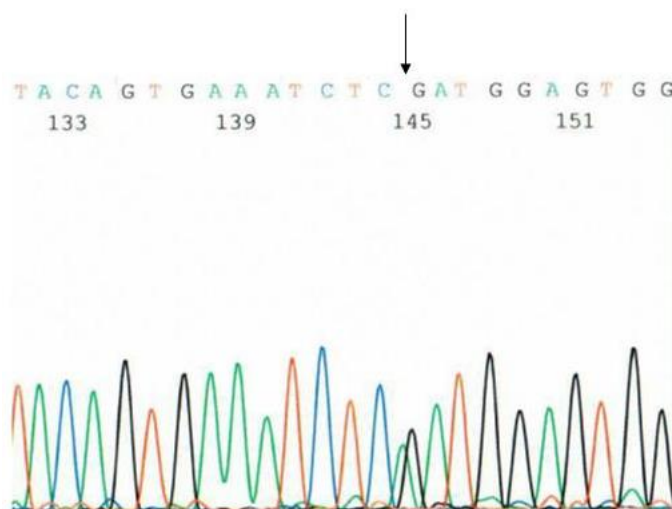
Při statistickém sledování výskytu mutací genu Kras i Nras nebyla nalezena korelace s výskytem HPV infekce ($p = 0,190$).

5.5 Mutační analýza genu Braf

6/60 případů není nadále zahrnuto do výsledků, z důvodu invalidního výsledku Real Time PCR. Počítá se tedy s celkovou kohortou 54 případů.

Mutace genu Braf byla detekována u 1 nádoru (1,85 %). Jednalo se o mutaci c.1808 G>A (Obr. 10)

Pohlaví ani věk s mutacemi v genu Braf nesouvisely ($p = 0,613$ a $p = 0,082$). V ohledu na lokalizaci byla nalezena hraniční korelace pouze s laryngem ($p = 0,054$). Mutace genu Braf se vyskytovala u jednoho HPV pozitivního případu a byla nalezena silná korelace ($p = <0,001$). Kouření nebylo asociováno s mutovaným Braf genem ($p = 0,335$)



Obr. 10: Výsledný sekvenogram z mutační analýzy Sangerovou metodou.

Černou šipkou znázorněno místo mutace c.1808 G>A, protein 603 Arg>Gln.

6 Diskuze

Nádory hlavy a krku jsou čtvrtým nejčastějším typem nádorů u mužů v evropských zemích. Ukázalo se, že papilomaviry zvyšují riziko pro vznik HNSCC změnou molekulárního profilu pacientů. HPV infekce je tedy kauzálně spojena s vývojem HNSCC, nezávisle na dvou hlavních karcinogenech – tabáku a alkoholu.

V této studii byla stanovena prevalence a typ HPV u 60 pacientů s HNSCC. Přítomnost HPV infekce byla detekována ve 14 případech a ve všech byl detekován pouze typ HPV 16. Tento typ je nejčastěji detekován v HNSCC a je také nejběžnějším typem u biopsií žen s rakovinou děložního čípku (De Vuyst, Clifford, Li, & Franceschi, 2009; Medsker, Forno, Simhan, Juan, & Sciences, 2016).

Dle lokalizace byly nacházeny rozdíly v incidenci HPV infekce. Nejvíce HPV pozitivních případů bylo nalezeno v orofaryngeálních nádorech, kde HPV pozitivní nádory představovaly 42,8 %, ze všech případů. V dalších analyzovaných oblastech měla incidence klesající charakter. Orální nádory 35,7 % a non-orofaryngeální 21,5 %.

Incidence HPV v jednotlivých lokalizacích je souhlasná, jako ve studiích Kreimer *et al.* a Faust *et al.*, jejichž data potvrzují největší nález HPV infekce v orofaryngu a dále dutině ústní a laryngu (Faust, Alwan, Roslin, Wennerberg, & Forslund, 2016; Kreimer *et al.*, 2005). Biologické vysvětlení, proč je prevalence HPV vyšší u nádorů orofaryngu ve srovnání s jinými místy nádorů hlavy a krku, zůstává nejasná. Nabízí se hypotéza, že existují oblasti HNSCC, které jsou pro papilomaviry hůře, či lépe přístupné. 10 případů s nádory zubního lůžka bylo v této studii negativních (0/10; 100%). Horewicz *et al.* ve své studii došel ke stejnému výsledku, tedy 100 % (0/104) nádoru zubního lůžka bylo HPV negativních. (Horewicz, Feres, Rapp, Yasuda, & Cury, 2010). Z anatomického hlediska vyplývá, že zub kryje zubní lůžko a pro papilomaviry je tedy nepřístupné.

Tato studie našla silnou korelaci mezi HPV pozitivními nádory orofaryngu a kouřením. Je možné, že tento aditivní rizikový faktor může způsobit, že je orofaryng náchylnější k HPV infekci více než jiné oblasti v HNSCC. Dle Sinha *et al.* se jeví pozitivní souvislost mezi kouřením a HPV vůči příčinné souvislosti s

HNSCC jako biologicky přijatelná, na základě jejich přezkoumání klinických studií patologických interakcí mezi těmito dvěma rizikovými faktory (Sinha, Logan, & Mendenhall, 2013).

Několik studií tvrdí, že výskyt HNSCC je dvakrát až třikrát vyšší u mužů, než u žen (Chaturvedi *et al.*, 2013; Galloway, Laimins, Division, & Hutchinson, 2016). Tento rozdíl byl pozorován i u HPV asociovaných HNSCC. Výsledky této studie ukazují, že výskyt HPV negativních HNSCC u mužů je až 3x vyšší než u žen a u HPV pozitivních dokonce až 6x vyšší. Tento rozdíl vznikl pravděpodobně na základě retrospektivního výběru pacientů, kteří byli vybíráni dle histologické diagnózy. Kohorta vybraných pacientů se doplnila o epidemiologická data až následně.

Existuje obecný trend, který naznačuje, že obecně mladší jedinci (<60) s HNSCC jsou HPV pozitivní, zatímco výskyt HPV negativního karcinomu je spíše u jedinců starších. Chaturvedi *et al.* uvádí ve své práci, že největší prevalence HNSCC je ve věkovém mediánu HPV negativních pacientů s HNSCC 63 let, což odpovídá výsledkům této práce, kde byl věkový medián 62,76 let. U HPV pozitivních pacientů uvádí 61 let, avšak v této práci se tento trend nevyskytoval (>67) (Chaturvedi, Engels, Anderson, & Gillison, 2008). Tento vyšší věk primární diagnózy může být způsoben zastoupením malé kohorty pacientů, projevy nemoci nemusí být specifické a včas zachycené a záleží tedy na zkušenostech lékaře a kvalitě diagnostického komplementu. Popřípadě může být způsoben zaslepeným výběrem, který nevycházel z akceptace rizikových faktorů.

