

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Tereza Frčková

Bakalářská práce

Mechanismy integrace papilomavirového genomu do lidského chromozomu

Mechanisms of papillomavirus genome integration into the human chromosome

Školitel: RNDr. Jana Šmahelová

Praha, 2021

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, dne 6. 5. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Šmahelové za nesmírnou trpělivost, cenné rady a vstřícný přístup během psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu při studiu.

Abstrakt

Lidské papilomaviry (HPV) jsou malé neobalené DNA viry, které mohou být příčinou malignit v lidské populaci. Nejčastěji jsou kauzálně spojeny s karcinomy v anogenitální oblasti mužů i žen, ale také s částí karcinomů v oblasti hlavy a krku. V infikovaných buňkách se genom HPV vyskytuje primárně ve formě cirkulární molekuly, tzv. episomu. V některých případech dojde k linearizaci genomu HPV a jeho následné integraci do lidského genomu. Tento proces má vliv na chování buněk a přispívá k imortalizaci a nádorové transformaci. Integrace genomu HPV je ovlivněna řadou virových i buněčných faktorů, které mají vliv na stabilitu genomu HPV v buňce. Vzájemné interakce virových a buněčných proteinů často mohou navodit aktivaci DNA opravných mechanismů buňky, které virus využívá pro svoji replikaci. K integraci virového genomu dochází také s větší pravděpodobností u určitých typů HPV. Dalším faktorem je i místo infekce, kde došlo k nádorové transformaci.

Klíčová slova: lidský papilomavirus, integrace, genom, neoplastická progresse

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are small non-enveloped DNA viruses that can cause malignancies in the human population. They are often associated with carcinomas in anogenital area in both men and women, but also with part of head and neck cancer. In infected cells, the HPV genome is present as a circular molecule of DNA, called an episom. Certain circumstances result into the occurrence of a linearization of the HPV genome and a subsequent integration in the human chromosome. The integration plays a role in the cell behavior and contributes to immortalization and tumor transformation. The HPV genome integration is influenced by various viral or cell factors that affect the HPV genome stability in the cell. Interaction between viral and cell protein can often lead to activation of DNA damage response, that virus exploits for replication of viral genome. Viral genome integration is also more likely to occur in certain HPV types. Another factor is the area of infection, where the neoplastic progression was studied.

Key words: human papillomavirus, integration, genome, neoplastic progression

OBSAH

ABSTRAKT	IV
OBSAH.....	V
POUŽITÉ ZKRATKY	VI
1. ÚVOD	1
2. CHARAKTERISTIKA HPV INFEKCE	2
3. GENOM A PROTEINY KÓDOVANÉ HPV	3
4. INTEGRACE GENOMU HPV	7
4.1. CHARAKTERISTIKA INTEGROVANÉHO HPV GENOMU	7
4.2. MÍSTO INTEGRACE V HOSTITELSKÉM GENOMU	9
4.3. MODEL MECHANISMU INTEGRACE	11
4.3.1. Homologní rekombinace	12
4.3.2. Smyčkový model	12
5. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ INTEGRACI	13
5.1. STUPEŇ DYSPLAZIE A TYP HPV	13
5.2. TYP KARCINOMU	15
5.3. VLIV OPRAVNÝCH MECHANISMŮ DNA NA INTEGRACI	15
5.4. FAKTORY SPOJENÉ S MUTAGENEZÍ GENOMU	17
5.5. INTEGRACE V NÁVAZNOSTI NA INTERFERONOVOU ODPOVĚĎ BUŇKY.....	18
6. METODY DETEKCE INTEGRACE HPV.....	19
6.1. METODY VYUŽÍVAJÍCÍ FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ.....	19
6.2. METODY ZALOŽENÉ NA PCR REAKCI.....	20
6.2.1. Detekce intaktního genu E2.....	20
6.2.2. PCR v reálném čase	21
6.2.3. Amplifikace virových transkriptů.....	22
6.2.4. Detekce integrované papilomavirové sekvence pomocí PCR	23
6.3. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE	25
7. ZÁVĚR	27
8. POUŽITÁ LITERATURA	29

Použité zkratky

AP	adaptorový primer	adaptor primer
APOBEC	katalytické polypeptidy enzymu upravující mRNA pro apolipoprotein B	apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like
APOT	amplifikace papilomavirových onkogenních transkriptů	amplification of papillomavirus oncogene transcripts
ATM	serine/threonin protein kináza	ataxia telangiectasiaa mutatted
BER	bázová excizní oprava	base excision repair
BRCA1	protein citlivosti na rakovinu prsu typ 1	breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	protein citlivosti na rakovinu prsu typ 2	breast cancer type 2 susceptibility protein
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina	complementary deoxyribonukleotid acid
CIN	cervikální intraepiteliální neoplázie	cervical intraepithelial neoplasia
DDR	mechanismus odpovědi poškození na poškození DNA	deoxyribonukleotide acid damage response
DIPS	detekce integrované papilomavirové sekvence	detection of integrated papilloma virus sequences
DNA	kyselina deoxyribonukleová	deoxyribonukleotide acid
E	časné	early
E6AP	protein asociovaný s E6	E6 associated protein
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor	epidermal growth factor receptor
HPV	lidské papilomaviry	human papilloma viruses
HR HPV	vysokorizikové lidské papilomaviry	high risk human papilloma viruses
IFN	interferon	interferon
IFNK	gen kódující interferon kappa	gene for interferon kappa

IFN – κ	interferon kappa	interferon kappa
JAK/STAT	Janus kináza/ převodník a aktivátor transkripce	Janus kinase/ signal transduces and activators of transcriptions
L	pozdní	late
LCR	dlouhá regulační oblast	long control region
LR HPV	nízko rizikové lidské papilomaviry	low risk human papilloma viruses
MAP	mitogenem aktivované protein kinázy	mitogen-activated protein kinase
MACROD2	gen pro mono-ADP ribosylhydrolázu 2	gene for mono-ADP ribosylhydrolase 2
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina	messenger ribonucleotide acid
miRNA	mikro ribonukleová kyselina	micro ribonucleotid acid
NGS	sekvenování nové generace	next generation sequencing
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
pb	pár bází	pair base
pRb	retinoblastomový protein	retinoblastoma protein
PV	papilomaviry	papillomaviruses
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce	quantitative polymerase chain reaction
RNA	kyselina ribonukleová	ribonucleotide acid
ROS	volné kyslíkové radikály	reactive oxygen species
RPA70	replikační protein A 70	replication protein A 70
TGF – β	transformující se růstový faktor beta	transforming growth factor beta
TP63	gen kódující nádorový protein p63	gene for tumor protein p63

1. Úvod

Lidské papilomaviry (HPV) se řadí mezi viry způsobující nádorovou transformaci. Nejčastěji je spojována infekce HPV s karcinomem děložního hrdla (Mufioz et al., 1994), ale HPV mohou být také příčinou dalších malignit anogenitální oblasti mužů i žen a části karcinomů hlavy a krku (Parfenov et al., 2014).

HPV jsou malé neobalené DNA viry s cirkulárním genomem. Po vstupu do buňky se část životního cyklu HPV odehrává v jádře. Díky tomu se virová cirkulární DNA dostává do blízkosti hostitelského genomu a může docházet k jejich vzájemné interakci a za určitých podmínek i k integraci genomu HPV do hostitelského genomu. Dříve se předpokládalo, že integrace je nutná pro přechod hostitelské buňky do nádorového bujení. Dnes již víme, že tomu tak není, a ne u všech karcinomů způsobených HPV nalezneme genom HPV v integrované podobě. Přítomnost integrované formy genomu HPV však má negativní vliv na prognózu pacienta (Koneva et al., 2018).

Přestože se integrací genomu HPV vědecká obec zabývá již dlouho, není dodnes známý přesný mechanismus integrace. Existují modely, které tento proces vysvětlují, ale žádný z nich nebyl zcela potvrzen. I přes úsilí vědeckých pracovišť poznat faktory, které mohou mít vliv na integraci virového genomu, jednoznačnou odpověď nemáme. Bylo potvrzeno, že se v tomto procesu uplatňují vlivy jak na buněčné úrovni, tak vlastnosti papilomavirů a jejich virových proteinů.

Cílem této práce je:

shrnutí dosavadních poznatků o integraci genomu HPV do lidského genomu. Práce je zaměřena na představení modelových mechanismů integrace genomu HPV. Dále se práce bude zabývat faktory, které byly studovány a které mohou ovlivňovat formu virového genomu v infikovaných buňkách.

2. Charakteristika HPV infekce

Papilomaviry (PV) jsou velkou skupinou DNA virů infikující vyšší obratlovce včetně člověka. Jedná se o rozšířenou skupinou virů, kterou lze nalézt kosmopolitně a je součástí přirozeného mikrobiomu vyšších obratlovců. Obecně jsou PV, viry infikující epitel, tj. pokožku a sliznice. HPV (HPV z anglického human papilloma viruses) lze dělit podle rizika vzniku nádorového bujení.

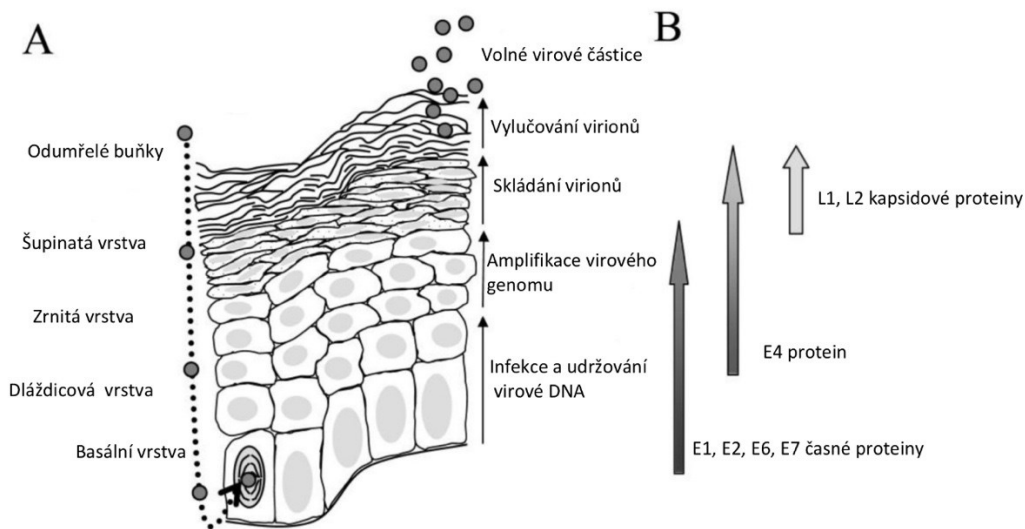
Většina typů HPV nezpůsobuje závažné zdravotní problémy. Jejich infekce může být asymptomatická nebo se projevuje vznikem benigních slizničních lézí či jako nezhoubné kožní novotvary. Tyto typy HPV se označují jako nízkorizikové (low risk HPV – LR HPV). Další skupinu tvoří HPV, které zahrnují zástupce způsobující nádorové bujení, tak zvané vysoko rizikové typy (high risk HPV – HR HPV). Z více než dvě stě dnes známých typů HPV (PaVE: Papillomavirus Episteme [online]) tvoří HR HPV pouze malé procento.

Do skupiny HR HPV patří zejména HPV typy 16 a 18, které jsou nejčastější příčinou vzniku nádorového bujení. Kromě těchto typů jsou označovány jako HR HPV typy 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 a 58 (Banks et al., 2012).

K infekci dochází ve spodních vrstvách buněk epitelálních tkání. Ve většině případů je tkáň poškozena mikroporaněním, díky kterému se vir snáze dostane do oblasti bazální vrstvy pokožky (Roberts et al., 2007). Zde se nachází primární receptory pro vstup do buňky, kterým je heparan sulfátový proteoglykan (Roden et al., 1994). Následně dojde ke konformační změně virové kapsidy, která vede k vazbě na sekundární receptor, který se nachází na membráně buňky. Tento receptor nebyl zatím jednoznačně identifikován, ale předpokládá se, že by jím mohl být opět heparan sulfátový receptor (Giroglou et al., 2001; Selinka et al., 2007).

