

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Pokrývková

Molekulární mechanismy karcinogeneze indukované HPV z rodu Alfa a Betapapillomaviridae
Molecular mechanisms of carcinogenesis induced by HPV from Alpha and Betapapillomaviridae
species

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2013

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, 23. 8. 2013

Podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za cenné rady, čas a trpělivost při psaní mé bakalářské práce. Další slova díky patří mé mamince s tatínkem za jejich morální a finanční podporu, bratrovi za ubytování během studia, příteli Michalovi za pochopení, laskavost a slova útěchy, když jsem byla v koncích, Archiemu a Amy za každodenní chvíle odreagování a zábavy.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	iv
Abstrakt	vi
1. Úvod	1
2. Charakteristika HPV.....	2
2.1. Genom	2
2.2. Klasifikace.....	4
2.3. Životní cyklus HPV.....	6
3. Virové onkoproteiny.....	7
3.1. Protein E5	7
3.1.1. Obecná charakteristika proteinu	7
3.1.2. Asociace s vakuolární ATP-ázou	8
3.1.3. Asociace s EGFR.....	8
3.1.5. E5 a ovlivnění imunitního systému	9
3.1.6. E5 a indukce apoptózy.....	9
3.2. Protein E6.....	10
3.2.1. Obecná charakteristika proteinu	10
3.2.2. Protein E6 a p53	10
3.2.3. Protein E6 a asociace s proteiny s PDZ doménou	11
3.2.4. Protein E6 a vliv na telomerázu.....	12
3.2.5. Ovlivnění indukce apoptózy proteinem E6	13
3.2.6. Modulace imunitní odpovědi proteinem E6	14
3.2.7. E6 a indukce chromosomové nestability	14
3.3. Protein E7.....	15
3.3.1. Obecná charakteristika proteinu	15
3.3.2. Vazba E7 k pRB	15
3.3.2. Protein E7 a interakce s p21	15
3.3.3 Vazba proteinu E7 k histon deacetylázám.....	16
3.3.4. Chromozomová nestabilita indukovaná proteinem E7.....	16
3.3.5. Modulace imunitní odpovědi proteinem E7	16
3.3.6. Zabránění apoptóze indukované E7	17
4. Genetické predispozice pro infekci virem HPV	17
5. Molekulární mechanismy kancerogeneze vyvolané HPV z rodu alfa a beta	19
6. Závěr.....	21
7. Použitá literatura.....	22

Seznam použitých zkratk

AP-1	Activator protein-1	aktivační protein-1, transkripční faktor
ATP	Adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
ATP-aza		protein vyrábějící ATP
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer	antagonista/zabiják homologní k Bcl-2 (viz Bcl-2)
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	lymfom B-buněk, proapoptotický signalizační protein
BPV	bovine papillomavirus	bovinní (hovězí) papilomavirus
C' konec	Carboxy	karboxylový konec proteinu
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CBP	CREB binding protein	protein vázající CREB (viz CREB)
CDK	cyclin dependent kinase	cyklin dependentní kináza
CREB	cAMP response element-binding protein	protein vázající element odpovědi na cAMP (viz cAMP)
CRPV	cottontail rabbit papillomavirus	papilomavirus králíků rodu <i>Sylvilagus</i>
DISC	death-inducing signalling complex	signální komplex indukující buněčnou smrt
DLG	DISC large protein	velký protein DISCu účastnící se indukce apoptózy (viz DISC)
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
ΔNP73	protein o molekulové hmotnosti 73 kDa	s delecí na N' konci (viz N' konec)
dsDNA	double stranded DNA	dvouřetězcová DNA (viz DNA)
E	early	časný
E1-E7	early protein 1-7	časný protein 1-7
E6AP	E6-associated protein	protein asociovaný s proteinem E6
E2F-1/2/3/4/5	factor E2-1/2/3/4/5	E2 transkripční faktor -1/2/3/4/5
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor pro epidermální růstový faktor
EM	electron microscopy	elektronová mikroskopie
ER	endoplasmatic reticulum	endoplasmatické retikulum
EV	epidermodysplasia verruciformis, název	onemocnění
EVER	EV sensitivity genes	geny senzitivity pro EV (viz EV)
FEH	focal epithelial hyperplasia	fokální epiteliální hyperplázie
hADA3	human alteration or deficiency in activation	lidský faktor alterace nebo ztráty aktivity
HDAC	histon deacetylase	histon deacetyláza
hDLG	human The <i>Drosophilla</i> DISC large protein	lidský protein odvozený od velkého DISC proteinu octomilky (viz DISC)
HIV	uman immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficience
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
hMCM7	human minichromosome maintenance protein 7	lidský protein udržující minichromosom 7
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HR	high-risk	vyšerizikový
hScrib	human <i>Drosophilla</i> scribble protein	lidský homolog „načmáraného“ proteinu octomilky
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
IFN-B	interferon beta	
IRF3	interferon regulatory factor	faktor regulující interferon
ISGF3	interferon stimulated gene factor 3	genový faktor 3 stimulovaný