HPV infekce, zejména vysokorizikovými typy, hrají roli v molekulárních cestách karcinogeneze prostřednictvím virových onkoproteinů E6 a E7. E6 se váže na p53 a označuje ho k degradaci proteasomem závislou cestou, zatímco E7 váže a inaktivuje pRb tumorový supresor, což vede k nadměrné expresi p16 ztrátou negativní zpětné vazby. p16 a p53 jsou tumor supresorové geny a klíčové cíle ve ztrátě kontroly buněčného cyklu.

Prokázalo se, že se HPV pozitivní HNSCC liší z klinického i patologického hlediska a že HPV status je jedním z nejdůležitějších prediktivních faktorů pro prognózu. Proto je nezbytné uplatňovat spolehlivé techniky umožňující stratifikaci pacientů OPSCC z hlediska etiologie nádoru. U rakoviny děložního čípku již bylo prokázáno, že p16 je specifický biomarker pro identifikaci dysplastického

děložního epitelu (Agoff *et al.*, 2003), z čehož vycházela tato práce a snažila se prokázat, že p16 může být specifickým biomarkerem i u HPV pozitivních HNSCC. V této práci se vyskytovala pozitivní exprese p16 ve všech HPV pozitivních nádorech HNSCC a tím poukázala na významnou korelaci ve výskytu HPV infekce v HNSCC a pozitivní expresi p16, podobně jako Wittekindt *et al.*

Ten ve své práci sledoval výskyt a korelaci HPV pozitivních/p16 pozitivních HNSCC a zaznamenal expresi p16 u všech HPV pozitivních neoplastických buněk v jádru. p16 imunoreaktivita HPV pozitivních karcinomů byla podobná jako u HPV pozitivních cervikálních karcinomů, které použil jako pozitivní kontroly a HPV negativní nádory imunoreaktivitu nevykazovaly žádnou (Wittekindt, Gültekin, Weissenborn, Pfister, & Jens, 2005). Imunoreaktivita p16 pravděpodobně vyplývá z transkripčně aktivní HPV infekce, což podtrhuje hypotézu, že HPV-pozitivní karcinomy HNSCC představují biologicky odlišnou nádorovou entitu a že p16 imunohistochemické barvení HNSCC může být použito jako spolehlivý diagnostický biomarker pro HPV pozitivní karcinomy HNSCC.

Na druhou stranu existují i studie, které jasně ukazují, že u HPV negativních pacientů s HNSCC může být také detekovaná pozitivní exprese p16. Ve sdružené analýze 496 pacientů z několika studií Robinson *et al.* demonstroval, že nádory HNSCC HPV negativní/p16 pozitivní tvoří (5%) oproti HPV pozitivním/p16 pozitivním HNSCC (25 %) (Robinson, Sloan, & Shaw, 2010)

Data této práce souhlasí se studií Robinson *et al.*, kde HPV pozitivních/p16 pozitivních nádorů bylo 23,34 % a HPV negativních/p16 pozitivních 5 %. Tento rozdíl se zdá být zanedbatelný. Díky skutečnosti, že ve všech HPV pozitivních nádorech této studie byl protein p16 pozitivně exprimován se tedy dá p16 pokládat za spolehlivý diagnostický marker využitelný pro rutinní histopatologickou diagnostiku.

Rozdíly v HPV pozitivních a HPV negativních HNSCC jsou i z hlediska molekulárního. V HPV negativních nádorech hlavy a krku, je běžně mutován tumor supresorový gen p53 (Nigro *et al.*, 1989). U HPV pozitivních HNSCC jsou mutace TP53 genu méně pravděpodobné, protože dochází spíše k inaktivaci proteinu p53, než k jeho mutaci, či overexpresi, pomocí HPV proteinu E6 (Werness *et al.*, 1990).

V této práci byla pozitivní exprese p53 detekována u 38,4 % případů HPV negativních a pouze u 3,3 % HPV pozitivních HNSCC. Rizikové faktory, jako jsou věk, pohlaví nehrály v pozitivní expresi p53 roli. Ale v případě lokalizace nádoru byly výsledky v oblasti tvrdého patra a bukální oblasti signifikantní, nicméně literatura pro porovnání není dostupná.

Novodobější studie se zaměřují spíše na profil mutací p53 na úrovni genu (Hong *et al.*, 2016), avšak metodicky je tato analýza pro rutinní vyšetření méně dostupná. Ve starší studii Nadal *et al.* nezohledňoval HPV status u HSNCC a pouze demonstroval, že exprese p53 může být počáteční genetickou změnou ve vývoji dlaždicobuněčných karcinomů (Nadal *et al.*, 1995) a udává informace o progresi onemocnění. Na základě této informace bylo snahou této studie zjistit, zda exprese p53 u dlaždicobuněčného karcinomu bude korelovat se statusem HPV. Z výsledků vyplývá určitá souvislost mezi pozitivní expresí a HPV negativním statusem nádorů. To může být způsobeno rizikovým faktorem, kterým je kouření. Více jak polovina HPV negativních/p53 pozitivních případů v této studii v minulosti kouřilo a právě kouření tabáku zvyšuje frekvenci mutací p53 (Halvorsen *et al.*, 2016). Jelikož je mutantní p53 většinou více stabilní, může být exprimován v neoplastické tkáni více než v normální.

Onkogeny rodiny RAS (Hras, Kras a Nras) jsou silně zapojeny do patogeneze rakoviny, a proto jsou vysoce relevantní. Bylo prokázáno, že pacienti s mutacemi těchto genů neodpovídají na léčbu Cetuximabem. AntiEGFR terapie pomocí Cetuximabu se využívá u pacientů s rakovinou kolorekta (CRC) (Lièvre *et al.*, 2006). U CRC je prevalence mutací v genech Kras a Nras 30 % až 55 %, což tvoří až polovinu pacientů, kteří nebudou profitovat z cílené terapie a mohou mít zvýšené projevy toxicity (Peeters *et al.*, 2015). Dle souhrnu údajů o léčivém přípravku (SPC – summary of product characteristics) musí být pacient před zahájením antiEGFR terapie Cetuximabem otestován na mutace v genech Kras a Nras.