Životní cyklus HPV je vázaný na postupné dozrávání a odumírání keratinocytů. V průběhu diferenciaci keratinocytů využívá HPV replikační aparát dělících se buněk epitelu pro replikaci genomu a expresi svých genů. Ve spodních vrstvách pokožky je vyšší exprese časných genů, která směrem k povrchu slábne a zároveň se zesiluje exprese pozdních genů. V nejvrchnější vrstvě pokožky, dochází ke skládání virových partikulí, které se uvolňují s odumřelými buňkami z povrchu epitelu a jsou schopny infikovat další jedince (Graham, 2010).

Míra exprese HPV genů v závislosti na vrstvě pokožky, kde se HPV nachází je zobrazena na obrázku 1.

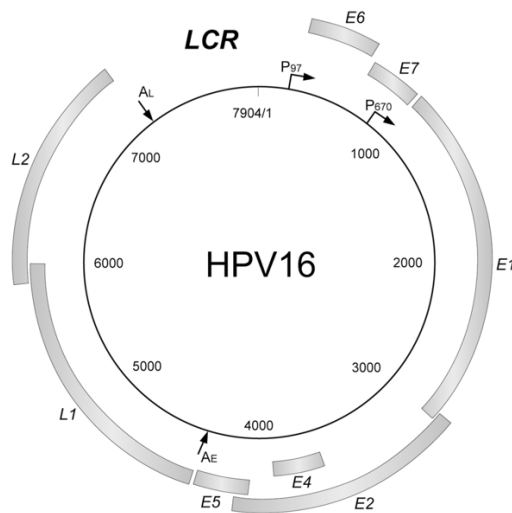


Obrázek 1: Replikační cyklus HPV a diference v epitelu. A) Popis vrstev epitelu a životního cyklu viru B) Šipky znázorňující míru exprese virových proteinů v závislosti na vrstvě pokožky. Převzato a upraveno (Graham, 2010)

K přenosu HPV dochází nejčastěji sexuálním přenosem nebo těsným kontaktem kontaminovaných povrchů (Castellsagué, 2008). K rozvoji nádorového bujení dochází v anogenitálních oblastech u mužů i žen a řadí se sem například karcinomy děložního hrdla, vagíny, vulvy, penisu nebo análního kanálu. Ve vyspělých zemích pozorujeme i zvýšenou incidenci karcinomů v oblasti hlavy a krku způsobených infekcí HPV (Chaturvedi et al., 2011), kam patří karcinomy orofaryngu.

3. Genom a proteiny kódované HPV

HPV jsou malé neobalené viry s velikostí kapsidy přibližně 55 nm. Genom je cirkulární dvouřetězcová DNA přibližně 8 000 párů bází dlouhá a svojí kódovací kapacitu nese pouze na jednom vlákně DNA. Po infekci zaujímá genom v buňce cirkulární formu, tzv. episom. Genom HPV lze rozdělit do tří oblastí – dlouhá regulační oblast LCR (z anglického long control region), oblast časných genů a oblast pozdních genů. Jak je vidět na obrázku 2, LCR neobsahuje žádné geny, ale nacházejí se zde regulační sekvence a počátek replikace.



Obrázek 2: Schéma genomu HPV16. LCR-dlouhá regulační oblast *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*-časné geny, *L1*, *L2*-pozdní geny. Převzato z (Bergvall et al., 2013)

Zbylé dvě oblasti nesou kódovací kapacitu genomu HPV. Oblast časných genů je exprimována hned po vstupu viru do buňky a nacházejí se zde geny *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*. Produkty těchto genů se podílejí na replikaci a transkripci virového genomu ale také na deregulaci buněčného cyklu hostitelské buňky.

Produkty genů *E1* a *E2* zaujímají hlavní funkci při replikaci virového genomu. Proteiny *E1* a *E2* společně formují iniciační komplex pro virovou replikaci. Tento komplex po vazbě na DNA způsobí její ohnutí a částečné rozpletení. Díky tomu se může na DNA vytvořit hexamer *E1* proteinu, který slouží jako helikáza při replikaci virového genomu (Bernard et al., 1989).

Další funkcí proteinu *E2* je schopnost regulovat virovou transkripci. Díky specifickým vazebným doménám je protein *E2* schopen vazby na virový genom v oblasti LCR a společně s buněčnými proteiny, schopen působit na virovou transkripci jako trans-aktivátor či působit jako trans-represor (Bernard et al., 1989; Thierry & Yaniv, 1987).

O působení proteinu *E2* na virovou transkripci rozhoduje jeho koncentrace v buňce a vazba na regulační sekvence v oblasti LCR. V případě, kdy je nízká koncentrace *E2* proteinu v buňce, nejsou obsazena všechna vazebná místa pro *E2* v LCR. V místech obsazených *E2* dochází k vazbě proteinu *E2* s buněčným proteinem obsahující bromodoménu 4. Tento komplex slouží jako aktivátor transkripce společně s dalšími buněčnými faktory (Schweiger et al., 2007). V případě, kdy je koncentrace *E2* vysoká, dochází k obsazení všech vazebných míst v LCR a zároveň dochází ke sterickému vytěsnění buněčných transkripčních faktorů a represí

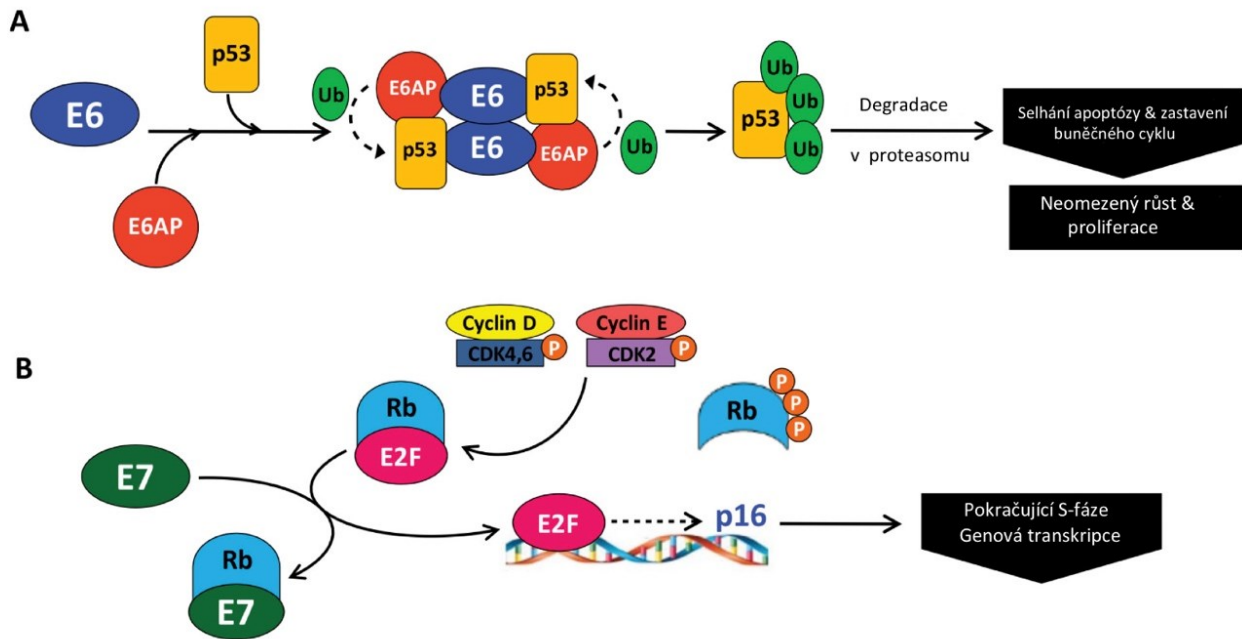
virové transkripce. V případě, kdy dojde k poškození genu *E2*, například během integrace virového genomu, dochází k deregulaci transkripce virových onkogenů a jejich zvýšené expresi (Cripel et al., 1987).

Další skupinou časných genů jsou geny spojené se schopností immortalizovat a transformovat hostitelské buňky, tak zvané virové onkogeny (obrázek 3). Jedná se o geny *E5*, *E6* a *E7*. Jejich produkty jsou u HR HPV typů schopny deregulovat buněčný cyklus infikovaných buněk zejména pomocí interakce s nádorovými supresorovými proteiny. Jako zásadní se jeví interakce s retinoblastomovým proteinem pRb a proteinem p53.

Onkoprotein E7 je schopen inaktivovat tumor supresorový protein pRb, který tvoří v buňkách komplex se skupinou transkripčních faktorů E2F, jak je znázorněno na obrázku 3. V přítomnosti virového proteinu E7 dochází k navázání na pRb (T. Hu et al., 1995; Levine et al., 1989) a uvolnění transkripčního faktoru E2F. Tím může dojít k expresi buněčných genů, které souvisí s přechodem buňky do S-fáze buněčného cyklu. Činností proteinu E7 dochází k nadměrné proliferační aktivitě buněk a spuštění p53 odpovědi (Slebos et al., 1994).

Protein p53 je další ze skupiny tumor supresorových genů, který je schopen navést buňku k apoptóze (Haupt et al., 2003) v případech, kdy je buňka vystavena stresu, například vykazuje nadměrnou mitotickou aktivitu. V infikovaných buňkách, kde probíhá exprese proteinu E6, dochází k vytváření komplexu virového proteinu E6 a buněčné ubikvitinové ligázy E3 E6AP (z anglického E6 associated protein). Tento komplex E6/E6AP je schopen vázat a ubikvitinovat protein p53, který je následně degradován v proteazomech (Scheffner et al., 1990). Tímto způsobem se brání HPV proti apoptóze buňky, která by v normálním případě, kdy nedochází k ubikvitinylaci p53, nastala. Zjednodušené schéma funkce proteinů E6 a E7 je vyobrazeno na obrázku 3.

Na rozdíl od předchozích není funkce virového onkoproteinu E5 tak detailně poznána. Existují studie poukazující na přechod buněk do rakovinného bujení díky genetickým změnám způsobených proteinem E5. Takovouto změnou může být zvětšení jádra nebo polyploidie způsobená endoreplikací (L. Hu et al., 2010). Další působení E5 proteinů spočívá ve zvýšení aktivity receptorů pro epidermální růstový faktor EGFR (z anglického epidermal growth factor receptor). To má za následek signalizaci k buněčnému dělení, které podporuje nádorové bujení. (Crusius et al., 1998).



Obrázek 3: Schéma naznačující funkci E6 (A) a E7 (B) proteinů v buňce. Převzalo a upraveno (Pinatti et al., 2018)

I když je protein E4 kódovaný v časně oblasti genomu, je exprimován až v pozdější fázi infekce. Má funkci při narušení vrstvy keratinu, a tím usnadnění uvolňování virionů (Doorbar, 2013).

V pozdní oblasti virového genomu se nachází dva geny pro obalové proteiny L1 a L2 (Cardone et al., 2014). K jejich expresi dochází až v pozdní fázi infekce, kdy dochází ke skládání kapsidy ve vrchních vrstvách pokožky, k odumírání buněk a s tím související uvolňování maturovaných částic HPV (Sarmadi et al., 2012).