L	late	interferonem
L1, L2	late 1, 2 protein	pozdní
LCR	long control region	pozdní protein 1 a 2
LXCXE	leucin - libovolná aminokyselina – cystein – libovolná aminokyselina – glycin, podle jednopísmenových zkratk aminokyselin	dlouhá kontrolní oblast
LR	low risk	nízkorizikový
Map	mitogen activated protein	protein aktivovaný mitogenem
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	chemotaktický protein monocytů-1
MHC	major histocompatibility protein	hlavní histokompatibilní protein
MTF-1	metal-regulatory transcriptional factor-1	transkripční faktor regulující kovy-1
NC	non-coding	nekódující
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	jaderný faktor lehkého řetězce kappa posilovače aktivovaných B buněk
NFX-91/123	nuclear transcription factor X-box binding 91/123	jaderný transkripční faktor vázající X-box 91/123
NIH 3T3	buněčná linie myších embryonálních fibroblastů	
NK	natural killer	buňky přirozeně ničící jiné buňky
NMSC	non melanoma skin carcinoma	nemelanomový karcinom kůže
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
p107/130/21/48/53	protein o molekulové hmotnosti 107/130/21/48/53 kDa	
PBP II	penicilin binding protein II	protein vázající penicilin II
PCNA	proliferative cell nuclear antigen	proliferační antigen buněčného jádra
PDZ	Protein odvozen od PSD-95-DLG-ZO1(viz PSD-95, DLG, ZO1)	
pRB	protein retinoblastoma	retinoblastomový protein
PSD-95	postsynaptic density protein-95	protein účastnící tvorby postsynaptické hustoty-95
SCID	severe combined immunodeficiency	vážná kombinovaná imunodeficiencie
TAP	transporter associated with antigen processing	transportér asociovaný se zpracováním antigenů
TGF	transforming grow factor	transformující růstový faktor
TLR	toll like receptor	receptor podobný proteinu toll
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
Trail	tumor necrosis factor-related apoptosis induced ligand	ligand spřažený s faktorem nádorové nekrózy indukující apoptózu
UV	ultra violet	ultra fialový
WHIM	wart – hypogammaglobulinemia infection – myelokathexis	bradavice – hypogammaglobulinemie – infekce - myelokatexie
ZnT-1	zinc transporter-1	zinkový transportér-1
ZO1	the zonula occludens 1	protein napomáhající správné buněčné polaritě epitelu

Abstrakt

Lidské papilomaviry (HPV) jsou malé DNA viry ubikviterně přítomné v populaci, které mohou vyvolávat benigní i maligní onemocnění. Infikují slizniční a kožní epitely. Výzkum těchto virů se velmi zintenzivnil po roce 1983, kdy byly tyto viry poprvé izolované ze vzorků karcinomu hrdla děložního. V současné době je známo, že vyvolávají i řadu dalších maligních onemocnění a předmětem výzkumu je i jejich možná role při vzniku karcinomu kůže. Tato bakalářská práce nastiňuje mechanismy, kterými HPV z rodu Alfa a Betapapillomaviridae vyvolávají maligní a benigní léze. Mezi hlavní onkoproteiny HPV patří protein E6, který váže a napomáhá degradaci p53, a dále protein E7, který interaguje s retinoblastomovým proteinem pRB a ovlivňuje jeho funkci v regulaci buněčného cyklu. U virů HPV z rodu Alfapapillomaviridae má onkogenní potenciál i protein E5, který se u virů z rodu Beta nevyskytuje. Již to napovídá, že mechanismus kancerogeneze vyvolaný viry z obou rodů bude odlišný.

Klíčová slova: lidský papilomavirus, HPV, karcinogeneze, molekulární mechanismus, onkoprotein, E5, E6, E7

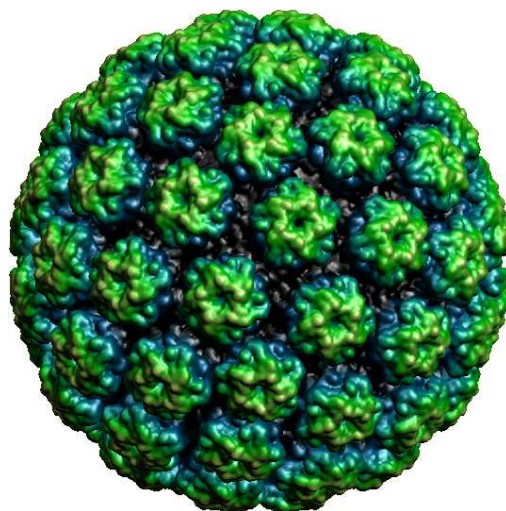
Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are small DNA viruses ubiquitously present in population. They infect mucosal and cutaneous epithelium and cause benign and malignant diseases. Research of HPV became more intensive after 1983, when these viruses were isolated for the first time from cervical carcinoma samples. Nowadays it is known, that number of other malignancies is associated with HR HPV infection and the research is focused on evaluating the role of these viruses in skin cancer. This bachelor thesis outlines mechanisms by which HPV from Alfa and Betapapillomaviridae genus causes malignant and benign lesions. The main HPV oncoprotein is protein E6, which binds p53 and targets it for degradation, and protein E7 which interacts with retinoblastoma protein and influences his function in cell cycle regulation. Papillomaviruses from genus alpha contain additionally E5 oncoprotein which is not present in viruses from genus beta. This suggests that the mechanisms of cancerogenesis initiated by viruses from these two genera will be different.

Keywords: human papillomavirus, HPV, carcinogenesis, molecular mechanism, oncoprotein, E5, E6, E7

1. Úvod

Papilomaviry, patřící do čeledi *Papillomaviridae*, jsou to malé DNA viry, napadající epitely různých částí těla savců a ptáků. U lidí způsobují benigní kožní a genitální bradavice, karcinomy urogenitálního traktu mužů i žen a část karcinomů hlavy a krku. Jako kofaktor jsou uvažované i u nemelanomového karcinomu kůže.



Obr. 1.1: Lidský papilomavirus, model virové kapsidy, převzato z databáze virových částic VIPERdb (http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=110t)

Výskyt genitálních bradavic u lidí byl popisován už ve starověku, ale původce nebyl dlouho známý. Virové partikule z genitálních bradavic byly vizualizované elektronovou mikroskopií (EM) až v roce 1969 (Waterson and Almeida, 1969). V roce 1933 pan Richard E. Shope izoloval z bradavic divokých králíků rodu *Sylvilagus* papilomavirus, který dostal název CRPV (z angl. Cottontail rabbit papillomavirus, papilomavirus) (Shope and Hurst, 1933). V roce 1935 Rouse a Beard objevili, že CRPV je schopen indukovat maligní nádory (Rous and Beard, 1935). Olson a Cook v roce 1951 popsali, že bovinní papilomavirus typu 1 (BPV1) je schopen vyvolat benigní nádory fibroblastů koní (Olson and Cook, 1951). Milníkem ve výzkumu vztahu papilomavirů a maligních projevů byla izolace DNA HPV-16 a o rok později HPV-18 z karcinomu hrdla děložního (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983) Orth a kolegové dále prokázali, že genotypy HPV jsou asociovány s výskytem kožních lézí u autozomálně recesivního onemocnění zvaného Epidermodysplasia verruciformis (EV), které může za určitých okolností progradovat do karcinomu kůže. V těchto maligních lezích byly