Ukázalo se, že pacienti s HNSCC mohou také profitovat z antiEGFR terapie pomocí Cetuximabu, ale doposud není definován prediktor léčby, jako je tomu u CRC. Snahou této práce bylo posoudit incidenci mutací, jako možný prediktor pro léčbu Cetuximabem u HNSCC, za současného hodnocení rizikových faktorů, jako jsou věk, pohlaví, lokalizace, kouření.

Z hlediska pohlaví sledoval frekvenci mutací genu Kras kodonu 12 Kit *et al.* a prokázal, že pohlaví nehraje roli (Kit, Vodolazhskiy, Gevorkyan, & Soldatkina, 2015). Tato studie také neukázala rozdíl ve frekvenci mutací kodonu 12 u mužů (3) a žen (2).

Z 11 žen v této studii, měly 2 ženy mutace kodonu 12 (18,2 %) a 9 žen mělo WT (81,8 %). Obě ženy byly starší 52 let. Ze 44 mužů v této studii, měli 3 muži mutace kodonu 12 (6,82 %) a 41 mužů mělo WT (93,18 %). Všichni 3 muži byli starší 59 let.

Data této práce jsou porovnávána s výše uvedenou studií, která byla ovšem deklarována na CRC. Pro porovnání na stejném typu nádoru (HNSCC) nejsou doposud dostatečná data.

Pacienti s mutací v genu Kras byli starší 52 let (medián 62,8 let), což odpovídá práci Baskin *et al.*, který demonstroval stejný věkový medián (62,2 let) (Baskin *et al.*, 2014). Jeden z důvodů, proč nádory postihují převážně starší osoby, by mohla být postupná kumulace mutací. U hereditární formy nádorového onemocnění stačí jedna mutace somatické buňky, aby došlo k vyřazení genu. Avšak u sporadické formy dochází k několikastupňovému procesu a následné kumulaci mutací v nově vzniklém buněčném klonu.

Mammas *et al.* demonstroval, že mutace genu Kras (i Nras) se vyskytují více mezi HPV pozitivními pacienty, ve srovnání s HPV negativními pacienty. Data této studie, kde HPV pozitivní byly 4 případy a HPV negativní 3 případy, odpovídají výsledkům Mammas *et al.* Ten také zjistil, že největší frekvence těchto mutací je při současné infekci HPV typem 16 i 18, a dále pouze HPV typem 16. Tato studie zaznamenala v HPV pozitivních nádorech pouze HPV 16, což stále koreluje s výsledky Mammas *et al.* (Mammas, Zafiropoulos, Sifakis, Sourvinos, & Spandidos, 2005).

Lokalizace nádorů s mutovanými kodony genu Kras, byla v této práci nejvíce v oblasti orofaryngu. V této oblasti se vyskytovalo nejvíce nádorů s mutovaným genem Kras také v práci Küçük *et al.*, avšak ani on nenalezl úzkou souvislost mezi lokalizací a mutací genu Kras (Küçük *et al.*, 2016).

V případě mutace genu Kras kodonu 146 v HNSCC, je málo dostupné literatury. V této studii byly 2 (3,63 %) mutace v kodonu 146, což koreluje s výskytem této mutace ve studii Loupakis *et al.* Současné studie se věnují

převážně frekvenci mutací a jejich možné funkci jako prediktory léčby (Loupakis *et al.*, 2009).

Tato práce našla vysokou korelaci v kodonu 146 a výskytu HPV infekce, avšak existence silné korelace ještě neznamená kauzální vztah mezi proměnnými a musí se akceptovat ovlivnění výsledku korelace malým množstvím vstupních dat.

Mao *et al.* ve své studii demonstrovali, že mutace genu Kras úzce souvisí s kouřením u rakoviny plic. Demonstroval, že současní, či bývalí kuřáci mají vyšší frekvence mutací genu Kras než nekuřáci (Mao *et al.*, 2010). Tato práce vycházela z výsledků Mao *et al.* a prokázala vysokou korelaci mezi kouřením a výskytem mutací genu Kras (kodon 12 i kodon 146) u HNSCC.

U CRC jsou nejfrekventovanější mutace v genu Kras, ale byly nalezeny i mutace i v genu Nras. K pacientů s HNSCC by se mělo pravděpodobně přistupovat stejně. Klinické studie, které se věnují mutacím genů Ras v HNSCC jako možného prediktoru pro léčbu Cetuximabem se momentálně věnují pouze mutacím v genu Kras. Z tohoto důvodu nejsou dostatečná data, pro srovnání mutací v genu Nras a možných rizikových faktorů u HNSCC.

V této studii byla detekována mutace v genu Nras exonu 2 u 2/54 (3,7 %) případů a frekvence výskytu byla tedy nízká. Podobnou frekvenci výskytu prokázal i Irahara *et al.* který detekoval mutací Nras exon 2 u 5/225 pacientů u CRC (Irahara *et al.*, 2010) a studií potvrdil, že mutace v genu Nras je méně frekventovaná než Kras. Pouze u jeden HPV pozitivního případu nesl mutaci v genu Nras exon 2.

Při statistickém sledování výskytu mutací genu Kras i Nras nebyla nalezena korelace s výskytem HPV infekce. To podporuje hypotézu, že nádory vzniklé na základě HPV infekce mají odlišný molekulární mechanismus vzniku a nemají takovou četnost bodových mutací, mezi něž patří Kras i Nras, jako nádory vznikající spontánně.

Ve 30-40 % kolorektálních nádorů je mutovaný gen Kras, či Nras. Tito pacienti tedy neodpovídají na léčbu Cetuximabem. Nicméně 5 % pacientů s nádory Ras divokého typu na terapii Cetuximabem reagují hůře. U těchto pacientů je přítomen v nádoru mutovaný gen Braf (Di Nicolantonio *et al.*, 2008) a na základě této informace by mělo dojít k úpravě terapie.

V této práci byla detekována jedna mutace v genu Braf, která hraničně korelovala s lokalizací nádoru v laryngu, který byl odebrán i s resekčními okraji. Fakhruddin *et al.* demonstroval, že Braf mutace převládají v papilárních karcinomech štítné žlázy (Fakhruddin *et al.*, 2017), které mohou zasahovat i do laryngu. Avšak v ohledu na jedinou pozitivní mutaci genu Braf v této práci, nelze brát tento výsledek jako relevantní, což platí i pro výskyt Braf mutace v ohledu na pohlaví, či věk.