Přehled virových proteinů a jejich vybraných funkcí je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled vybraných funkcí virových proteinů

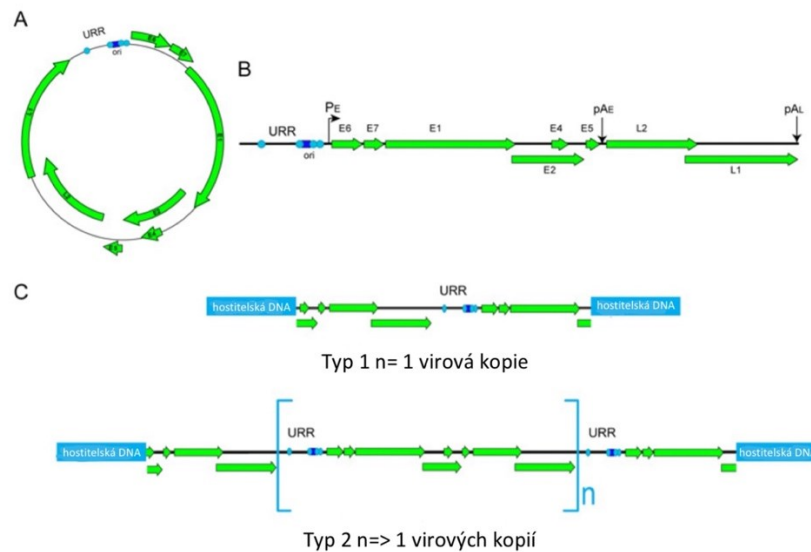
Protein	Vybrané funkce proteinu
E1	Iniciace replikace virového genomu, ATP – dependentní DNA helikázová aktivita
E2	Zesílení vazby E1 na virovou DNA, aktivátor/represor transkripce
E4	Narušení keratinu, uvolňování virionů
E5	Onkoprotein, regulace EGFR
E6	Onkoprotein, vazba s p53 a následná ubikvitinace, znemožnění přechodu buňky do apoptózy
E7	Onkoprotein, navázání pRb, uvolnění E2F
L1	Majoritní kapsidový protein
L2	Minoritní kapsidový protein

4. Integrace genomu HPV

Po vstupu a uvolnění z virionu se nachází genom HPV v buňce jako cirkulární DNA, tzv. episom. V některých infikovaných buňkách může dojít k interakci s hostitelským genomem a následné integraci do buněčného chromozomu. V dalším případě se můžeme setkat s kombinací výše zmíněných a genom HPV se může v buňce vyskytovat současně ve formě cirkulární molekuly i v integrované podobě. Právě integrace genomu HPV bývá často považována jako faktor nutný pro přechod buňky do nádorového bujení. To ovšem neodpovídá realitě vzhledem k tomu, že existují karcinomy, kde integrace nebyla prokázána a genom HPV byl nalezen pouze v episomální formě.

4.1. Charakteristika integrovaného HPV genomu

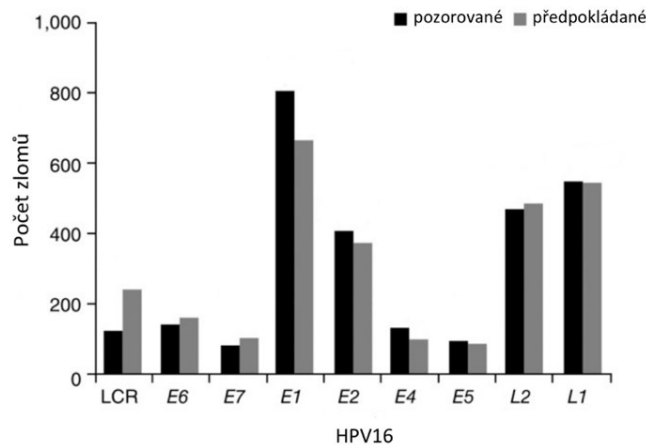
Oproti episomální formě se integrovaný genom nachází jako linearizovaná molekula DNA, která je součástí hostitelského genomu. V té se může vyskytovat HPV genom pouze jako jedna kopie nebo jako tandemová repetice virového genomu, tzv. konkatemer (McBride & Warburton, 2017). Studie (Akagi et al., 2014) prováděná na vzorcích karcinomů hlavy a krku našla počet kopií v konkatemeru od 2 opakujících se virových sekvencí až po přibližně 20 se opakujících sekvencí virového genomu. Oba možné typy integrace HPV genomu jsou zobrazeny na obrázku 4. V případě integrace několika kopií virových genomů za sebou je pouze část z nich transkripčně aktivních (van Tine et al., 2004). Zbytek integrovaných genomů bývá transkripčně umlčen pomocí methylace v oblasti LCR, jak ukazuje korelace počtu integrovaných kopií a methylace v oblasti LCR u vzorků karcinomů děložního hrdla (Chaiwongkot et al., 2013).



Obrázek 4: Schéma možného uspořádání genomu HPV v buňce A) Episomální forma genomu HPV. B) Lineární genom HPV integrovaný pouze v jedné kopii – typ1. C) Lineární genom HPV integrovaný v tandemovém opakování (ohraňené závorkou) – typ 2. Zelené šipky značí virové geny. Modrá kolečka značí vazebná místa pro virové proteiny E1 a E2. Převzato a upraveno (McBride & Warburton, 2017)

Při integraci hraje důležitou roli místo zlomu ve virovém genomu. Četnost místa zlomu v rámci genomu HPV se výrazně liší. Jako nejčastější oblasti zlomu byly prokázány oblasti *E1* genu (Kamal et al., 2020) a *E2* genu (Nkili-Meyong et al., 2019; Parfenov et al., 2014). Dalšími běžnými místy, kde dochází ke zlomu, jsou geny pro kapsidové proteiny L1 a L2 (Z. Hu et al., 2015). Četnost předpokládaného a pozorovaného výskytu zlomových míst v genomu HPV16 ze studie karcinomů děložního hrdla (Z. Hu et al., 2015) je znázorněna na obrázku 5. Z grafu je patrné, že místa zlomu se zachází v rámci celého virového genomu.

K integraci může docházet během infekce opakovaně. To také potvrzují studie, které detekovaly integrovaný genom HPV na několika lokusech lidského genomu u jednoho vzorku (Z. Hu et al., 2015; Kamal et al., 2020; Parfenov et al., 2014).



Obrázek 5: Porovnání míst zlomů v genomu HPV a srovnání četností očekávaných a pozorovaných míst zlomů. Převzato a upraveno z (Z. Hu et al., 2015)

Během integrace virového genomu často dochází k jeho částečné deleci nebo jeho narušení v oblastech blízkých místu zlomu (Gao et al., 2019). Častou oblastí delece v genomu HPV bývá gen *E2* (Nkili-Meyong et al., 2019; Parfenov et al., 2014), který má vliv na virovou transkripci. V důsledku ztráty genu *E2* dochází k neregulované zvýšené expresi virových onkogenů *E6/E7*.

4.2. Místo integrace v hostitelském genomu

Podobně jako u HPV genomu je studováno místo zlomu a integrace v hostitelském genomu. Zdá se, že samotné místo integrace není náhodné. Častěji se nachází zlom potřebný k integraci v oblastech, kde je přímo kódován gen nebo v oblastech vzdálených <500 kb od anotovaných genů (Z. Hu et al., 2015). Studie, která zahrnovala vzorky z buněčných linií odvozených od karcinomů způsobených HPV i klinických vzorků karcinomů nacházela místa zlomu v lidském genomu nejčastěji v oblasti intronů a to ve 39,6 % případů. Následovala oblast mezi geny, kdy zde bylo nalezeno místo zlomu v 29,7 %. Ve 30 % případů se nacházelo místo zlomu v regulačních oblastech konců genů a pouze 2,7 % zlomů byla nalezena uvnitř exonů (Akagi et al., 2014).

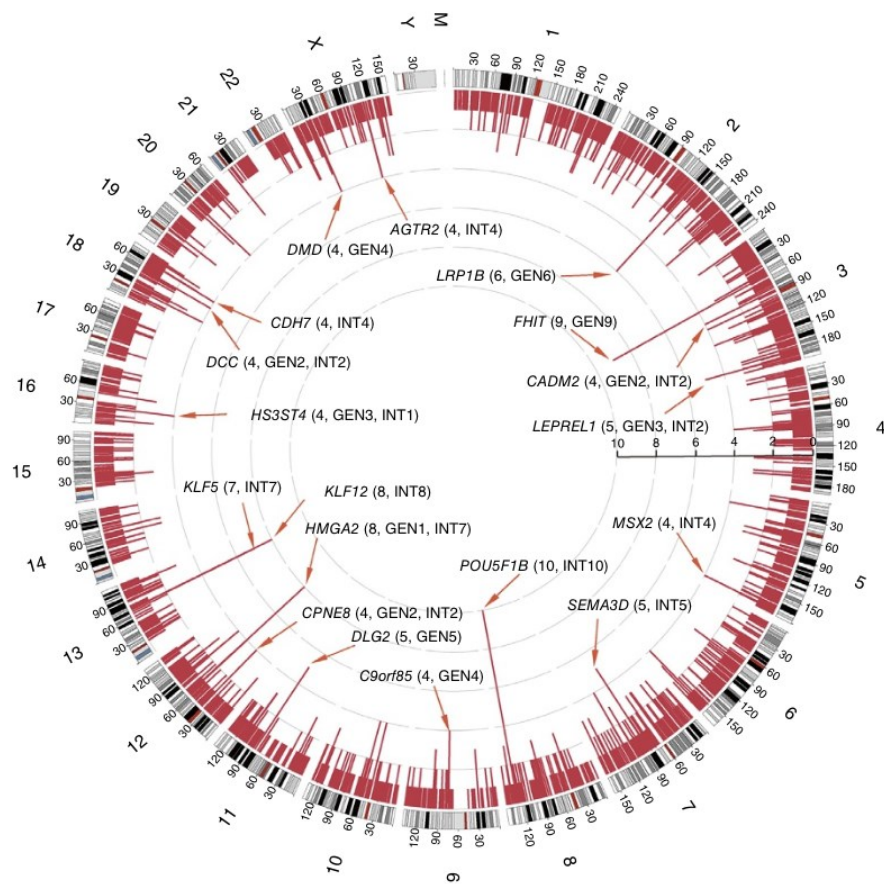
Oblasti v genomu, kde je při analýzách místo integrace nacházeno častěji oproti zbytku chromozomu, se nazývají jako tzv. *hot spots* oblasti. Jejich výskyt je zaznamenán po celém lidském genomu (Z. Hu et al., 2015) (Parfenov et al., 2014), jak je naznačeno na obrázku 6. Jedná se o studii, která analyzovala 103 vzorků karcinomu děložního hrdla, u kterých byl objeven alespoň jeden zlom v lidském genomu. Nejčastější *hot spots* oblasti

z dané studie jsou pojmenovány na obrázku. Celkem bylo ve vzorcích identifikováno pomocí celogenomového sekvenování a RNA sekvenování 3 666 zlomů.

Obecně se dá říct, že *hot spots* oblasti jsou pozorovány často v blízkosti genů, které mají spojitost s onkogenicitou. Může se například jednat o tzv. protoonkogeny nebo nádorové supresory. Příkladem takovýchto genů jsou nádorové supresorové geny *MACROD2* nebo *TP63*. V obou zmíněných genech byla indukována *hot spots* oblast (Kamal et al., 2020). U genu *MACROD2* bylo místo zlomu nalezeno u 7, respektive 5 zlomů v případě *TP63*, z 308 nalezených zlomů ve studii. Další studie karcinomů děložního hrdla označuje jako *hot spots* oblasti geny jako jsou např. *SEMA3D* (4,9 %), *DLG2* (4,9 %) nebo *HMGA2*(7,8 %) (Z. Hu et al., 2015). Procento počtu integrací v jednotlivých *hot spots* oblastech z celkového počtu zlomů je uveden u jednotlivých genů v závorce. Těchto oblastí jsou řádově stovky a stále jsou popisovány nové *hot spots* oblasti.

Kromě protoonkogenů nebo nádorových supresorových genů je integrace nacházela v blízkosti miRNA. Ty jsou důležité pro buňku při diferenciaci, proliferaci nebo třeba apoptóze (Schmitz et al., 2012) a mohou ovlivňovat přechod buňky do nádorového bujení.

Další charakteristikou místa integrace je míra methylace v oblasti integrace. Studie (Hatano et al., 2017) pozorovala u karcinomů hlavy a krku míru methylace virového genomu a lidského genomu. Studie poukázala na stejnou míru methylace u integrovaného virového genomu v závislosti na míře methylace místa integrace v lidském chromozomu. U většiny vzorků se jednalo v místě integrace u lidského genomu o zvýšenou míru methylace oproti chromatidě bez integrovaného virového genomu.