opakovaně prokazovány typy HPV-5 a HPV-8 (Orth, 1986; Orth et al., 1978). V téže době Yasumoto provedl experiment, kde bylo dokázáno, že přítomnost DNA HPV-16 v buňkách NIH 3T3 způsobuje jejich transformaci (Yasumoto et al., 1986). V následujícím roce bylo objeveno, že integrace virového genomu do genomu hostitele je důležitým krokem pro maligní transformaci buněk (Pirisi et al., 1987). V roce 1988 von Knebel Doeberitz a spol. prokázal, že jsou to proteiny E6 a E7 HPV, které jsou v buňkách nakažených HPV exprimovány a které mají nesporný vliv na růstové vlastnosti buňky a účastní se rozvoje karcinomu (von Knebel Doeberitz et al., 1988).

Hlavními, obecně známými onkoproteiny HPV jsou proteiny E6 a E7, avšak nespornou úlohu při tvorbě karcinomů má i protein E5. Nejznámější funkcí proteinu E6 je vazba a vyvolání degradace produktu tumor supresorového genu p53, zatímco protein E7 váže retinoblastomový protein (pRB). Hlavní úlohou proteinu E5 je asociace s receptorem pro epiteliální růstový faktor, přičemž tato vazba vede k buněčné proliferaci a ustavuje vhodné prostředí pro replikaci viru.

Součinností všech virových onkoproteinů dochází k úniku nakažených buněk před hostitelským imunitním systémem, k deregulaci buněčného cyklu hostitelské buňky, k ovlivnění mitotického aparátu, ke změnám v buněčné signalizaci a k mnoha dalším dějům, které napomáhají přetrvání a efektivnímu pomnožení viru v hostitelském organismu, avšak vedlejším efektem těchto procesů je i indukce imortalizace a transformace buněk rezultující ve vznik nádorů.

2. Charakteristika HPV

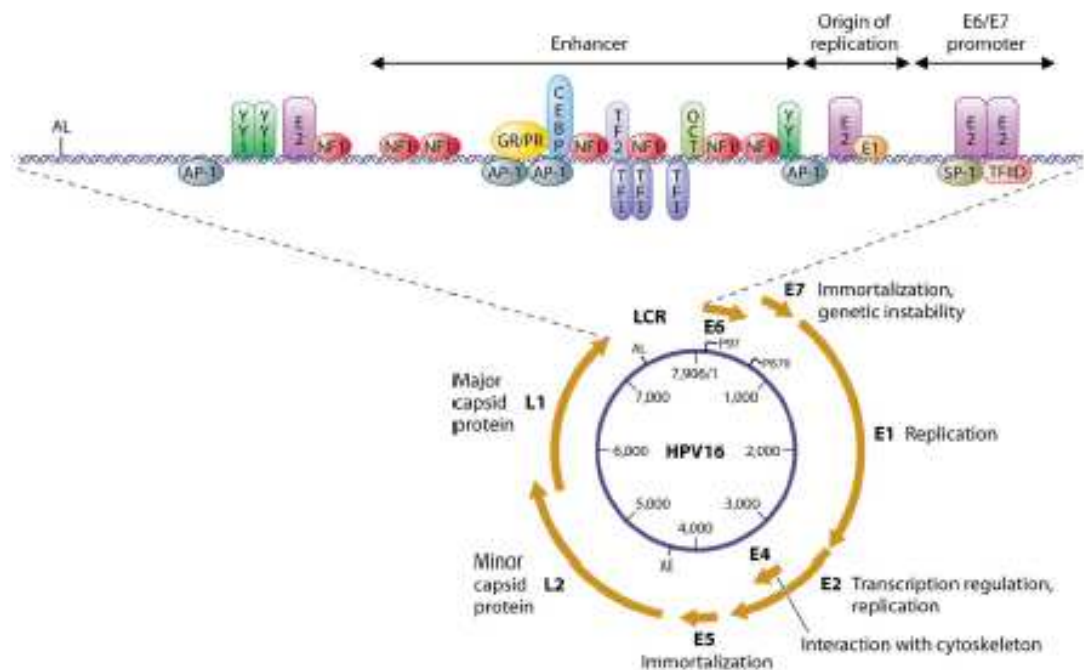
2.1. Genom

Papilomaviry, jsou malé, neobalené viry s cirkulární dvouřetězcovou deoxyribonukleovou kyselinou (dsDNA). Genom HPV dosahuje velikosti až 8 000 párů bazí (8 kbp). V průběhu infekce je virová DNA v buňkách asociována s buněčnými histony a obvykle přítomná v extrachromozomální formě (Favre et al., 1977). Virus je v průběhu svého životního cyklu zcela závislý na hostitelské buňce, nekóduje žádné typy polymeráz a dalších součástí replikačního, transkripčního a translačního aparátu.