Nejfrekventovanější mutace v genu Braf je popisována mutace V600, která je také sledována u CRC. Touto prací nalezená mutace byla posunutá a jednalo se o mutaci c.1808 G>A, protein 603 Arg>Gln. Tato mutace nebyla doposud popsána, tudíž se nelze vyjádřit jak k jejímu prediktivnímu, tak prognostickému dopadu.

7 Souhrn

Předmětem první části této práce bylo prokázat přítomnost HPV infekce v HNSCC v jednotlivých oblastech a její případnou korelaci s P16^{INK4A} a p53 jako možný diagnostický biomarker.

Přítomnost HPV infekce byla ve 23,34 % HNSCC a ve 100 % se jednalo o HPV 16, s největším výskytem v oblasti orofaryngu. Dále byla detekována pomocí IHC průkazu pozitivní exprese P16^{INK4A} ve 100 % HPV pozitivních HNSCC a byla nalezena silná korelace mezi touto expresí a infekcí HPV. Tato práce tedy potvrdila, že IHC průkaz HNSCC může být použit jako spolehlivý diagnostický biomarker pro HPV pozitivní karcinomy HNSCC. Taktéž byla pomocí IHC prokázána korelace p53 s HPV negativními HNSCC, lze tedy považovat IHC p53 jako možný diagnostický biomarker v prognóze onemocnění u HPV negativních HNSCC.

V druhé části se věnovala tato práce porovnání incidence mutací genu rodiny Ras a Braf genu, jako vhodný prediktor pro léčbu Cetuximabem u HNSCC, za současného vlivu rizikových faktorů.

Frekvence výskytu mutací byla nalezena nejvíce v genu Kras (kodon 12 a kodon 146), Nras (kodon 12) a následně Braf. Pohlaví nehrálo roli v mutacích genu Kras a Nras roli, podobně jako věk. Tato práce našla souvislost v lokalizaci nádoru v oblasti orofaryngu a výskytem mutací v genu Kras a také prokázala korelaci s kouřením a mutacemi genu Kras.

HPV infekce korelovala s výskytem mutací v genu Kras v případě kodonu 146, avšak data nemusí být relevantní, vzhledem k malému počtu výstupních dat. V genu Braf byla nalezená mutace c.1808 G>A, protein 603 Arg>Gln. Tato mutace nebyla doposud popsána, tudíž se nelze vyjádřit jak k jejímu prediktivnímu, tak prognostickému dopadu.

8 Seznam použité literatury

- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W., Chernova, O., Sharma, Y., & Stark, G. R. (1998). A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14775–80.
- Agoff, S. N., Lin, P., Morihara, J., Mao, C., Kiviat, N. B., & Koutsky, L. A. (2003). p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Modern Pathology*, 16(7), 665–673.
- Almeida, J., Oriel, J., & Stannard, L. (1969). Characterization of virus found in human genital warts. *Microbios*, 1(3), 225.
- Ang, K. K. P., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-tân, P. F., ... Maura, L. P. (2011). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1), 24–35.
- Ayhan, S., Işısağ, A., Saruc, M., Nese, N., Demir, A., & Turkel Kucukmetin, N. (2010). *The Role of pRB, p16 and Cyclin D1 in Colonic Carcinogenesis. Hepato-gastroenterology* (Vol. 57).
- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of Virology*, 61(4), 962–971.
- Balermipas, P., Martin, D., Wieland, U., Rave-Fränk, M., Strebhardt, K., Rödel, C., ... Rödel, F. (2017). Human papilloma virus load and PD-1/PD-L1, CD8 + and FOXP3 in anal cancer patients treated with chemoradiotherapy: Rationale for immunotherapy. *Oncolimmunology*, 6(3), e1288331.
- Baskin, Y., Dagdeviren, Y. K., Calibasi, G., Canda, A. E., Sarioglu, S., Ellidokuz, H., & Oztop, I. (2014). KRAS mutation profile differences between rectosigmoid localized adenocarcinomas and colon adenocarcinomas. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5(4), 265–269.
- Bastien, N., & McBride, A. A. (2000). Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology*, 270(1), 124–134.
- Bates, S., Parry, D., Bonetta, L., Vousden, K., Dickson, C., & Peters, G. (1994). Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene*, 9(6), 1633–1640.
- Beard, J. W. (1935). The cancers have developed from the papillomas of domestic rabbits The First Appearance of Malignancy. *From the Laboratories of The*

Rockefeller Institute for Medical Research.

- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., & Sapp, M. (2003). Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology*, 314(1), 161–167.
- Bennett, R. S., & Powell, K. R. (1987). Human papillomaviruses associations between laryngeal papillomas and genital warts. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 6(3), 229–232.
- Boshartb, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinzl, A., Scheurlen, W., & Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopses and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO Journal*, 3(5), 1151–1157.
- Castellsagué, X., Drudis, T., Cañadas, M. P., Goncé, A., Ros, R., Pérez, J. M., ... Bosch, F. X. (2009). Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: A prospective study in Spain. *BMC Infectious Diseases*, 9, 1–12.
- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Paula Curado, M., Ferlay, J., Franceschi, S., ... Gillison, M. L. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 31(36), 4550–4559.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F., & Gillison, M. L. (2008). Incidence trends for human papillomavirus related and-unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 26(4), 612–619.
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., & Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6), 1053–1061.
- Chen, S. L., Tsao, Y. P., Lee, J. W., Sheu, W. C., & Liu, Y. T. (1993). Characterization and analysis of human papillomaviruses of skin warts. *Arch Dermatol Res*, 285(8), 460–465.
- Choi, H.-J., Yun, S. S., Kim, H. J., & Choi, J. H. (2010). Expression of p16 protein in gallbladder carcinoma and its precancerous conditions. *Hepato-Gastroenterology*, 57(97), 18–21.
- Coggin, J. R., & Hausen, H. zur. (1979). Workshop on Papillomaviruses and Cancer. *Cancer Research*, 39(2 Part 1), 545 LP-546.
- Conrad, M., Goldstein, D., Andresson, T., & Schlegel, R. (1994). The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology*.
- Darshan, M. S., Lucchi, J., Harding, E., & Moroianu, J. (2004). The L2 Minor Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 Interacts with a Network of Nuclear