Obrázek 6: Schéma distribuce zlomových míst v lidském genomu. Vnější kruh označuje lidské chromozomy a mitochondriální chromozom, dále je na vnějším kruhu udána velikost chromozomů v milionech bází. Prostřední kruh je tvořen tmavými pruhy, kde každý jeden pruh značí místo zlomu v lidském genomu. Vnitřní kruh z červených sloupců značí frekvenci integrace genomu HPV u jednotlivých lokusů v lidském genomu. Některá místa s vyšší mírou integrace jsou pojmenována. Převzato a upraveno (Z. Hu et al., 2015)

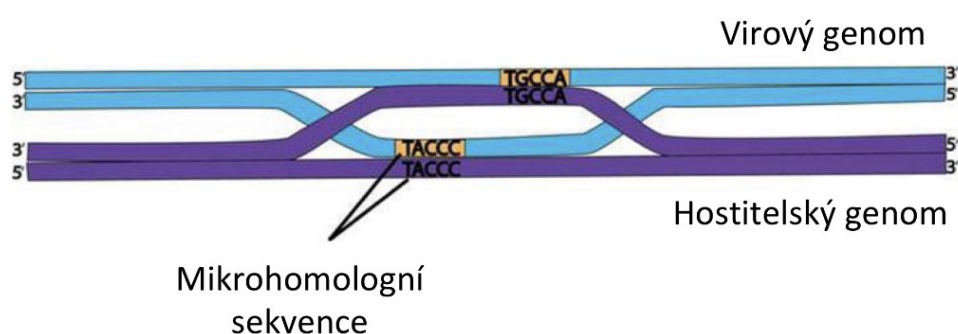
4.3. Modely mechanismu integrace

Samotný mechanismus integrace není dodnes plně objasněn. Bylo vypracováno několik modelů, přičemž se předpokládá, že k integraci nedochází pouze jedním mechanismem, ale zřejmě dochází ke kombinaci několika modelů.

Aby k integraci mohlo dojít, je zapotřebí zlom ve virovém i v hostitelském genomu, který umožní spojení genomů. U virového genomu se předpokládá, že dochází ke zlomu během replikace virového genomu (Visalli et al., 2016). U lidského genomu se liší příčina zlomu podle konkrétního mechanismu.

4.3.1. Homologní rekombinace

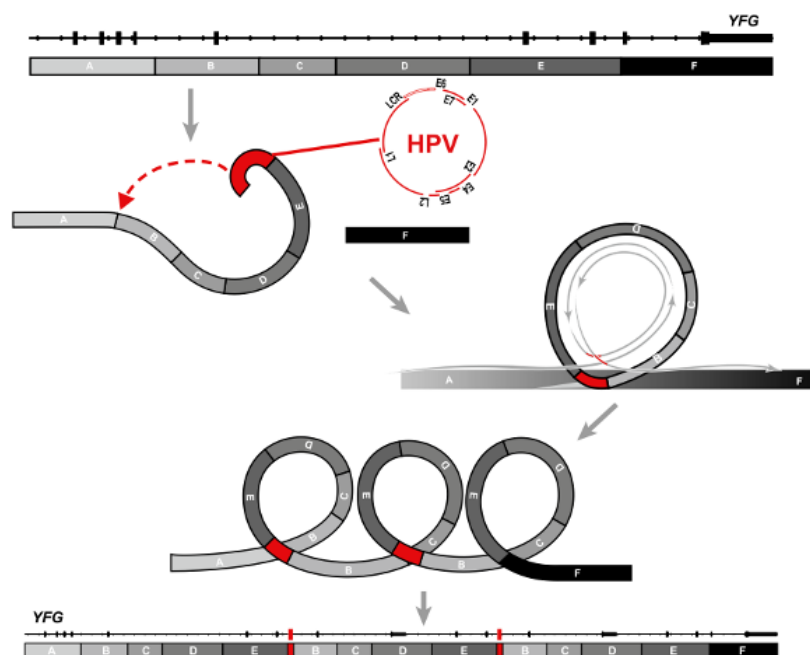
Jedním ze způsobů, který vysvětluje preferenční místo, ve kterém k integraci dochází, je proces homologní rekombinace. K rekombinaci dochází v oblastech, kde se nachází mikrohomologní sekvence nejčastěji 4 bp dlouhé, které umožňují párování lidského a virového genomu. Tyto sekvence ohraničují událost rekombinace, jak je vidět i z obrázku 7 (Z. Hu et al., 2015). Zdá se, že tento model vysvětluje většinu integračních událostí a jiné modely z něj částečně vycházejí.



Obrázek 7: Schéma mikrohologní rekombinace mezi HPV genomem a hostitelským genomem. Převzato a upraveno (Oyervides-Muñoz et al., 2018)

4.3.2. Smyčkový model

Dalším modelem mechanismu integrace je tzv. *looping* neboli smyčkový model (Akagi et al., 2014). Jedná se o model integrace, který vysvětluje vznik tandemové repetice HPV genomu. Aby došlo k tandemové repetici, musí nejprve proběhnout integrace jedné kopie, jak je ukázáno na obrázku 8. Po integraci jedné kopie virového genomu, například pomocí mikrohologní rekombinace, vytvoří následně DNA dočasnou smyčku, která je pomocí metody valivé kružnice replikována. Mechanismus replikace valivou kružnicí je na obrázku 8 vyznačen šipkami. Díky stále se opakující sekvenci dočasné smyčky, vznikají totožné sekvence, které vytváří tandemové opakování. V takovýchto tandemových repeticích se vyskytuje opakování virového genomu a části lidského chromozomu.



Obrázek 8: Schéma naznačující mechanismus integrace pomocí smyčkového modelu. Šedě je označen lidský genom (písmena A-F značí lidské geny). Červeně je označen genom HPV. Šipky uprostřed dočasné smyčky značí replikaci valivou kružnicí. Převzato z (Akagi et al., 2014)

5. Faktory ovlivňující integraci

Integrace genomu HPV do buněčného chromozomu není součástí životního cyklu HPV, a tak není ani podmínkou, že k ní v infikované buňce musí dojít. Nejedná se o zcela náhodný proces, jak naznačují i *hot spots* oblasti. Jak četné studie dokládají, existuje celá řada více či méně popsaných nebo předpokládaných faktorů, které pravděpodobnost tohoto jevu ovlivňují.

5.1. Stupeň dysplazie a typ HPV

Po infikování bazálních buněk a ustavení persistentní infekce HPV dochází k postupnému nahrazování epitelu abnormálními buňkami. To může vést k rozvoji přednádorových lézí a později až ke vzniku karcinomu. Například u děložního hrdla se přednádorová stádia označují jako cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN z anglického cervical intraepithelial neoplasia) a podle stupně závažnosti rozdělují do tří skupin. Zatímco u CIN1 je většina abnormalit spontánně vyhojena (Holowaty et al., 1999), tak CIN2 a CIN3 představují závažnější nálezy, u kterých je častější progresse v karcinom (Byun et al., 2018).

Jednotlivé stupně dysplazií se liší frekvencí integrace genomu HPV. Zatímco u CIN 1 je integrace pozorována výjimečně, tak u vyšších stupňů dysplazie se procento klinických vzorků s prokázaným integrovaným genomem HPV zvyšuje (Hudelist et al., 2004). U CIN2 je nalézána integrovaná forma v jednotkách procent, ale u CIN3 se integrace už nachází v desítkách procentech vzorků a u karcinomů se jedná, v závislosti na typu HPV, až o více než 90 % vzorků s detekovanou integrací genomu HPV (Vinokurova et al., 2008).

Kromě stupně dysplazie má vliv na pravděpodobnost integrace i typ HPV, především ze skupiny HR HPV. Zjistilo se, že genomy některých typů HR HPV jsou výrazně častěji v klinických vzorcích nacházeny v integrované podobě než jiné. Při porovnání dvou nejčastěji se vyskytujících typů HPV16 a HPV18 v karcinomech je pozorována častější integrace typu HPV18. U studie vzorků provedené na vzorcích odebraných z karcinomu děložního hrdla se genom HPV18 vyskytoval v integrované podobě u 33 vzorků z celkových 36, což představuje více než 90 % vzorků s integrovanou formou genomu (Vinokurova et al., 2008). Podobně tomu bylo i u další studie HPV18, kdy integrace byla nalezena u všech 18 vzorků karcinomu děložního hrdla (Kamal et al., 2020).

Dalším typem, který se integruje výrazně častěji je typ HPV45. U karcinomů děložního hrdla s potvrzenou infekcí HPV45 byla nalezena integrace u 20 vzorků z celkových 24 vzorků (Vinokurova et al., 2008). Jedná se tedy o více než 80 % vzorků, kde došlo k integraci. Ještě častější integrace genomu HPV45 byla detekována ve studii (Kamal et al., 2020), kdy byla integrovaná forma genomu nalezena u všech 27 vzorků karcinomu děložního hrdla z této studie.

Oproti typům HPV18 a HPV45 dochází u typu HPV16 k integraci výrazně méně. Zde bylo nalezeno 33 vzorků karcinomu děložního hrdla s integrací z celkového množství 60 vzorků karcinomu, tedy 55 % vzorků (Vinokurova et al., 2008). Ještě výrazně menší procento integrace byla detekována u HPV31, kdy podíl vzorků s integrací nedosahuje ani 20 %. U tohoto typu byla nalezena integrace pouze u 2 vzorků karcinomu děložního hrdla ze 14 (Vinokurova et al., 2008).

Obecně platí, že integrace virového genomu je častější u HR HPV typů, ale i u HPV6 nebo HPV11, které jsou řazeny mezi LR HPV, se můžeme setkat s integrovanou formou genomu HPV (Coutlée et al., 2009). Ta se vyskytuje například u vzorků laryngálního karcinomu (Gerein et al., 2005; Huebbers et al., 2013). Ve studii vycházející ze vzorků karcinomu hrtanu a plic byla zkoumána forma genomu HPV11 pomocí amplifikace virové

sekvence. Z celkových 7 vzorků, ve kterých byla potvrzena infekce právě HPV11, byla integrovaná forma detekována u 4 vzorků (Reidy et al., 2004).

5.2. Typ karcinomu

Dalším faktorem působícím na integraci genomu HPV je i oblast, kde došlo k neoplastickému rozvoji. U nejrozšířenějšího typu karcinomu děložního hrdla byla pouze episomální forma genomu ve studii (Kamal et al., 2020) detekována pomocí sekvenování nové generace NGS (z anglického Next Generation Sequencing) u 33 vzorků z celkových 272, což činí přibližně 12 %. U další studie provedené na vzorcích karcinomu děložního hrdla nebyla integrace nalezena u 32 ze 135 vzorků (23 %) (Z. Hu et al., 2015).

Oproti tomu při studiu karcinomů z anální oblasti (Morel et al., 2019) pomocí NGS se integrovaná forma genomu HPV nenašla u 42 vzorků z 93, tedy 45 % vzorků obsahovalo pouze episomální formu genomu HPV.

Ve studii karcinomů oblasti hlavy a krku (Parfenov et al., 2014), byla integrace nalezena ve 25 případech z 35 vzorků, což odpovídá necelým 29 % vzorků bez prokázané integrace.

Z výše uvedených studií je vidět trend v pravděpodobnosti integrace HPV genomu u rozličných karcinomů. Zdá se, že nejčastěji nalezneme integraci v karcinomech děložního hrdla. Naopak nejméně integrací genomu HPV je nacházeno u karcinomů v anální oblasti.

5.3. Vliv opravných mechanismů DNA na integraci

Pokud dojde v buňce k poškození DNA, tak se aktivuje mechanismus odpovědi na poškození DNA (z anglického DNA damage response, DDR). Jedná se o mechanismus, který brání většímu poškození genomové DNA, ke kterému by mohlo jinak docházet (Wallace et al., 2017). Kromě toho, pokud se v buňce nachází poškozená DNA, tak dochází k pozastavení buněčného cyklu.

Jedním z možných poškození genomové DNA je dvouřetězcový zlom, při kterém dochází k přerušení obou vláken šroubovice DNA. K takovému poškození dochází vlivem mnoha exogenních i endogenních faktorů. Jedním z endogenních faktorů způsobující akumulaci dvouřetězcových zlomů je i zvýšená hladina volných kyslíkových radikálů ROS

(z anglického reactive oxygen species). Jedná se o molekuly nacházející se přirozeně v buňce, ale v případech, kdy na buňku působí stresové faktory, se koncentrace ROS zvyšuje.