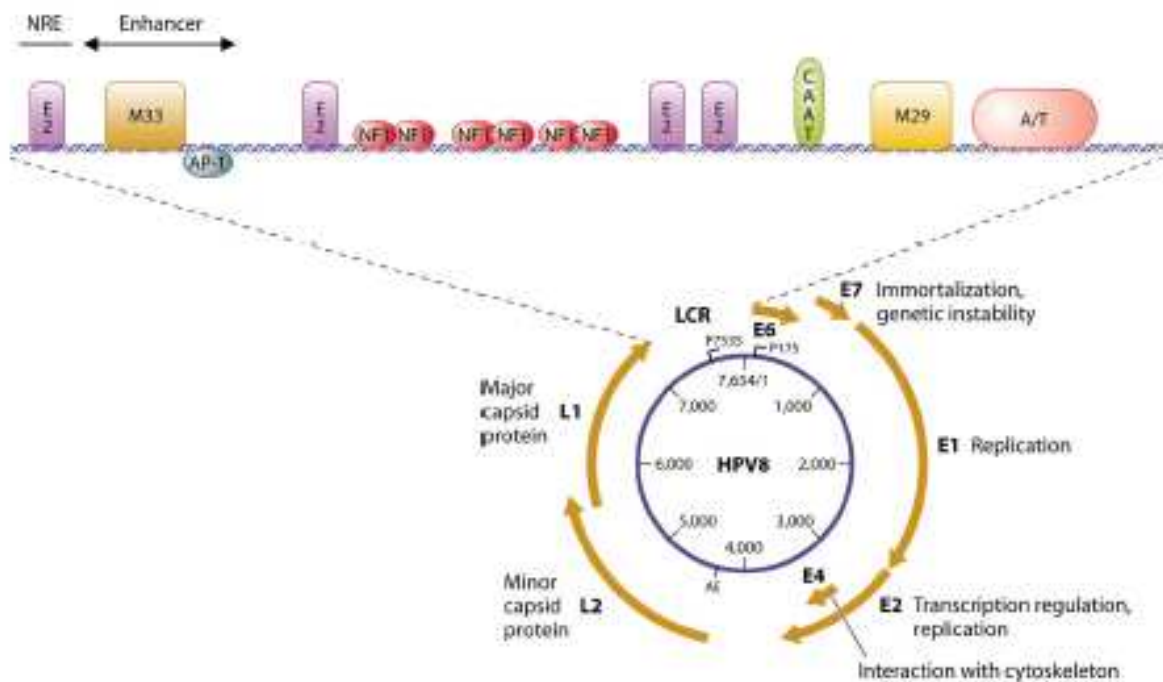
Genom HPV rozdělujeme do tří oblastí: E oblast (časný, z angl. early), který obsahuje geny kódující časné proteiny (E1-E7), L oblast (pozdní, z angl. late), který obsahuje geny kódující pozdní proteiny (L1-L2), a NC oblast (nekódující, z angl. non-coding), který

obsahuje replikační počátek a řadu dalších sekvencí, které jsou důležité pro replikaci a transkripci viru. Schopnost papilomavirů transformovat buňky je způsobena činností časných proteinů E5, E6 a E7. Proteiny E6 a E7 interagují s hostitelskými proteiny, které regulují buněčný cyklus, protein E5 váže jiné hostitelské proteiny, které napomáhají buněčné proliferaci. Proteiny E1, E2 mají regulační funkci, protein E4 napomáhá uvolnění virových částic z keratinocytů, pozdní proteiny L1 a L2 se podílejí na tvorbě virové kapsidy.

Genom papilomavirů rodu alfa obsahuje otevřený čtecí rámeček (ORF z angl. open reading frame) pro protein E5. U bovinního papilomaviru typu 1 (BPV-1) a BPV-4 je protein E5 hlavním onkoproteinem (O'Brien and Campo, 1998; Schiller et al., 1986). V genomu betapapillomaviridae se ORF pro protein E5 nenachází. Uspořádání regulačních sekvencí v genomu alfa-HPV a beta-HPV je odlišné, genom beta-HPV obsahuje kratší LCR (Reh and Pfister, 1990). Časný promotor neobsahuje vazebné místo pro protein E2, které je u alfa-HPV důležité pro transkripci z tohoto promotoru, zároveň se v genomu beta-HPV nalézají unikátní konzervované motivy, M33 fungující jako posilovač transkripce (Horn et al., 1993), či M29, který naopak transkripci utlumuje (May et al., 1994) (Obrázek 2.1 a 2.2).



Obr. 2.1: Schematické znázornění genomu HPV-16 z rodu alfa, převzato a modifikováno ((Lazarczyk et al., 2009).