- Import Receptors The L2 Minor Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 Interacts with a Network of Nuclear Import Receptors. *Journal of Virology*, 78(22), 12179–12188.
- De Vuyst, H., Clifford, G., Li, N., & Franceschi, S. (2009). HPV infection in Europe. *European Journal of Cancer*, 45(15), 2632–2639.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., ... Bardelli, A. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), 5705–5712.
- Disorders, C., Island, L., Medical, J., Hyde, N., & Biology, O. (1989). Tissue site-specific enhancer function of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 11 in cultures keratinocytes. *American Society for Microbiology*, 63(2), 957–960.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins result in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*.
- Doorbar, J., Medcalf, E., & Napthine, S. (1996). Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virology*, 218(1), 114–126.
- Dunn, A., & Ogilvie, M. (1968). Intranuclear virus particles in human genital wart tissue observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J Ultrastruct Res*, 22(3), 282–95.
- Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3812–3815.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., & Harlow, E. (1989). The Human Papilloma Virus16 E7 Oncoprotein is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science*, 243(4893), 934–937.
- Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus Research*, 231, 119–127.
- Fakhruddin, N., Jabbour, M., Novy, M., Tamim, H., Bahmad, H., Farhat, F., ... Mahfouz, R. (2017). BRAF and NRAS Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma and Concordance in BRAF Mutations between Primary and Corresponding Lymph Node Metastases. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- Faust, H., Alwan, E. E., Roslin, A., Wennerberg, J., & Forslund, O. (2016). Prevalence of human papillomavirus types , viral load and physical status of HPV16 in head and neck squamous cell carcinoma from the South Swedish Health Care Region. *Journal of General Virology*, 97(11), 2949–2956.

- Fay, A., Yutzy, W. H., Roden, R. B. S., Moroianu, J., Iv, W. H. Y., Roden, R. B. S., ... Moroianu, J. (2004). The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *Journal of Virology*, 78(24), 13447–54.
- Finch, J. T., & Klug, A. (1965). The structure of viruses of the papilloma-polyoma type: III. Structure of rabbit papilloma virus with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), IN1-IN7.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., Garcea, R. L., & Finnen, L. (1965). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *Society*, 77(8), 4818–4826.
- Florin, L., Becker, K. A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., ... Sapp, M. (2006). Identification of a Dynein Interacting Domain in the Papillomavirus Minor Capsid Protein L2. *American Society for Microbiology*, 80(13), 6691–6696.
- Focchi, G. R. A., Silva, I. D. C. G., Nogueira-de-souza, N. C., Dobo, C., Oshima, C. T., & Stavale, N. (2007). Immunohistochemical expression of p16 (INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 11(2), 98–104.
- Frattoni, M. G., & Laimins, L. A. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12398–402.
- Galloway, D. A., Laimins, L. A., Division, B., & Hutchinson, F. (2016). Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009–2010. *Jama*, 307(7), 87–92.
- Garnett, T., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2007). Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 13(11), 1915–1926.
- Garrote, L. F., Herrero, R., Reyes, R. M., Vaccarella, S., Anta, J. L., Ferbeyre, L., ... Franceschi, S. (2001). Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *British Journal of Cancer*, 85(1), 46–54.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565–1570.
- Gissmann, L., Diehl, V., Schultzcoulon, H., & Zur Hausen, H. (1982). Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *Journal of Virology*, 44(1), 393–400.
- Gissmann, L., & Hausen, H. Zur. (1980). Partial characterization of viral DNA from

- human genital warts (condylomata acuminata). *International Journal of Cancer*, 25(5), 605–609.
- Goldenberg, D., Benoit, N. E., Begum, S., Westra, W. H., Cohen, Y., Koch, W. M., ... Califano, J. A. (2004). Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *The Laryngoscope*, 114(6), 1027–1031.
- González, M. V., Pello, M. F., & López-Larrea, C. (1995). Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, 1(8), 635–641.
- Goodman, M. T., Shvetsov, Y. B., Mcduffie, K., Wilkens, L. R., Zhu, X., Thompson, P. J., ... Hernandez, B. (2009). Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawai human papillomavirus cohort study. *National Institutes of Health*, 68(21), 8813–8824.
- Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research*, 53(15), 3579–3584.
- Gross, G., Pfister, H., Hagedorn, M., & Gissmann, L. (1982). Correlation between human papillomavirus (HPV) type and histology of warts. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(2), 160–164.
- Hajek, E. F. (1956). Contribution to the etiology of laryngeal papilloma in children. *The Journal of Laryngology and Otology*, 70(3), 166–168.
- Halvorsen, A., Silwal-Pandit, L., Meza-Zepeda, L., Vodak, D., Vu, P., Sagerup, C., ... Helland, A. (2016). TP53 mutation spectrum in smokers and never smoking lung cancer patients. *Frontiers in Genetics*, 7(May), 1–10.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO Journal*, 8(12), 3905–10.
- Heck, J. E., Berthiller, J., Vaccarella, S., Winn, D. M., Smith, E. M., Shan'gina, O., ... Hashibe, M. (2010). Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: A pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology (INHANCE) consortium. *International Journal of Epidemiology*, 39(1), 166–181.
- Hong, A., Zhang, X., Jones, D., Veillard, A. S., Zhang, M., Martin, A., ... Rose, B. (2016). Relationships between p53 mutation, HPV status and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*, 118(2), 342–349.
- Horewicz, V. V., Feres, M., Rapp, G. E., Yasuda, V., & Cury, P. R. (2010). Human papillomavirus-16 prevalence in gingival tissue and its association with periodontal destruction: A case-control study. *Journal of Periodontology*, 81(4), 562–568.
- Houzelstein, D., Bullock, S. L., Lynch, D. E., Grigorieva, E. F., Wilson, V. A., Rosa, S.