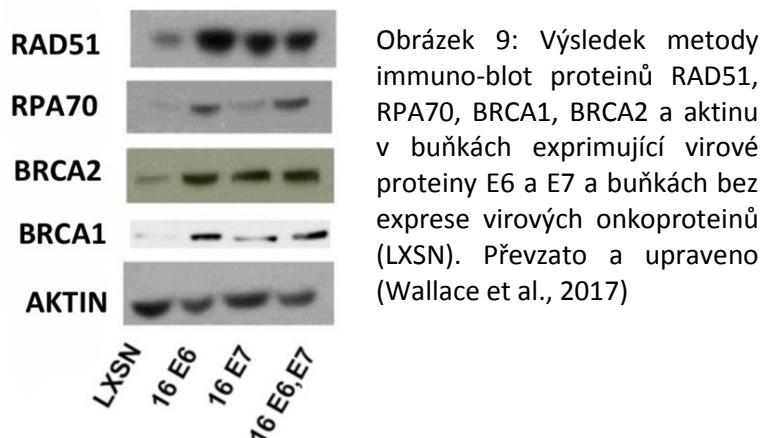
Pokud buňka nezareaguje včas na takové poškození, může dojít k delecí, duplikaci nebo jiných chromozomálním přestavbám v genomu, a proto se buňka snaží aktivací DDR co nejrychleji zlom opravit (Wallace et al., 2017). Jednou z možných oprav je i vložení mimochromozomální molekuly DNA. Takovou molekulou může být právě i genom HPV.

Jedním z faktorů přispívajících k akumulaci dvouřetězcového přerušování DNA v buňkách infikovaných HPV je zvýšená hladina ROS v důsledku působení isoformy HPV proteinu E6. Tato isoforma, označována jako E6*, vzniká translací ze sestřiženého transkriptu genu *E6*.

Ve studii (Williams et al., 2014) pozorovali na buněčných liniích odvozených od karcinomů způsobených HPV vliv poměru virového proteinu E6 a jeho isoformy E6* na koncentraci ROS. Bylo zjištěno, že u buněčné linie CaSki docházelo ke zvýšení hladiny ROS v důsledku vyššího poměru E6*/E6. Zvýšená hladina ROS dále přispívala k aktivaci DDR. K obdobným závěrům dospěla studie karcinomů děložního hrdla, která zkoumala vliv koncentrace volných radikálů, mezi které se řadí i ROS, na integraci genomu HPV v karcinomech děložního hrdla (Visalli et al., 2016).

Kromě zvýšené hladiny ROS ovlivňují virové proteiny i další dráhy související s opravou zlomů v lidském genomu. Protein E6 společně s proteinem E7 zapříčiňují kromě deregulace nádorových supresorových proteinů p53 respektive pRb také aktivaci opravy dvouřetězcových zlomů v lidském genomu opravovaných pomocí homologní rekombinace. Dochází k tomu prostřednictvím interakce s proteiny potřebné pro homologní rekombinaci (Wallace et al., 2017). Opravy poškození DNA pomocí homologní rekombinace probíhají pouze v případě, kdy má buňka homologní sekvenci, podle které je možné opravit poškození, tedy pouze v S a G₂ fázi buněčného cyklu.

U buněk infikovaných HPV ale dochází k iniciaci homologní rekombinace i během G₁ fáze buněčného cyklu. Jako iniciátory slouží virové onkoproteiny E6 a E7. V jejich přítomnosti se zvyšuje koncentrace proteinů BRCA1, BRCA2, RAD51 a RPA70 podílejících se na homologní rekombinaci (obrázek 9). Díky těmto proteinům dochází k homologní rekombinaci i bez přítomnosti druhé chromatidy, která je jinak nutná k homologní rekombinaci. Namísto homologní sekvence se schopný integrace genom HPV (Wallace et al., 2017).



Kromě onkogenů E6 a E7 má vliv na DDR i virový protein E1 (Sakakibara et al., 2011). Protein E1 přispívá v infikované buňce k aktivaci odpovědi serine/ threonin protein kinázy ATM (z anglického ataxia telangiectasia mutated) patřící mezi DDR, která při své aktivaci pozastavuje buněčný cyklus buňky. ATM patří opět k opravným mechanismům využívající homologní rekombinace, díky té může docházet k ulehčené integraci genomu HPV do lidského genomu. Kromě opravné aktivity je schopné ATM zastavit replikaci buněčného genomu. To ovšem nevadí genomu virovému a využívá této situace, kdy může replikovat svůj genom bez kompetice s replikací buněčného genomu. Zároveň si tím HPV zvyšuje pravděpodobnost integrace do lidského genomu v závislosti na větším počtu kopií svého genomu v infikované buňce.

5.4. Faktory spojené s mutagenezí genomu

V lidských buňkách se vyskytuje skupina přibližně 10 enzymů označujících se jako katalytické polypeptidy enzymu upravující mRNA pro apolipoprotein B neboli APOBEC (z anglického apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like). Jejich enzymatická funkce spočívá v substituci cytosinu za uracil. Místa s touto substitucí neodpovídají pravidlům Watsono-Crickova párování a buňka je schopna tyto místa nalézt a opravit. K opravě využívá štěpení pomocí apurinické/ apyrimidické endonukleázy následované báзовou excizní opravou BER (z anglického base excision repair).

U buněčné linie W12 odvozené od keratinocytů infikovaných HPV16 byla pozorována zvýšená exprese těchto enzymů, především APOBEC3A. To způsobovalo i vyšší míru mutageneze ve virovém genomu, kdy největší počet mutací byl nalezen v oblasti genu E2 (Wang et al., 2014). Zvýšená exprese APOBEC3A byla pozorována i u klinických vzorků

karcinomů z oblasti hltnu a zároveň byla pozorována korelace mezi expresí tohoto enzymu a integrací genomu HPV.

Díky schopnosti buňky rozpoznat netypické párování, dochází k jeho opravě. Ale zároveň v případě, kdy se objevují tato místa s větší frekvencí, než je pro buňku obvyklé, nemusí docházet k opravě všech mutovaných oblastí. Tyto oblasti mohou být štěpeny pomocí endonukleázy, ale už u nich nedochází k BER. Takto štěpená místa mohou sloužit jako místa pro integraci genomu HPV do lidského genomu (Kondo et al., 2017).

5.5. Integrace v návaznosti na interferonovou odpověď buňky

U buněk infikovaných viry, dochází k aktivaci buněčné imunitní odpovědi. Jedná se o stav, kdy buňka produkuje interferony (IFN), které se vážou na specifické receptory a indukují syntézu enzymů, které potlačují virovou replikaci. Pro keratinocyty je specifický IFN- κ kódovaný genem *IFNK*.

Pro viry je důležité držet hladinu imunitní reakce hostitele vůči infekci na co možná nejnižší úrovni a případně i regulovat aktivitu imunitní odpovědi pomocí svých proteinů. HPV jsou schopni regulovat produkci interferonů pomocí exprese svého onkoproteinu E5. Studie (Scott et al., 2019) vytvořila model inhibice transkripce *IFNK*, který je založený na inhibici komplexu transformačního růstového faktoru a beta receptoru II TGFBR2 (z anglického transforming growth factor, beta receptor II) pomocí E5 proteinu, čímž se potlačí signalizace transformačního růstového faktoru beta TGF- β (z anglického transforming growth factor β). Zároveň dochází k zesílení signalizace EGFR opět pomocí přítomnosti E5 proteinu, která souvisí se stimulací MAP kinázové dráhy. Tyto aktivity společně snižují transkripci genu *IFNK*. Vzhledem k potlačení imunitní odpovědi je genom HPV stabilnější a udržuje si v jádře formu episomu.

Naopak u buněk z buněčné linie W12, kde byla experimentálně snížena exprese proteinu E5 pomocí vložení STOP kodonu do promotorové oblasti genu *E5*, docházelo k destabilizaci virového genomu a jeho častější integraci do hostitelského genomu. K destabilizaci dochází díky neschopnosti inhibice IFN- κ . Aktivita IFN- κ je schopna aktivovat JAK/STAT signalizační dráhu, která spouští transkripci IFN stimulovaných genů. Během stálé transkripce těchto IFN stimulovaných genů dochází k nižší stabilitě genomu HPV. Nižší stabilita genomu HPV a s tím spojená častější integrace byla také potvrzena pomocí pokusu, kdy byly vytvořeny dvě skupiny buněčných tkání odvozených od linie W12. V jedné skupině

nebyla upravována exprese virového proteinu E5, zatímco u druhé skupiny byla snížena jeho exprese. U skupiny s expresí E5 proteinu byla integrace odhalena u 11 z 81 vzorků, to činí 13,6 %. V případě skupiny, ve které nedocházelo k expresi proteinu E5, se podíl vzorků s detekovanou integrací výrazně zvýšit. Jednalo se o 40 vzorků ze 78, tedy přes 51 % (Scott et al., 2019).

6. Metody detekce integrace HPV

Pro studium detekce integrace HPV je využíváno několik postupů, které jsou založené anebo odvozené od již známých molekulárně biologických metod jako je například fluorescenční barvení, polymerázová řetězová reakce (PCR z anglického polymerase chain reaction) nebo sekvenace. Jejich využití je široké a při výběru záleží, jakou informační hodnotu očekáváme. U některých metod dostaneme pouze odpověď, zda je HPV genom integrován či nikoliv. U jiných lze určit přesné místo integrace. Metody se také liší v podobě vstupního materiálu, kdy se využívají nukleové kyseliny, respektive DNA nebo RNA.

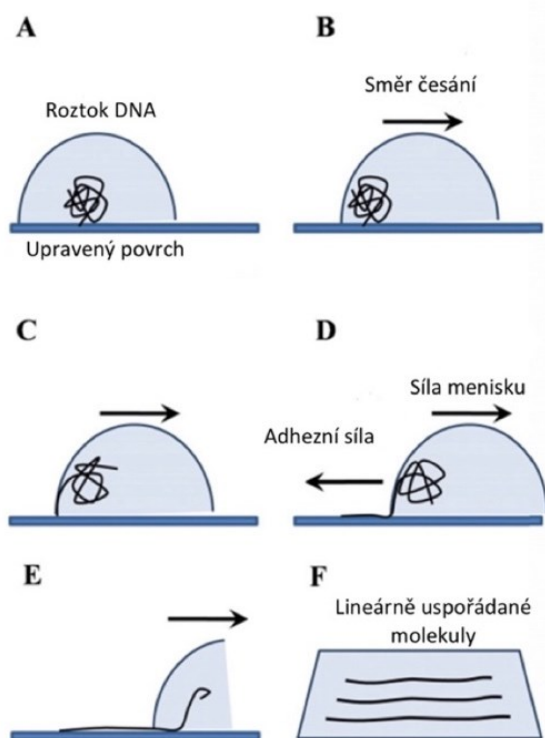
Pro tuto práci jsem vybrala pouze několik metod, se kterými se setkáme nejčastěji ve studiích zabývajících se integrací genomu HPV.

6.1. Metody využívající fluorescenční značení

Mezi metody využívající fluorescenční značení patří tzv. *molecular combing*. Jedná se o metodu, kde slouží celogenomová DNA jako vstupní materiál. Nejdříve dochází k lýzi buněk a odstranění proteinů, aby nedocházelo k znehodnocení genomové DNA. Analyzovaný vzorek je dále upraven na specifické pH a iontovou sílu, aby došlo pouze k částečnému rozvolnění konců DNA (Esmail Nazari & Gurevich, 2013).

Do takto připraveného roztoku je ponořeno podložní sklíčko se speciálně upraveným povrchem. Úprava povrchu slouží k tomu, aby se na něj navázala DNA a mohla být následně „natažena“ na sklíčko. Během vytahování sklíčka dochází k lineárnímu uspořádání DNA díky povrchovému napětí vznikajícímu mezi rozhraním roztoku a vzduchu (viz obrázek 10) (Esmail Nazari & Gurevich, 2013). Takto přenesená DNA na sklíčko je připravena k barvení pomocí fluorescenčních sond (Redmond et al., 2018). SONDY jsou navrhovány tak, aby interagovaly se specifickou sekvencí DNA a tím ji fluorescenčně označily. Takovéto značení je následně vidět pod mikroskopem.