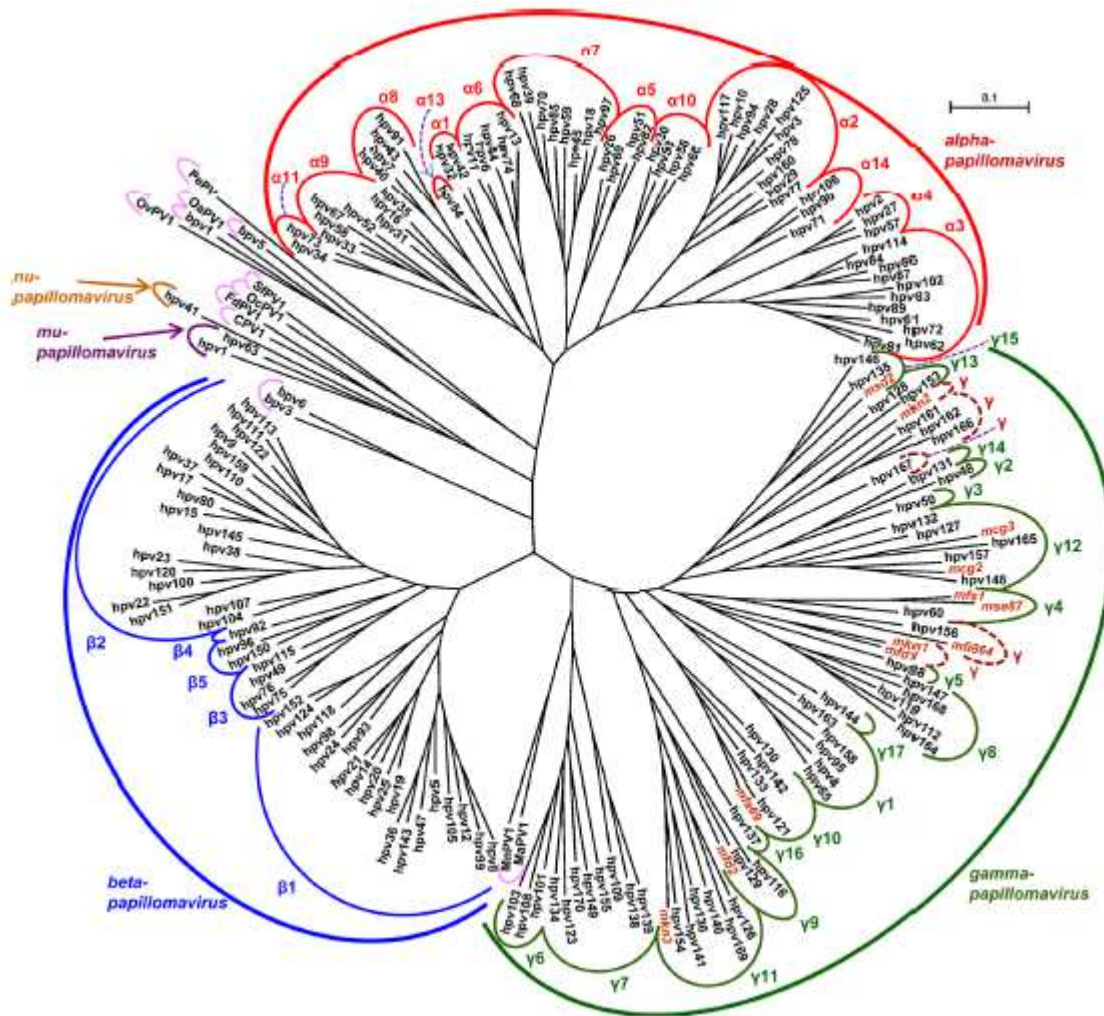


Obr. 2.2: Schematické znázornění genomu HPV-8 z rodu beta, který má odlišnou stavbu LCR ve srovnání s HPV z rodu alfa a neobsahuje ORF pro protein E5, převzato a modifikováno ((Lazarczyk et al., 2009).

Při produktivní virové infekci virový genom HPV, bez ohledu na onkogenní potenciál viru, přetrvává v infikovaných buňkách v extrachromozomální formě. Integrace virové DNA hraje esenciální roli při maligní transformaci, avšak toto pro virus znamená konec životního cyklu, neboť se nevytváří nové virové partikule. Jedná se tedy o děj náhodný (Doorbar, 2007). Frekvence integrace vzrůstá s progresí cervikálních neoplázií. U HPV z rodu beta nedochází k integraci virového genomu do genomu hostitele (Lazarczyk et al., 2009).

2.2. Klasifikace

Čeleď *Papillomaviridae* se dále dělí na jednotlivé rody alfa, beta, gamma, mu a nu dle podobnosti nukleotidových sekvencí ORF proteinu L1. Nejvíce druhů je zastoupeno v rodech alfa a beta (Obrázek 2.3).



Obr. 2.3: Fylogenetický strom zkonstruovaný pomocí vyhodnocení sekvenční podobnosti ORF proteinu L1. Zobrazuje jednotlivé typy HPV rodů alfa, beta, gamma, mu a nu, převzato a modifikováno (de Villiers, 2013).

Podle onkogenního potenciálu rozdělujeme papilomaviry na vysoce-rizikové (HR, z angl. High Risk), které jsou schopny imortalizace lidských keratinocytů a nízko-rizikové (LR, z angl. Low Risk), které vyvolávají pouze benigní léze. Oba rody Alfapapillomaviridae i Betapapillomaviridae zahrnují HR i LR typy (Obrázek 2.4).

Další možností dělení HPV je dle jejich tkáňového tropismu na typy slizniční a kožní. Slizniční papilomaviry způsobují genitální kondylomata, a cervikální intraepiteliální neoplázie, přičemž HPV-16 a -18 jsou zodpovědné za 70 % cervikálních karcinomů (Clifford et al., 2003). Kožní papilomaviry způsobují benigní kožní bradavice. Papilomaviry rodu alfa zahrnují typy napadající sliznice i kožní epitel lidí, primátů i dalších živočichů, viry z rodu beta napadají pouze epitel kůže, rody gamma, mu a nu způsobují kožní papilomy a bradavice (de Villiers et al., 2004).

Table 5. Phylogenetic and Epidemiologic Classification of HPV Types.		
Phylogenetic Classification	Epidemiologic Classification	
	High risk	Low risk
High risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26,* 53,* 66*	70
Low risk	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

Obr. 2.4: Výčet a rozdělení HPV z rodu alfa. Hvězdičkou jsou označeny typy HPV míněné jako možné HR typy, převzato a modifikováno (Munoz et al., 2003).

HPV-5 a HPV-8 z rodu beta jsou schopny indukovat maligní transformaci, avšak pouze u pacientů trpících vzácným kožním onemocněním zvaným Epidermodysplasia verruciformis (EV). Tyto HPV jsou tedy označovány jako HR papilomaviry (Majewski and Jablonska, 1997; Orth, 2006). Tyto typy HPV jsou též v minimálním množství nalézány u velké části vzorků nemelanomového karcinomu kůže (NMSC, z angl. non melanoma skin carcinoma), a to u pacientů, kteří EV netrpí, ale jsou imunosuprimovaní. Zde jsou tyto viry uvažovány pouze jako kofaktor (Purdie et al., 2005). Nověji je mezi HR HPV z rodu beta řazen i HPV-38, který je schopný transformovat hlodavčí fibroblasty (Caldeira et al., 2003).

2.3. Životní cyklus HPV

Produktivní životní cyklus HPV je úzce spojen s diferenciací epitelálních buněk. HPV nejdříve infikují bazální keratinocyty v místě miniaturního poranění kůže. Zde dochází za pomoci komplexu časných virových proteinů E1 a E2 k iniciaci replikace virové DNA (Frattoni and Laimins, 1994). Po ztrátě proliferací schopnosti keratinocytů dochází k jejich diferenciaci, avšak stále pokračuje replikace DNA, a to díky činnosti proteinu E7, který je schopen znovu navodit zastavenou DNA syntézu (Cheng et al., 1995). Poté následuje amplifikace virové DNA, exprese kapsidových proteinů L1 a L2 a balení genomu do virových částic ve vrchních vrstvách epitelu. Kompletní virus je pak uvolňován společně s odlučujícími se keratinocyty, což je umožněno díky činnosti proteinu E4, který asociuje s cytoskeletem keratinocytů a narušuje strukturu keratinových vláken (Doorbar et al., 1991).