- P., & Beddington, R. S. P. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *American Society for Microbiology*, 22(11), 3794–3802.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal*, 10(13), 4129–35.
- Irahara, N., Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Yan, L., Dias-Santagata, D., ... Ogino, S. (2010). NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*, 19(3), 157–163.
- Janda, Z., Kanka, J., Vonka, V., & Svoboda, B. (1973). A study of herpes simplex type 2 antibody status in groups of patients with cervical neoplasia in Czechoslovakia. *International Journal of Cancer*, 630(12), 626–630.
- Joyce, J. G., Tung, J., Craig, T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. a, ... 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5810–5822.
- Kamper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H., Florin, L., Bolscher, J., ... Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus enomes from endosomes. *Journal of Virology*, 80(2), 759–768.
- Keating, J. T., Cviko, A., Riethdorf, S., Riethdorf, L., Quade, B. J., Sun, D., ... Crum, C. P. (2001). Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(7), 884–91.
- Kirnbauer, R., Booyt, F., Chengt, N., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Medical Sciences*, 89(12), 12180–12184.
- Kishimoto, I., Mitomi, H., Ohkura, Y., Kanazawa, H., Fukui, N., & Watanabe, M. (2008). Abnormal expression of p16INK4a, cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *Journal of Surgical Oncology*, 98(1), 60–66.
- Kit, O., Vodolazhskiy, D., Gevorkyan, Y., & Soldatkina, N. (2015). KRAS gene mutations and gender differences in colorectal cancer. *International Journal of Biomedicine*, 5(1), 11–15.
- Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., ... von Knebel Doeberitz, M. (2001). Overexpression of p16 INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*, 92(6), 276–284.

- Komly, C. A., Breitburd, F., Croissant, O., & Streeck, R. E. (1986). The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. *Notes*, 60(2), 813–816.
- Koshiol, J. E., Schroeder, J. C., Jamieson, D. J., Marshall, S. W., Duerr, A., Heilig, C. M., ... Smith, J. S. (2006). Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. *International Journal of Cancer*, 119(7), 1623–1629.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(2), 467–475.
- Küçük, Ü., Bayol, Ü., Usturalı Keskin, E., Pala, E. E., Çukurova, İ., Çolak, M. A., ... Koç, A. (2016). Investigating KRAS/BRAF mutation in oropharyngeal squamous cell carcinomas: a preliminary study. *Kulak Burun Bogaz Ihtisas Dergisi : KBB = Journal of Ear, Nose, and Throat*, 26(5), 2–4.
- Lassen, P., Eriksen, J. G., Hamilton-Dutoit, S., Tramm, T., Alsner, J., & Overgaard, J. (2009). Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*, 27(12), 1992–1998.
- Lehman, C. W., & Botchan, M. R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 4338–4343.
- Leoncini, E., Ricciardi, W., Cadoni, G., Arzani, D., Petrelli, L., Paludetti, G., ... Boccia, S. (2014). Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Head and Neck*, 36(10), 1391.
- Li, S., Labrecque, S., Gauzzi, M. C., Cuddihy, A. R., Wong, A. H. T., Pellegrini, S., ... Koromilas, A. E. (1999). The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- α . *Oncogene*, 18(42), 5727–5737.
- Lièvre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., ... Laurent-Puig, P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Research*, 66(8), 3992–3995.
- Lièvre, A., & Laurent-Puig, P. (2009). Genetics: Predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(6), 306–307.
- Litwin, T. R., Clarke, M. A., Dean, M., & Wentzensen, N. (2017). Somatic host cell alterations in HPV carcinogenesis. *Viruses*, 9(8).
- Liu, J. S., Kuo, S. R., Broker, T. R., & Chow, L. T. (1995). The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27283–27291.
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Cremolini, C., Vincenzi, B., Salvatore, L., Santini, D., ... Graziano, F. (2009). KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 101(4), 715–721.
- Luce, C. F., & Guest, B. A. (1970). Antibodies to herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. *American Journal of Epidemiology*, 91(1).
- Maki, C. G., Huibregtse, J. M., & Howley, P. M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Research*, 56(11), 2649–2654.
- Mammas, I. N., Zafiropoulos, A., Sifakis, S., Sourvinos, G., & Spandidos, D. A. (2005). Human papillomavirus (HPV) typing in relation to ras oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia. *International Journal of Biological Markers*, 20(4), 257–263.
- Mao, C., Qiu, L.-X., Liao, R.-Y., Du, F.-B., Ding, H., Yang, W.-C., ... Chen, Q. (2010). KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer*, 69(3), 272–278.
- Maruyama, T., Farina, A., Dey, A., Cheong, J., Bermudez, V. P., Tamura, T., ... Ozato, K. (2002). A Mammalian bromodomain protein, Brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase. *Molecular and Cellular Biology*, 22(18), 6509–6520.
- McCredie, M. R., Sharples, K. J., Paul, C., Baranyai, J., Medley, G., Jones, R. W., & Skegg, D. C. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 9(5), 425–434.
- Medsker, B., Forno, E., Simhan, H., Juan, C., & Sciences, R. (2016). Human papillomavirus genotype and oropharynx cancer survival in the United States. *European Journal of Cancer*, 70(12), 773–779.
- Melnick, J. L., & Rawlston, W. E. (1970). Herpesvirus type 2 and cervical carcinoma. *Annals New York Academy of Science*, 174(1), 993–99.
- Melsheimer, P., Vinokurova, S., Wentzensen, N., Bastert, G., & von Knebel Doeberitz, M. (2004). DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clinical Cancer Research*, 10(9), 3059–3063.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., ... Liu, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 21(17), 2613–2622.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., & Botchan, M. R. (1990).

- Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250(4988), 1694–9.
- Moody, C. A. (2017). Mechanisms by which HPV induces a replication competent environment in differentiating keratinocytes. *Viruses*, 9(9), 261.
- Mounts, P., Shah, K. V., & Kashimat, H. (1982). Viral etiology of juvenile-and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Medical Sciences*, 79(10), 5425–5429.
- Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63(10), 4417–4421.
- Nadal, A., Campo, E., Pinto, J., Mallofré, C., Palacín, A., Arias, C., ... Cardesa, A. (1995). p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. *The Journal of Pathology*, 175(2), 181–188. <https://doi.org/10.1002/path.1711750205>
- Nakazawa, K., Murata, S., Yuminamochi, T., Ishii, Y., Ohno, S., Nakazawa, T., ... Katoh, R. (2009). p16INK4a expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 132(5), 776–784.
- Negri, G., Vittadello, F., Romano, F., Kasal, A., Rivasi, F., Girlando, S., & Egarter-vigl, C. M. E. (2004). P16 INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv*, 445(6), 616–620.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, a C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., ... Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342(6250), 705–708.
- Palefsky, J. (2007). Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Topics in HIV Medicine: A Publication of International AIDS Society, USA*, 15(4), 130–133.
- Palefsky, J. M., Holly, E. A., Ralston, M. L., & Jay, N. (1998). Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 361–367.
- Park, J., Kim, E., Kwon, H., Hwang, E., Namkoong, S., & Um, S. (2000). Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6764–6769.
- Payne, J. (1891). On the contagious rise of common warts. *Br j Dermatol*, 3, 185.
- Peeters, M., Kafatos, G., Taylor, A., Gastanaga, V. M., Oliner, K. S., Hechmati, G., ... van Krieken, J. H. (2015). Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Cancer*, 51(13), 1704–1713.
- Peh, W. L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., ... Doorbar,