Výhodou této metody je, že pokud je správně připravena, lze určit i počet kopií integrovaného genomu HPV na jednom vlákně buněčné DNA a při použití vhodných sond i chromozom, na kterém došlo k integraci genomu HPV. Určitou nevýhodou je přesná kontrola vlastností používaných roztoků, aby nedocházelo k až přílišnému rozvolňování DNA a následně k nespecifické vazbě uprostřed molekuly DNA, což je při „natahování“ molekul DNA nežádoucí. Další nevýhodou je určitá časová náročnost, která se pohybuje v jednotce dnů.



Obrázek 10: Schéma působících sil při natahování molekul DNA u metody molecular combing. Převzato a upraveno (Esmail Nazari & Gurevich; 2013)

6.2. Metody založené na PCR reakci

6.2.1. Detekce intaktního genu *E2*

Díky častému poškození genu *E2* během integrace, jedná se o jednu z nejsnadnějších metod detekce integrovaného genomu HPV. Metoda je založená na amplifikaci krátkých sekvencí genu *E2* pomocí sad primerů, které postupně pokryjí délku celého úseku genu. Primery jsou navrženy tak, aby na sebe navazovaly nebo u nich docházelo ke krátkému přesahu. Pokud se naamplifikuje celý gen *E2*, značí to přítomnost episomální formy

ve vzorku. V opačném případě, kdy se část genu neamplifikuje, došlo pravděpodobně ke ztrátě části genu během integrace.

Díky této metodě jsme schopni zjistit přibližné místo zlomu ve virovém genomu. Metoda neodhalí, pokud došlo ke zlomu v jiném místě virového genomu ani současnou přítomnost episomální a integrované formy. O tom, jak přesné bude určené místo zlomu, rozhoduje navrhnutí primerů.

6.2.2. PCR v reálném čase

PCR v reálném čase (qPCR – quantitative PCR) je jedna z metod odvozená od klasické PCR, která umožňuje kvantifikovat množství cílové sekvence v každém cyklu PCR. Obecně je při qPCR společně s primery přidaná do reakce proba, fluorescenčně označený oligomer. Tato proba komplementárně nasedá na sekvenci mezi primery. Při probíhající PCR reakci je proba degradována 5'→3' exonukleázovou aktivitou polymerázy. Tím dochází k aktivaci fluorescenční značky na probě a emisi signálu, který je zachycen a zaznamenán.

Pro detekci integrace genomu HPV je třeba amplifikace dvou rozdílných sekvencí. Jedna sekvence bývá designována tak, aby se nacházela v episomální i integrované formě virového genomu. To bývá nejčastěji oblast virových onkogenů, například gen *E6*. Druhá sekvence by se měla nacházet pouze v episomální formě, tudíž se předpokládá, že během integrace došlo k její delecii nebo je přerušena. Takovou sekvencí bývá nejčastěji oblast genu *E2* (Lindh et al., 2007; Peitsaro et al., 2002). Následně se provádí dvě na sobě nezávislé amplifikace s rozdílnou sadou primerů a prob.

Pokud se kvantita amplifikovaných cílových oblastí bude rovnat, jedná se o vzorek, kdy nedošlo k integraci a obě sekvence se nacházejí ve vzorku pouze v episomální formě genomu. V případě, kdy bude převažovat amplifikace oblasti genu *E6*, jedná se o vzorek s integrovaným HPV genomem, kdy zároveň došlo k delecii *E2* genu. *E2* gen se tedy bude nacházet pouze v episomální formě genomu na rozdíl od genu *E6*, který se nachází i v episomální i integrované formě genomu HPV.

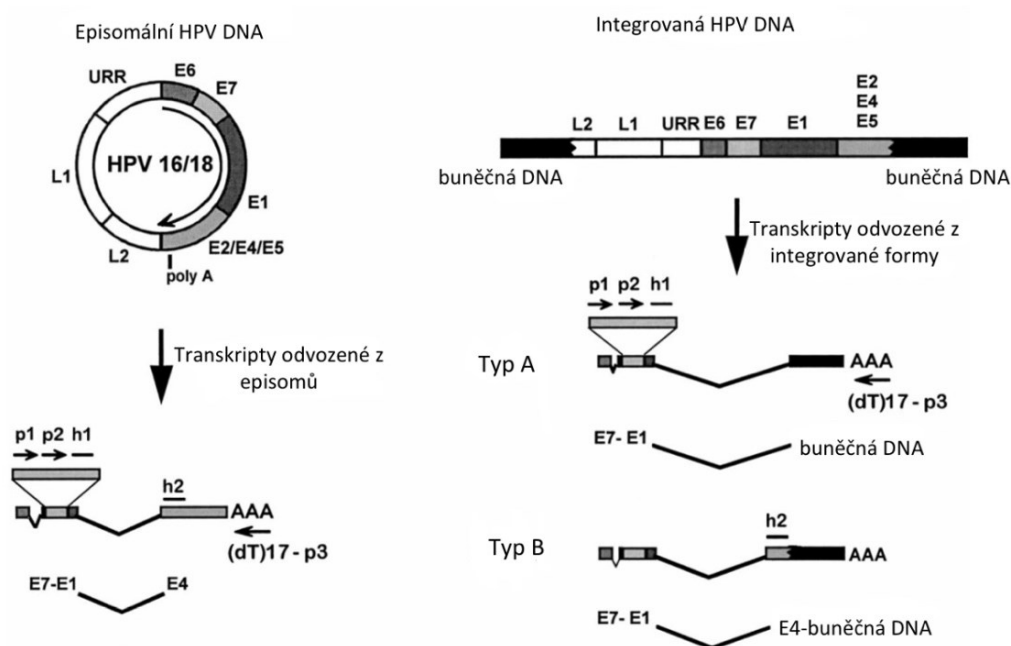
Nevýhodou této metody spočívá v nemožnosti určit místo integrace v lidském genomu. Výhodou je relativně rychlý výsledek.

6.2.3. Amplifikace virových transkriptů

Metoda amplifikace virových transkriptů APOT (Amplification of Papilloma virus Oncogene transcripts) je založena na rozdílech transkriptů odvozených z episomální a integrované formy genomů HPV. Tyto transkripty se liší na svém 3' konci (obrázek 11). U transkriptů odvozených od virového genomu mají na 3'konci před polyadenylovaným koncem sekvenci odvozenou od virového genomu. V případě transkriptů z integrované formy genomu HPV je virová sekvence nahrazena sekvencí z lidského genomu.

Při APOT PCR slouží jako vstupní materiál celková RNA, která je pomocí reverzní transkripce převedena na cDNA. Při reverzní transkripci je využit 3' konec mRNA s polyadenylovaným koncem. Na něj nasedá oligo dT primer, který je ještě na svém 5' konci prodloužen o specifickou sekvenci (na obrázku značenou jako p3) využívanou v pozdějším kroku. Po vzniku cDNA je zapotřebí dosyntetizovat druhý řetězec, kdy se pro syntézu využívá primer mířený do oblasti E7 genu (na obrázku 11 označen p1). Tato dvouřetězcová DNA je dále amplifikována pomocí primerů. Jeden je opět mířen po oblasti E7 genu (p2 na obrázku) a druhý je komplementární k probě (p3), která byla přidána na cDNA během reverzní transkripce. Produkty této amplifikace se dále analyzují pomocí hybridizace, která spočívá v použití specifických prob pro oblasti genu E4 (na obrázku označeno jako h2) nebo genu E6 (na obrázku označeno jako h1). (Klaes et al., 1999). Produkty amplifikace lze také pro přesnější výsledky sekvenovat, kdy se data ze sekvenace srovnávají s referenčními genomy. Díky tomu je možné zjistit, zda se jedná pouze o virový genom nebo byla osekvenována i část lidského genomu. Dále lze zjistit pomocí sekvence i typ HPV.

Nevýhodou této metody je RNA jako vstupní materiál. Oproti DNA má RNA menší stabilitu a musí se s ní pracovat šetrněji. Jedná se ale zároveň o jednu z mála metod při detekci integrace, kdy je využita RNA a lze této metody využít pro potvrzení výsledků z metod založených primárně na DNA.



Obrázek 11: Schéma naznačující strukturu genomů HPV16/18 v episomální formě (nalevo) a integrované formě (napravo) společně s odvozenými transkripty a místy nasedání pro primer. Primer pro RT je označen jako (dT)17-p3. Dále primery pro APOT PCR jsou označeny jako p1, p2 a p3. Proby pro hybridizační analýzu jsou označeny jako h1 (specifický pro HPV E7) respektivě h2 (specifický pro HPV E4). Transkripty odvozené od integrovaného genomu se liší v chybějící (Typ A) nebo obsahující (Typ B) sekvenci pro E4 HPV. Převzato a upraveno z (Klaes et al., 1999)

6.2.4. Detekce integrované papilomavírové sekvence pomocí PCR

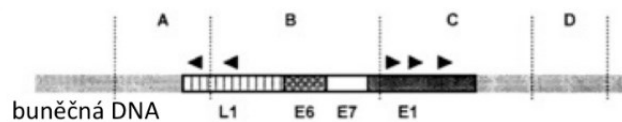
Další metodou pro určení místa integrace je metoda DIPS PCR (z anglického Detection of Integrated Papilloma virus Sequences PCR). Jako vstupní materiál při této metodě je využívána DNA. Ta je v prvním kroku rozštěpena pomocí restrikčního enzymu na kratší fragmenty. Na konce DNA fragmentů se specifickými přesahy po restrikčním štěpení, je navázán adaptor, který je na obrázku 12 vyznačen jako černá šipka v kroku C). Takto připravená DNA je připravena k amplifikaci.

První PCR, lineární, se provádí pouze s primery specifickými pro HPV sekvenci. Takovýchto primerů je celá sada a každý z nich je mířen do jiné oblasti genomu HPV. Možná místa nasedání jsou vyznačena na obrázku 12 v horní části jako černé trojúhelníčky. Po lineární PCR reakci vzniká produkt, který je amplifikován pomocí exponenciální PCR, při které se již využívají dva primery. Jeden z primerů je jako u předešlé PCR reakce specifický pro genom HPV. Tento primer nasedá na sekvenci, která je vzdálená přibližně 50 nukleotidů

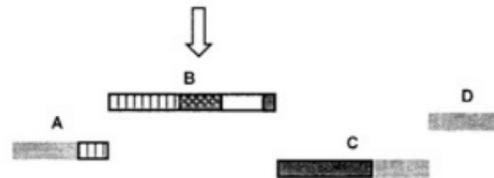
od místa nasedání pro primer z lineární PCR. Druhým primerem je adaptorový primer (AP), který nasedá na specifickou sekvenci adaptoru. Po exponenciální PCR reakci jsou produkty osekvenovány a je zjištěno místo integrace. (Luft et al., 2001).

Metoda využívá DNA, která je oproti RNA stabilnější, lze tak analyzovat i starší vzorky, které pochází například z parafínových bločků.