K infekci slizničními HPV dochází brzy po prvním sexuálním styku, infekce souvisí s věkem a počtem sexuálních partnerů pacienta (Winer et al., 2008). Nejčastěji jsou ženy nakaženy během 16. a 25. roku života, jedná se o 20-30 % případů nákazy. Postupem věku dochází ke snížení počtu nakažených žen, po 45. roku života se jedná o 5 % případů (Winer et al., 2003). Po infekci HPV většinou dochází k samovolnému vyčištění infekce, případně regresi lézí, avšak u lézí vyvolaných HR HPV je samovolné vyléčení méně pravděpodobné, nejmolejší vyčištění infekce virem je u HPV-16 (Molano et al., 2003). U mužů je velká prevalence HPV virů, avšak po zhruba 12 měsících dochází k rychlému vyčištění virové infekce. Ke vzniku klinicky patrných lézí dochází jen ve velmi malém procentu infikovaných jedinců (Giuliano et al., 2008).

Karcinomy kůže indukované HPV z rodu beta jsou spojeny s onemocněním EV. Nádory se objevují v místech vysoce exponovaných slunečním zářením. V maligně změněných lezích EV byly izolovány HR HPV 5 a 8, které jsou s tímto progradujícím onemocněním asociovány. V *in vivo* experimentech na myších bylo dokumentováno, že UV záření je důležitým faktorem pro indukci karcinogeneze, neboť u myší, které exprimují časný protein E2 HPV-8 dochází po ozáření UV světlem k spontánní indukci karcinomů (Forslund et al., 2007).

3. Virové onkoproteiny

3.1. Protein E5

3.1.1. Obecná charakteristika proteinu

Protein E5 je malý, hydrofobní, membránově vázaný protein, který se nachází především na membránách endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu a jádra.

Protein E5 některých typů HR HPV vykazuje slabou transformační aktivitu v buněčných liniích a pokusných zvířatech (Straight et al., 1993). Genom LR HPV 6 a 11 kóduje dva E5 proteiny (E5A a E5B). Protein E5a vykazuje též slabou transformační aktivitu. Vzhledem k tomu, že sekvence kódující protein E5 je přítomná u mnoha typů HPV, soudí se, že produkt tohoto genu je důležitý pro replikaci viru. Přesto viry z rodu beta, které neobsahují E5 gen, jsou schopné plnohodnotné replikace. Vysvětlení pro tento fenomén zatím není známé. Mimo to, přítomnost sekvence kódující E5 protein v genomu jednotlivých typů HPV koreluje

s rizikem vzniku karcinomu vyvolaného tímto typem, což naznačuje, že E5 hraje roli při maligní transformaci.

3.1.2. Asociace s vakuolární ATP-ázou

Vysoká hydrofóbnost proteinu E5 zapříčiňuje, že je schopen se vázat k mnoha buněčným proteinům, například k 16kDa velké transmembránové podjednotce vakuolární H⁺ ATP-ázy typu V (Conrad et al., 1993). Pro vytvoření tohoto stabilního komplexu je klíčová právě hydrofóbnost vazebné sekvence aminokyselin proteinu E5, samotné aminokyselinové složení není tolik významné (Adam et al., 2000). Vazbou E5 proteinu k podjednotce vakuolární ATP-ázy, dochází ke zpomalení její činnosti, snížení acidifikace endosomů, což může ovlivňovat zejména účinnost recyklace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR, z angl. epidermal grow factor receptor) na povrch buňky (Straight et al., 1995). Adam et al. (2000) však nepotvrdil vliv vazby E5 k ATP-áze na fungování vakuolární ATP-ázy.

3.1.3. Asociace s EGFR

Dalším proteinem, u něhož byla v některých pracích popsána asociace s proteinem E5 je EGFR (Hwang et al., 1995), i když jiné práce asociaci nepotvrdily (Conrad et al., 1993). Množství EGFR v buňce je důležité pro signální dráhy. V neinfikovaných keratinocytech dochází k degradaci EGFR i jeho ligandu, epidermálního růstového faktoru (EGF, z angl. epidermal grow factor) v lysozomech (Straight et al., 1993). Po navázání EGF dochází k superaktivaci EGFR tak, že narůstá počet fosforylovaných tyrosinových zbytků receptoru, což podporuje aktivaci fosforylační kaskády **ras** – **raf** – **MEK** (z angl. mitogen activated protein kinase, kináza MAP kinázy) – **MAP** (z angl. mitogen activated protein, mitogenem aktivovaný protein) kinasy a kinázy ERK1/2, což vede k transkripci časných genů *TGF α* (z angl. transforming grow factor alfa, transformující růstový faktor) či *c-myc* (Crusius et al., 1997). V buňkách exprimujících protein E5 HPV-16 se nachází zvýšené množství EGFR, a to především díky účinnější recyklaci tohoto receptoru. Výsledky novějších prací sice potvrzují, že v E5 exprimujících buňkách se nachází zvýšená hladina EGFR, avšak zároveň ukazují, že protein E5 nemá vliv na hyperfosforylaci EGFR, neboť množství hyperfosforylovaného EGFR v HPV-31 infikovaných buňkách je stejné i v případě absence proteinu E5. Předpokládá se, že hyperfosforylace EGFR může být vyvolána součinností s dalšími virovými proteiny, zejména s proteiny E6 a E7 (Fehrmann et al., 2003). Nutno podotknout, že virus je schopen modulovat aktivaci MAP kináz, především p28, i bez pomoci EGFR, a to ve stresem ovlivněných keratinocytech (Crusius et al., 2000). V posledních letech se ukazuje, že EGF má

jistý vliv na schopnost transformovat buňku. V buňkách, kde není přítomen EGF, byla popsána nižší transformační aktivita. Navíc, pokud se do buněk bez EGF, přidá EGF, transformační aktivita signifikantně narůstá.

Protein E5 HR HPV-16 i LR HPV-11 reprimuje promotor genu pro p21 ve fibroblastech a keratinocytech. Samotná represe genu pro p21 navíc koreluje se schopností E5 transformovat buňku. Snížení exprese genu pro p21 může vyvolávat i produkt genu *c-jun*. Vzhledem k faktu, že exprese *c-jun* je podporována proteinem E5, soudí se, že E5 dokáže snižovat hladinu exprese p21 právě podporou exprese *c-jun* (Tsao et al., 1996).