- J. (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *Journal of Virology*, 76(20), 10401–16.
- Pfister, H., Gross, G., & Hagedorn, M. (1979). Characterization of human papillomavirus 3 in warts of a renal allograft patient. *The Journal of Investigative Dermatology*, 73(5), 349–353.
- Polz-gruszka, D., Stec, A., Dworzański, J., & Polz-dacewicz, M. (2015). EBV , HSV , CMV and HPV in laryngeal and oropharyngeal carcinoma in polish patients. *Anticancer Research*, 1662(35), 1657–1661.
- Psyrr, A., Rampias, T., & Vermorken, J. B. (2014). The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of Oncology*, 25(11), 2101–2115.
- Redman, R., Ruffony, I., Liu, C., Wilkinson, E. J., & Massoll, N. A. (2008). The utility of p16INK4A in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 132(5), 795–799.
- Reed, A. L., Califano, J., Cairns, P., Westra, W. H., Jones, R. M., Koch, W., ... Sidransky, D. (1996). High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 56(16), 3630–3633.
- Remon, J., Steuer, C. E., Ramalingam, S. S., & Felip, E. (2018). Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients. *Annals of Oncology*, 29(April), i20–i27.
- 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. *PNAS*, 103(5), 1522–1527.
- Richardson, H., Abrahamowicz, M., Tellier, P. P., & Kellsall, G. (2005). Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(5), 1149–1156.
- Robinson, M., Sloan, P., & Shaw, R. (2010). Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral Oncology*, 46(7), 492–496.
- Roden, R. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1997). Papillomavirus is resistant to desiccation. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(9), 1076–1079.
- Roset Bahmanyar, E., Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Chow, S. N., Apter, D., ... Dubin, G. (2012). Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecologic Oncology*, 127(3), 440–450.

- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., The, T. F., Sano, T., Oyama, T., ... Shroyer, A. L. (2004). Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *American Journal of Pathology*, 153(6), 1741–1748.
- Sapp, M., & Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, 276(24), 7206–7216.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., ... Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
- Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., ... Burk, R. D. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 337(1), 76–84.
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Hildesheim, A., Desalle, R., ... Rica, C. (2010). A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Research*, 70(8), 3159–3169.
- Schiller, J. T., & Müller, M. (2015). Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*, 16(5), e217–e225.
- Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S., Knoechel, T., & M, K. (2009). Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell*, 13(4), 365–373.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., & zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314(6006), 111.
- Shope, B., Richard, E., & Weston, H. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits. *Journal of Experimental Medicine*, 58(5), 607–624.
- Sinha, P., Logan, H., & Mendenhall, W. (2013). Human papillomavirus, smoking and head and neck cancer. *American Journal of Otolaryngology*, 33(1), 130–136.
- Smotkin, D., Prokoph, H., & Wettstein, F. O. (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *Journal of Virology*, 63(3), 1441–1447.
- Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J., & McCance, D. J. (1993). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *Journal of Virology*, 67(8), 4521–4532.
- Syrjanen, K. J., Pyrhonen, S., Syrjanen, S. M., & Lamberg, M. A. (1983).

- Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *The British Journal of Oral Surgery*, 21(2), 147–153.
- Taghavi, N., Biramijamal, F., Sotoudeh, M., Khademi, H., Malekzadeh, R., Moaven, O., ... Abbaszadegan, M. R. (2010). p16 INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 10(1), 138.
- Talamini, R., Vaccarella, S., Barbone, F., Tavani, A., La Vecchia, C., Herrero, R., ... Franceschi, S. (2000). Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *British Journal of Cancer*, 83(9), 1238–42.
- Thomas, J., & Primeaux, T. (2012). Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Annals of Diagnostic Pathology*, 16(2), 91–99.
- Thomas, M., & Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 17, 2943–2954.
- Trus, B. L., Roden, R. B., Greenstone, H. L., Vrhel, M., Schiller, J. T., & Booy, F. P. (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(5), 413–20.
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kaweckki, A., Rottey, S., ... Hitt, R. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116–1127.
- Vonka, V., Kanka, J., Hirsch, I., Zavadova, H., & Suchankoval, A. (1984). Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. II. Herpes simplex type-2 antibody presence in sera taken at enrolment. *International Journal of Cancer*, 33, 61–66.
- Werness, B. A., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248(4951), 76 LP-79.
- Wittekindt, C., Gültekin, E., Weissenborn, S. J., Pfister, H. J., & Jens, P. (2005). Expression of p 16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Status in Tonsillar Carcinomas and Has, 62, 72–80.
- Wolf, H., Zur Hausen, H., & Becker, V. (1973). EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biology*, 244(138), 245.
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K., & Howley, P. M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 117(3), 349–360.
- Zandberg, D. P., Bhargava, R., Badin, S., & Cullen, K. J. (2013). The Role of Human

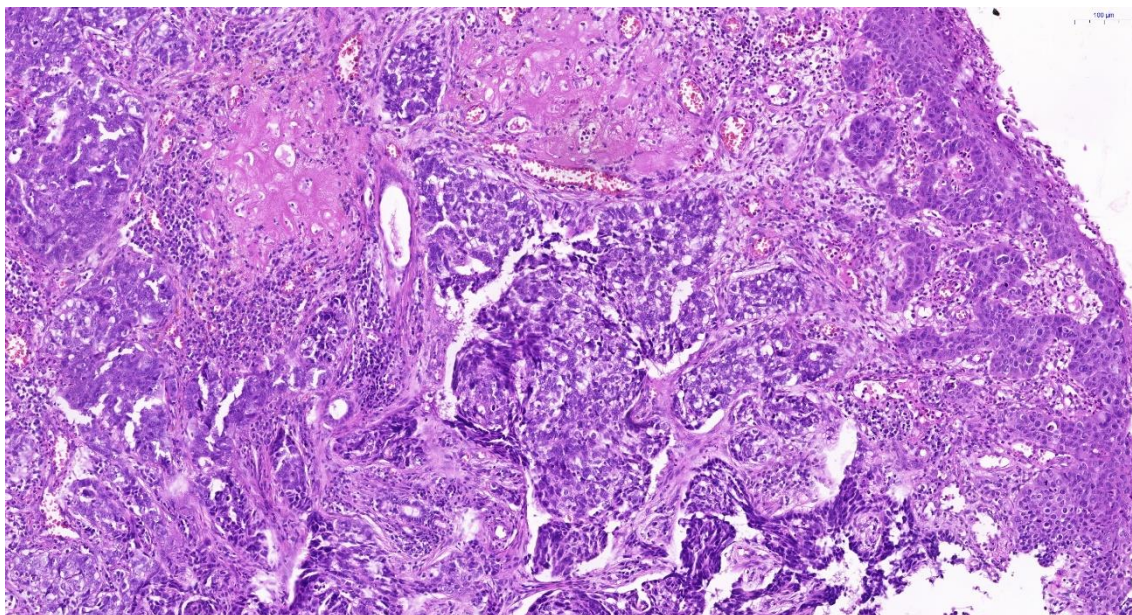
Papillomavirus in Nongenital Cancers The Role of Human Papillomavirus in Nongenital Cancers. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *cancer Journal for Clinicians*, 63, 58–81.