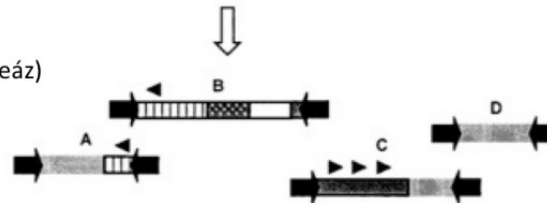
A) potenciální struktura integrovaného HPV



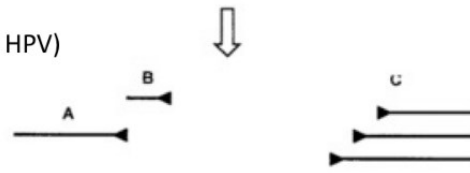
B) restrikční štěpení



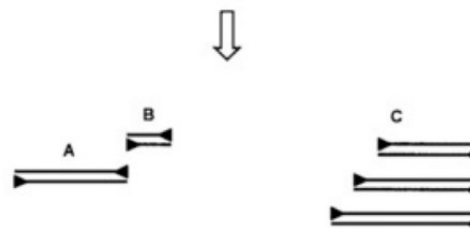
C) ligace adaptoru (pomocí specifických endonukleáz)



D) lineární amplifikace (primer: HPV)



E) exponenciální amplifikace (primer: HPV, AP)



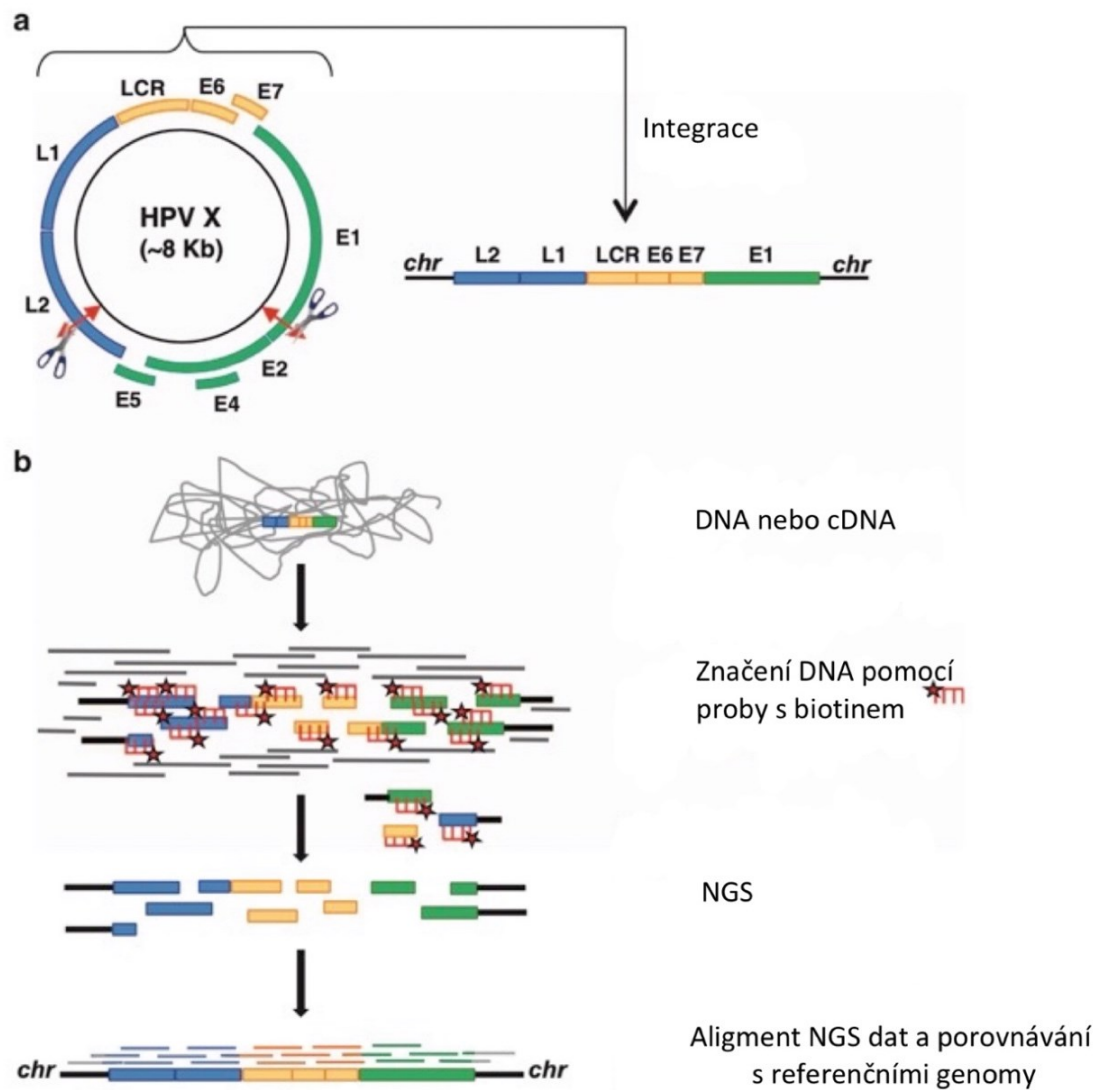
Obrázek 12: Schéma metody DIPS – PCR. V horní části obrázku vidíme možné uspořádání integrovaného genomu HPV (A). Přerušované čáry značí možná místa štěpení, které se provádí pomocí restrikčního enzymu (B). Bod C znázorňuje ligaci adaptoru (označen černou šipkou) a místa pro nasedání primerů (černé trojúhelníčky). Body D a E znázorňující lineární, respektive exponenciální amplifikaci. Převzato a upraveno z (Luft et al., 2001)

6.3. Sekvenování nové generace

Nejucelenější pohled na místo integrace získáme díky sekvenaci. V dnešní době je stále častěji využíváno sekvenace NGS, umožňující komplexnější analýzu rozsáhlejších oblastí nukleových kyselin. NGS umožňuje získat informace, které by jinak bylo nutné získat kombinací více metod. Mezi nejvýraznější výhody patří ucelená představa o události integrace, včetně charakteristiky přestaveb virového i lidského genomu. Díky tomu jsme schopni určit typ HPV, který je integrován, místo integrace v lidském genomu anebo data o případných změnách v lidském genomu (Gao et al., 2019).

Při NGS se využívá jako vstupní materiál veškerá DNA nebo RNA z buňky. U DNA následuje mechanická fragmentace. V případě RNA není potřeba mechanické fragmentace, ale RNA se musí převést do podoby cDNA pomocí reverzní transkripce. Jedním z možných postupů je, že k takto připravené NK jsou přidány proby s biotinovou značkou, které se specificky váží na sekvence genomu HPV. Biotinová značka na probách je využívána díky své schopnosti silné nekovalentní vazby ke steptavidinu. Díky této vazbě jsme schopni oddělit NK pocházející z virového genomu od ostatních NK nacházejících se v buňce a osekvenovat pouze je sekvence obsahující virový genom.

Ze získaných dat se následně dělá alignment, který je srovnáván s referenčními sekvencemi (Holmes et al., 2016). Celý proces NGS je naznačen na obrázku 13.



Obrázek 13: Schéma NGS. A) Znáznornění integrace genomu HPV. Nůžkami je naznačena část genomu HPV, která je během integrace deletována. B) Schéma NGS. Barevně je označen genom HPV a jednotlivé jeho geny (viz a), proba je značená červeným hřebenem s hvězdičkou. V dolní části obrázku vidíme aligmnet oskenovaných fragmentů. Převzato a upraveno (Holmes et al., 2016)

7. Závěr

Tato práce je souhrnem známých informací o mechanismu a faktorech ovlivňujících integraci genomu HPV do lidského genomu. Integrace, pokud k ní dojde, výrazně přispívá procesu imortalizace a nádorové transformace buněk, ale není nutnou podmínkou pro přechod buněk do nádorového bujení vzhledem k tomu, že ne vždy je integrovaná forma HPV v karcinomech nalezena.

Integrace genomu HPV pravděpodobně není náhodný proces, ale je ovlivňován mnoha faktory včetně místa integrace. V lidském genomu bylo nalezeno několik set míst, kde byla integrace genomu HPV nalézána s větší pravděpodobností. Takovéto oblasti se nazývají jako tzv. *hot spots* oblasti a nejčastěji se nacházejí v oblasti genů nebo v jejich blízkosti. Často se také jedná o protoonkogeny, tumor-supresorové geny nebo geny pro proteiny účastnící se rekombinace.

K vlastní integraci nejčastěji dochází procesem homologní rekombinace prostřednictvím mikrohologních sekvencí ve virovém i hostitelském genomu. Po proběhnutí homologní rekombinace se může vytvořit dočasná smyčka a díky replikaci může docházet k vytvoření tandemové repetice sekvence v této smyčce a vložení více kopií virových genomů za sebou do chromozomu.

Integrace genomu HPV je ovlivněna mnoha faktory. Mezi nejdůležitější faktory patří typ HPV a stupeň dysplázie infikované tkáně. Nejčastěji je v klinických vzorcích prokázán integrovaný genom u typů HPV18 a HPV45. Naopak nejméně často je detekován integrovaný genom u typu HPV31. Dále byla u klinických vzorků zjištěna jasná korelace mezi častější integrací genomu HPV a závažnějším stupněm dysplázie.

Integraci genomu HPV ovlivňují přímo i virové proteiny, které jsou schopné regulovat aktivitu opravných mechanismů DNA v buňce. Jedná se zejména o onkoprotein E6, jehož zkrácená forma ovlivňuje koncentraci ROS v buňce a souvisí se spuštěním DDR. Kromě toho společně s proteinem E7 dokáže zvýšit hladinu proteinů potřebných k rekombinaci v G₁ fázi buněčného cyklu, a tím přispět k integraci genomu HPV pomocí homologní rekombinace. Na aktivitu DDR má vliv i virový protein E1. U toho byla prokázána korelace jeho vyšší hladiny a spuštění ATM odpovědi, při které dochází k integraci genomu HPV častěji.

Dalším faktorem je i zvýšená koncentrace enzymů APOBEC a jejich schopnost substituce cytosinu za uracil, která vede k mutacím v lidském i virovém genomu. Buňka se následně bylo substitutivní mutace snaží opravit, ale pokud jich je příliš, tak ne u všech dochází k úplné opravě. To vede ke zvýšené pravděpodobnosti integrace genomu HPV.

Rozdílná míra integrace byla také zaznamenána u jednotlivých typů karcinomů. Při porovnání karcinomů děložního hrdla, análního kanálu a karcinomů v oblasti hlavy a krku se liší podíl vzorků s čistě episomální formou genomu HPV v rámci jednotlivých typů až o desítky procent.

Posledním faktorem zmíněným v této práci je interferonová odpověď imunitního systému hostitele na virovou infekci a její vliv na stabilitu virového genomu. U buněk, kde byla interferonová odpověď kontrolována virovým proteinem E5, nedocházelo tak často k integraci virového genomu a nacházel se častěji v buňkách pouze v episomální podobě.

Pravděpodobně existuje mnoho dalších faktorů virových i buněčných, které zatím nebyly objeveny nebo se nepotvrdila jejich korelace s přítomností integrovaného genomu HPV. Pro lepší porozumění procesu karcinogeneze indukovaného HPV je důležité tyto faktory poznat.

8. Použitá literatura

Použití symbolu * za citací značí sekundární zdroje.

- Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., Rocco, J. W., Teknos, T. N., Kumar, B., Wangsa, D., He, D., Ried, T., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, *24*(2), 185–199.
- Banks, L., Carbone, A., Blum, H. E., & Cesarman, E. (2012). Biological agents - a review of human carcinogens. *IARC Monographs*, *100 B*. *
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 35–56. *
- Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M., Darmon, M., Thierry, F., & Yaniv, M. (1989). The Human Papillomavirus Type 18 (HPV18) E2 Gene Product Is a Repressor of the HPV18 Regulatory Region in Human Keratinocytes. *Journal of Virology* (Vol. 63, Issue 10).
- Byun, J. M., Jeong, D. H., Kim, Y. N., Jung, E. J., Lee, K. B., Sung, M. S., & Kim, K. T. (2018). Persistent HPV-16 infection leads to recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Medicine (United States)*, *97*(51).
- Cardone, G., Moyer, A. L., Cheng, N., Thompson, C. D., Dvoretzky, I., Lowy, D. R., Schiller, J. T., Steven, A. C., Buck, C. B., & Trus, B. L. (2014). Maturation of the human papillomavirus 16 capsid. *MBio*, *5*(4), 1–11
- Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, *110*(3 SUPPL.2). *
- Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Kongyingyoes, B., Kleebkaow, P., Chumworathayi, B., Patarapadungkit, N., Reuschenbach, M., & von Knebel Doeberitz, M. (2013). Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *International Journal of Cancer*, *132*(9), 2087–2094.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekrose, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(32), 4294–4301.