3.1.5. E5 a ovlivnění imunitního systému

Další důležitou vlastností HR i LR proteinů E5 HPV je schopnost snižovat počet molekul hlavního histokompatibilního komplexu třídy I (MHC, z anglického major histocompatibility complex), u lidí pojmenovaných jako lidské leukocytární antigeny (HLA, z anglického human leukocyte antigen). Důsledkem snížení počtu povrchových HLA je umožnění persistence viru. V infikovaných buňkách nedochází k transportu HLA I. třídy na buněčný povrch, nýbrž zůstávají lokalizovány v Golgiho aparátu. Tento fenomén je však popisován pro molekuly HLA-A a HLA-B, nikoliv pro HLA-C/E I. třídy. Redukce počtu HLA není děj nevratný, neboť v in vitro experimentech po přidání interferonu β detekujeme množství povrchového HLA I. třídy srovnatelné s buňkami neexprimujícími protein E5, přičemž interferon β nijak neovlivňuje množství či funkčnost proteinu E5. Jednou z možností přerušení transportu HLA I. třídy na buněčný povrch, by mohlo být vyřazení transportéru asociovaného se zpracováním antigenů (TAP, z angl. transporter associated with antigen processing). Nebylo však dokázáno, že v buňkách exprimujících protein E5 dochází k jeho degradaci nebo poškození. Lokalizace HLA v Golgiho aparátu, může mít souvislost s jeho výše zmíněnou acidifikací Golgiho aparátu (Ashrafi et al., 2005). Možností je i fyzická interakce mezi proteinem E5 a HLA. Výsledky ukazují, že protein E5 HR HPV-16 tvoří stabilní komplex s těžkým řetězcem některých typů HLA-A a/nebo HLA-B.

3.1.6. E5 a indukce apoptózy

Jednou z možností, jak se brání buňka proti virové infekci, je schopnost indukovat apoptózu. HPV dokázaly vyvinout antiapoptotické mechanismy. Protein E5 negativně ovlivňuje schopnost buňky indukovat apoptózu vyvolanou TRAIL (z angl. tumor necrosis factor-related apoptosis induced ligand, ligand spřažený s faktorem nádorové nekrózy indukující apoptózu) a Fas ligandem (transmembránový protein z rodiny faktorů nádorové

nekrózy – TNF, z angl. tumor necrosis factor). Mechanismus je v prvním případě založený na ovlivnění tvorby signálního komplexu indukujícího buněčnou smrt (DISC, z angl. death-inducing signalling complex), v případě druhém na snížení exprese povrchových receptorů Fas (Kabsch and Alonso, 2002). V další studii bylo prokázáno, že HPV-16 E5 je schopen chránit lidské keratinocyty předkožky před apoptózou vyvolanou ozářením UV-B (z angl. ultra violet, ultra fialové) paprsky a to tak, že je spuštěna antiapoptotická dráha, která začíná fosforylací EGFR, na níž má protein E5 pozitivní vliv (Zhang et al., 2002).

3.2. Protein E6

3.2.1. Obecná charakteristika proteinu

Lidský papilomavirus kóduje na svém 5' konci 2 hlavní onkogeny, a to geny pro časné proteiny E6 a E7. První zmínka o transformačním potenciálu produktů regionu E6/E7 na DNA HPV16 pochází z roku 1987, kdy bylo zjištěno, že dokážou kooperovat s *EJ-ras* v primárních buňkách, čímž mění tvar buněk a urychlují růst buněčných linií (Matlashewski et al., 1987). Dále bylo zjištěno, že proteiny E6 a E7 HPV-16 společně prodlužují životnost lidských genitálních keratinocytů (Hawley-Nelson et al., 1989). Proteiny E6 a E7 samotné jsou nutné, ale ne dostačující pro nádorovou transformaci.

3.2.2. Protein E6 a p53

Asi nejstudovanější vlastností proteinů E6 HR HPV je schopnost vázat protein o molekulové hmotnosti 53 kDa, p53 (Werness et al., 1990), negativní regulátor buněčného cyklu, který se při zjištěném poškození buněčné DNA podílí na udržení buňky v G1 fázi. Ztráta funkčního p53 může vést k neschopnosti buňky zastavit se v G1 fázi a poškození DNA opravit, to vede ke kumulaci mutací DNA a posléze k selekci maligního klonu. V roce 1993 bylo zjištěno, že buněčné kultury obsahující DNA HR HPV také nedokážou účinně blokovat syntézu buněčné DNA po jejím poškození, přičemž za tento fakt je odpovědný protein E6 interagující s p53 a působící tak proti jeho správné funkci (Kesis et al., 1993). Později byla neschopnost buňky inhibovat syntézu poškozené DNA díky činnosti E6 potvrzena i v *in vivo* experimentech (Song et al., 1998).

Z dalšího výzkumu vyplynulo, že protein E6 redukuje množství p53 v buňce a to pomocí ubiquitinové dráhy (Scheffner et al., 1990). HR HPV typy degradují p53 pomocí komplexu E6 a E6AP (z angl. E6-associated protein, protein asociovaný s E6), který funguje jako E3 ubiquitinová ligáza. Po vytvoření komplexu E6-E6AP dochází k jeho vazbě k p53 a následně k rozeznání ubiquitinačním systémem, což má za následek následnou degradaci p53

(Scheffner et al., 1993). U LR HPV také dochází k asociaci s E6AP, což může vést k degradaci ubikvitinilací pomocných proteinů (Brimer et al., 2007), avšak nedochází k degradaci p53 v důsledku neschopnosti vazby E6AP. Stejně jako LR HPV, i HPV rodu beta váží p53, avšak nejsou schopny iniciovat jeho degradaci (Li and Coffino, 1996).