Zhong, P., Li, J., Gu, Y., Liu, Y., Wang, A., Sun, Y., & Lu, L. (2015). P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1, 8(3), 2979–2986.

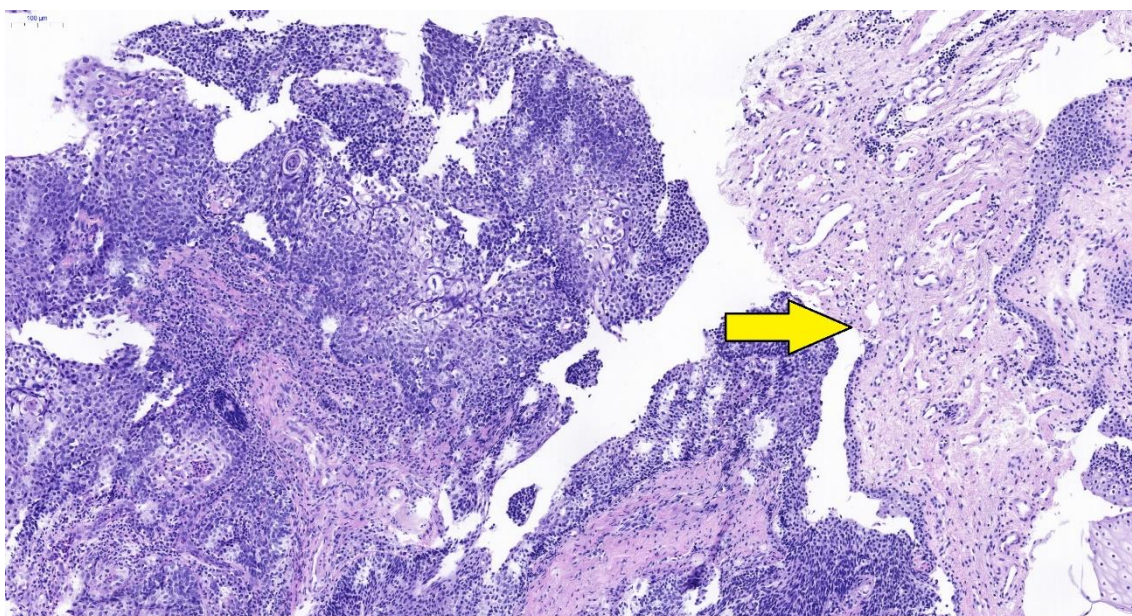
Zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Research*, 36(794).

Zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 78, 1–30.

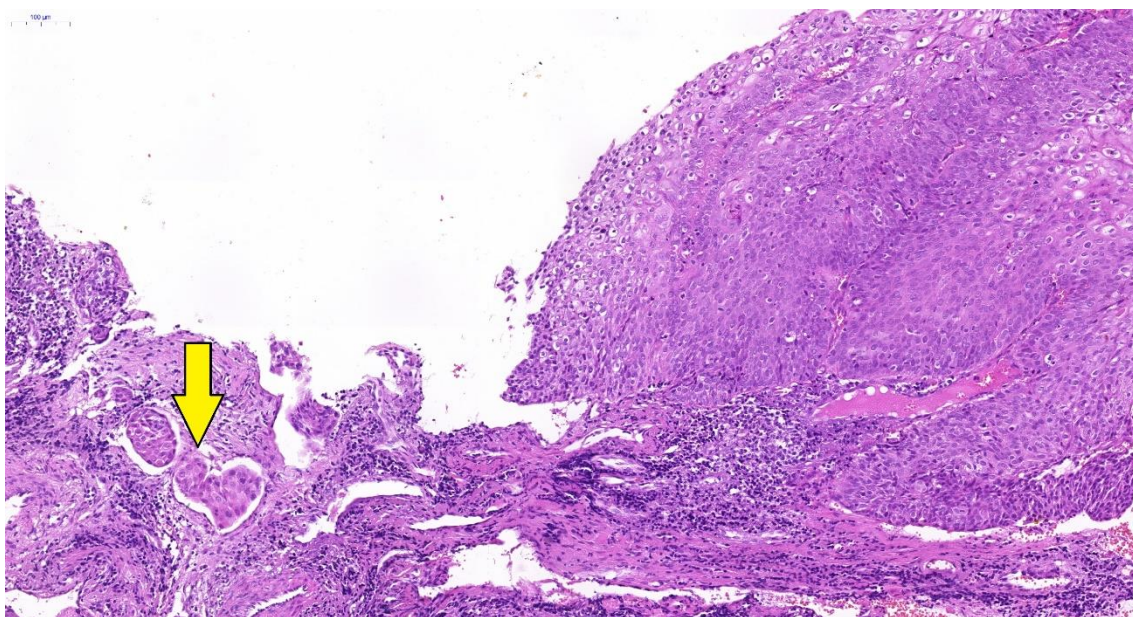
A Přílohy



Příloha A.1: Tkáň po histologické verifikaci (barvení hematoxylinem-eosinem).
Dlaždicobuněčný karcinom.



Příloha A.2: Tkáň po histologické verifikaci (barvení hematoxylinem-eosinem).
Dlaždicobuněčný karcinom, vpravo benigní epitel (žlutá šipka).



Příloha A.3: Tkáň po histologické verifikaci (barvení hematoxylinem-eosinem).
Dlaždicobuněčný karcinom s lymfovaskulární invazí (žlutá šipka).