- Coutlée, F., Trottier, H., Gagnon, S., Koushik, A., Richardson, H., Roger, M., Ferenczy, A. S., & Franco, E. L. (2009). Low-risk human papillomavirus type 6 DNA load and integration in cervical samples from women with squamous intraepithelial lesions. *Journal of Clinical Virology*, *45*(2), 96–99.
- Criple, T. P., Haugen, T. H., Turkl, J. P., Tabatabail, F., Schmid, P. G., Durst, M., Gissmann, L., Roman, A., & Turek, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. In *The EMBO Journal* (Vol. 6, Issue 12).
- Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaissert, H., & Alonso, A. (1998). The Human Papillomavirus Type 16 E5-Protein Modulates Ligand-Dependent Activation of the EGF Receptor Family in the Human Epithelial Cell Line HaCaT. In *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* (Vol. 241).
- Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, *445*(1–2), 80–98. *
- Esmail Nazari, Z., & Gurevich, L. (2013). Molecular Combing of DNA: Methods and Applications. *Journal of Self-Assembly and Molecular Electronics*, *1*(1), 125–148.
- Gao, G., Wang, J., Kasperbauer, J. L., Tombers, N. M., Teng, F., Gou, H., Zhao, Y., Bao, Z., & Smith, D. I. (2019). Whole genome sequencing reveals complexity in both HPV sequences present and HPV integrations in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*, *19*(1).
- Gerein, V., Rastorguev, E., Gerein, J., Draf, W., & Schirren, J. (2005). Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 Years experience. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, *132*(3), 392–394.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, *75*(3), 1565–1570.
- Graham, S. v. (2010). Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. In *Future Microbiology* (Vol. 5, Issue 10, pp. 1493–1506). *
- Hatano, T., Sano, D., Takahashi, H., Hyakusoku, H., Isono, Y., Shimada, S., Sawakuma, K., Takada, K., Oikawa, R., Watanabe, Y., Yamamoto, H., Itoh, F., Myers, J. N., & Oridate, N. (2017). Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the

- ensuing patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 140(7), 1571–1580.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - The p53 network. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 20, pp. 4077–4085).
- Holmes, A., Lameiras, S., Jeannot, E., Marie, Y., Castera, L., Sastre-Garau, X., & Nicolas, A. (2016). Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical Carcinomas. *Npj Genomic Medicine*, 1.
- Holowaty, P., Miller, A. B., Rohan, T., & To, T. (1999). Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *Journal of the National Cancer Institute* (Vol 91, No. 3) *
- Hu, L., Potapova, T. A., Li, S., Rankin, S., Gorbsky, G. J., Angeletti, P. C., & Ceresa, B. P. (2010). Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication. *Virology*, 405(2), 342–351.
- Hu, T., Ferril, S. C., Snider, A.-M., & Barbosa, M. S. (1995). In vivo analysis of HPV E7 protein association with pRb, p107 and p130. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* (Vol. 6).
- Hu, Z., Zhu, D., Wang, W., Li, W., Jia, W., Zeng, X., Ding, W., Yu, L., Wang, X., Wang, L., Shen, H., Zhang, C., Liu, H., Liu, X., Zhao, Y., Fang, X., Li, S., Chen, W., Tang, T., ... Ma, D. (2015). Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature Genetics*, 47(2), 158–163
- Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K. I. D., Watkins-Riedel, T., Singer, C. F., Kubista, E., & Czerwenka, K. F. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: Different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic Oncology*, 92(3), 873–880.
- Huebbers, C. U., Preuss, S. F., Kolligs, J., Vent, J., Stenner, M., Wieland, U., Silling, S., Drebber, U., Speel, E. J. M., & Klussmann, J. P. (2013). Integration of HPV6 and Downregulation of AKR1C3 Expression Mark Malignant Transformation in a Patient with Juvenile-Onset Laryngeal Papillomatosis. *PLoS ONE*, 8(2).
- Kamal, M., Lameiras, S., Deloger, M., Morel, A., Vacher, S., Lecerf, C., Dupain, C., Jeannot, E., Girard, E., Baulande, S., Dubot, C., Kenter, G., Jordanova, E. S., Berns, E. M. J. J., Bataillon, G., Popovic, M., Rouzier, R., Cacheux, W., le Tourneau, C., ter Haar, N. (2020). Human papilloma virus (HPV) integration signature in Cervical Cancer: identification of MACROD2 gene as HPV hot spot integration site. *British Journal of Cancer*. 124.(777–785)

- Klaes, R., Woerner, S. M., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz, B., Melsheimer, P., Von, M., & Doeberitz, K. (1999). Detection of High-Risk Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer by Amplification of Transcripts Derived from Integrated Papillomavirus Oncogenes 1. *CANCER RESEARCH* (Vol. 59).
- Kondo, S., Wakae, K., Wakisaka, N., Nakanishi, Y., Ishikawa, K., Komori, T., Moriyama-Kita, M., Endo, K., Murono, S., Wang, Z., Kitamura, K., Nishiyama, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Muramatsu, M., & Yoshizaki, T. (2017). APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. *Oncogene*, *36*(12), 1687–1697.
- Koneva, L. A., Zhang, Y., Virani, S., Hall, P. B., McHugh, J. B., Chepeha, D. B., Wolf, G. T., Carey, T. E., Rozek, L. S., & Sartor, M. A. (2018). HPV integration in HNSCC correlates with survival outcomes, immune response signatures, and candidate drivers. *Molecular Cancer Research*, *16*(1), 90–102.
- Levine, M., Noll, M., Dyson, N. A., Howley, P. M., Monger, K., & Harlow, E. D. (1989). The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* (Vol. 243)
- Lindh, M., Görander, S., Andersson, E., Horal, P., Mattsby-Balzer, I., & Ryd, W. (2007). Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *Journal of Clinical Virology*, *40*(4), 321–324.
- Luft, F., Klaes, R., Nees, M., D'ürstürst, M., Heilmann, V., Melsheimer, P., Von, M., & Doeberitz, K. (2001). Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells *Internacional Journal of Cancer* *92*(9-17)
- McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens* (Vol. 13, Issue 4). *
- Morel, A., Neuzillet, C., Wack, M., Lameiras, S., Vacher, S., Deloger, M., Servant, N., Veyer, D., Péré, H., Mariani, O., Baulande, S., Rouzier, R., Kamal, M., el Alam, E., Jeannot, E., Nicolas, A., Bièche, I., & Cacheux, W. (2019). Mechanistic signatures of human papillomavirus insertions in anal squamous cell carcinomas. *Cancers*, *11*(12).
- Mufioz, N., Bosch, F. X., de Sanjos6, S., Shah, K. v, Viladiu, P., & Gili, ; M. (1994). I The role of HPV in the etiology of cervical cancer. In *Mutation Research* (Vol. 305).
- Nkili-Meyong, A. A., Moussavou-Boundzanga, P., Labouba, I., Koumakpayi, I. H., Jeannot, E., Descorps-Declère, S., Sastre-Garau, X., Leroy, E. M., Belembaogo, E., & Berthet, N. (2019). Genome-wide profiling of human papillomavirus DNA integration in liquid-

- based cytology specimens from a Gabonese female population using HPV capture technology. *Scientific Reports*, 9(1).
- Oyervides-Muñoz, M. A., Pérez-Maya, A. A., Rodríguez-Gutiérrez, H. F., Gómez-Macias, G. S., Fajardo-Ramírez, O. R., Treviño, V., Barrera-Saldaña, H. A., & Garza-Rodríguez, M. L. (2018). Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 61, pp. 134–144). Elsevier B.V. *
- Parfenov, M., Peadamallu, C. S., Gehlenborg, N., Freeman, S. S., Danilova, L., Bristow, C. A., Lee, S., Hadjipanayis, A. G., Ivanova, E. v., Wilkerson, M. D., Protopopov, A., Yang, L., Seth, S., Song, X., Tang, J., Ren, X., Zhang, J., Pantazi, A., Santoso, N., ... Kucherlapati, R. (2014). Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15544–15549.
- Peitsaro, P., Johansson, B., & Syrjänen, S. (2002). Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 886–891.
- Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2018). Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *Journal of Dental Research*, 97(6), 691–700. *
- Redmond, C. J., Fu, H., Aladjem, M. I., & McBride, A. A. (2018). Human Papillomavirus Integration: Analysis by Molecular Combing and Fiber-FISH. *Current Protocols in Microbiology*, 51(1).
- Reidy, P. M., Dedo, H. H., Rabah, R., Field, J. B., Reidy, P. M., Gregoire, L., & Lancaster, W. D. (2004). Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope*, 114(11), 1906–1909.
- Roberts, J. N., Buck, C. B., Thompson, C. D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature Medicine*, 13(7), 857–861
- Roden, R. B. S., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1994). Interaction of Papillomaviruses with the Cell Surface. *Journal of Virology* (Vol. 68, Issue 11).
- Sakakibara, N., Mitra, R., & McBride, A. A. (2011). The Papillomavirus E1 Helicase Activates a Cellular DNA Damage Response in Viral Replication Foci. *Journal of Virology*, 85(17), 8981–8995.

- Sarmadi, S., Izadi-Mood, N., Pournashkari, M., Yarandi, F., & Sanii, S. (2012). HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(3), 779–784.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. S., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. In *Cell* (Vol. 63).
- Schmitz, M., Driesch, C., Jansen, L., Runnebaum, I. B., & Dürst, M. (2012). Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS ONE*, 7(6).
- Schweiger, M.-R., Ottinger, M., You, J., & Howley, P. M. (2007). Brd4-Independent Transcriptional Repression Function of the Papillomavirus E2 Proteins. *Journal of Virology*, 81(18), 9612–9622.
- Scott, M. L., Woodby, B. L., Ulicny, J., Raikhy, G., Orr, A. W., Songock, W. K., & Bodily, J. M. (2019). Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. *Journal of Virology*, 94(2).
- Selinka, H.-C., Florin, L., Patel, H. D., Freitag, K., Schmidtke, M., Makarov, V. A., & Sapp, M. (2007). Inhibition of Transfer to Secondary Receptors by Heparan Sulfate-Binding Drug or Antibody Induces Noninfectious Uptake of Human Papillomavirus. *Journal of Virology*, 81(20), 10970–10980.
- Slebos, R. J., Lee, M. H., Plunkett, B. S., Kesisis, T. D., Williams, B. O., Jacks, T., Hedrick, L., Kastan, M. B., & Cho, K. R. (1994). p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5320–5324.
- Thierry, F., & Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *The EMBO Journal*, 6(11), 3391–3397.
- van Tine, B. A., Kappes, J. C., Banerjee, N. S., Knops, J., Lai, L., Steenberg, R. D. M., Meijer, C. L. J. M., Snijders, P. J. F., Chatis, P., Broker, T. R., Moen, P. T., & Chow, L. T. (2004). Clonal Selection for Transcriptionally Active Viral Oncogenes during Progression to Cancer. *Journal of Virology*, 78(20), 11172–11186.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Dürst, M., Schneider, A., & Doeberitz, M. V. K. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Research*, 68(1), 307–313.

- Visalli, G., Riso, R., Facciola, A., Mondello, P., Caruso, C., Picerno, I., di Pietro, A., Spataro, P., & Bertuccio, M. P. (2016). Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *Journal of Medical Virology*, 88(2), 336–344.
- Wallace, N. A., Khanal, S., Robinson, K. L., Wendel, S. O., Messer, J. J., & Galloway, D. A. (2017). High-Risk Alphapapillomavirus Oncogenes Impair the Homologous Recombination Pathway. *Journal of Virology*, 91(20).
- Wang, Z., Wakae, K., Kitamura, K., Aoyama, S., Liu, G., Koura, M., Monjurul, A. M., Kukimoto, I., & Muramatsu, M. (2014). APOBEC3 Deaminases Induce Hypermutation in Human Papillomavirus 16 DNA upon Beta Interferon Stimulation. *Journal of Virology*, 88(2), 1308–1317.
- Williams, V. M., Filippova, M., Filippov, V., Payne, K. J., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. *Journal of Virology*, 88(12), 6751–6761.

Online zdroje:

PaVE: Papillomavirus Episteme: A resource of the Bioinformatics and Computational Biosciences Branch at the NIAID Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology [online]. [cit. 2021-4-20]. Dostupné z: <https://pave.niaid.nih.gov>