Další strategií proteinu E6 HR HPV typů, jak redukovat aktivitu p53 v buňce je přímá interakce s transkripčními koaktivátory - histon acetyltransferázami pomocí jejich PBP II (z angl. penicilin binding protein, penicilin vázající protein) domény. Interakce E6 s CBP/p300 koreluje se snížením transkripční aktivity p53 (Zimmermann et al., 1999). Vazba proteinu E6 ke koaktivátoru je specifická, u HR HPV se protein E6 přednostně váže do tzv. C/H1 domény, dále do C/H3 domény (ekvivalentní k výše zmíněné PBP II doméně) a do oblasti C' konce p300. U LR dochází k vazbě proteinu E6 na N' konci koaktivátoru. Jakmile se protein E6 HR HPV naváže na C/H3 doménu, dochází k zastavení činnosti koaktivátoru. Je známo, že právě C/H3 doména aktivátoru je klíčová pro jeho správnou funkci. Důsledkem přímé vazby mezi E6-p300-p53 je zastavena transkripce těch genů chromatinu, které vyžadují přítomnost p53. Represe p53 závislé transkripce pomocí tohoto dimerního komplexu jsou schopny i LR HPV (Thomas and Chiang, 2005).

Dále bylo dokázáno, že E6 protein pouze HR HPV váže homolog kvasinkového transkripčního koaktivátoru, hADA3 (z angl. human alteration or deficiency in activation, lidský protein indukující změnu nebo nedostatek aktivace transkripce) a způsobuje snížení jeho hladiny v buňce. hADA3 přímo váže protein p53 a v nenakažených buňkách působí jako koaktivátor p53. Tím, že dojde ke snížení hladiny hADA3, dochází k inhibici funkce p53 bez jeho degradace (Kumar et al., 2002).

3.2.3. Protein E6 a asociace s proteiny s PDZ doménou

Dalším doplňujícím mechanismem karcinogeneze spojené s E6AP, je degradace proteinů obsahující tzv. PDZ domény, což je homologická sekvence o délce asi 90 aminokyselin uplatňující se v mnoha buněčných procesech a nacházejících se i v proteinech keratinocytů. Název je odvozen ze zkratk tří proteinů, ve kterých byly tyto domény poprvé objeveny: PSD-95 (z angl. postsynaptic density, protein účastnící se signalizace v postsynaptické hustotě), DLG (z angl. The Drosophila disc large protein, protein účastnící se indukce apoptózy) a ZO1 (z angl. the zonula occludens 1, protein napomáhající správné buněčné polaritě epitelu). Bylo prokázáno, že protein E6 HR HPV je schopen vázat protein hDLG (lidský homolog DLG) přes jeho PDZ doménu na C-konci a způsobit jeho degradaci

(Kiyono et al., 1997). Pro degradaci lidského homologu tumor supresorového proteinu *Drosophila* FIRFble (hScrib), také obsahujícího PDZ, je přítomnost E6AP nezbytná, vzniká ternární komplex E6-E6AP-hScrib, přičemž protein E6 zde funguje jako prostředník mezi substrátem (hScrib) a ubiquitin ligázou (E6AP). Degradací hScrib dochází k porušení integrity těsných spojů, neboť právě zde je tento protein lokalizován (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Existují i další proteiny s PDZ doménou, které se váží k HR HPV typům a jsou následně degradovány.

Všechny zmíněné proteiny s PDZ doménou se podílejí na obraně proti virem indukované buněčné transformaci (můžeme je tedy označit za tumor supresorové proteiny), což vysvětluje, proč jsou vázány E6AP a směřovány k degradaci (Massimi et al., 2004). Navíc bylo ukázáno, že právě PDZ doména je klíčová pro indukci epiteliálních hyperplázií, bez interakce s PDZ doménou není protein E6 schopen hyperplázii vyvolat (Nguyen et al., 2003).

U papilomavirů rodu beta byla v buňkách exprimujících onkoproteiny E6 a E7 HPV-38 prokázána stabilizace p53, který je fosforylován na serinech 15 a 392 a který následně podporuje transkripci a následnou akumulaci Δ Np73 faktoru. Ten působí negativně na funkci p53 jako transkripčního faktoru (Accardi et al., 2006). Akumulace Δ Np73 byla také prokázána u HPV-24, HPV-36, HPV-49, avšak mechanismus narušení funkce p53 je u těchto typů nezávislý na přítomnosti Δ Np73 (Cornet et al., 2012).

3.2.4. Protein E6 a vliv na telomerázu

Další význačnou funkcí proteinu E6 v HPV infikovaných buňkách je schopnost ovlivnit přirozenou funkci telomerázy. Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex, který syntetizuje konce chromozomů (telomer, repetice TTAGGG) a zabraňuje jejich zkracování. V průběhu života buňky však k postupnému zkracování telomer dochází, čímž dochází k jejímu stárnutí.

Protein E6 HR HPV aktivuje telomerázovou aktivitu v lidských keratinocytech a prsních epitheliálních buňkách (Klingelutz et al., 1996). Aktivace telomerázy podporuje immortalizaci buňky (Kiyono et al., 1998). Důležitým pomocníkem aktivace telomerázy je reverzní transkriptáza lidské telomerázy (hTERT), což je podjednotka telomerázy s katalytickou funkcí. E6 je sice pokládán za hlavní aktivátor, pokud jsou však zároveň exprimovány oba onkoproteiny E6 i E7, zvýšení aktivity telomerázy je mnohonásobně silnější (Oh et al., 2001). Veldman a spol. (Veldman et al., 2003) ukázali, že protein Myc je nezbytný pro indukci promotoru hTERT, navíc s proteinem E6 v tomto účinně kooperuje a oba se váží

jako komplex na promotor hTERT. Vázat se na promotor však mohou pouze proteiny HR HPV typů.

Jedním z mechanismů, jak aktivovat telomerázu je využití E6AP. Gewin ukázal, že pro aktivaci telomerázy pomocí proteinu E6 HPV je přítomnost E6AP nezbytná, E6 indukuje expresi hTERT a je schopen vázat NFX1-91 (z angl. nuclear transcription factor, X-box binding 91, jaderný transkripční faktor vázající X-box), což je transkripční represor promotoru hTERT, a dále jej degraduje ubiquitinací pomocí E6-E6AP ubiquitinačního komplexu (Gewin et al., 2004). Důsledkem je acetylace histonů a možnost transkripce promotoru (Xu et al., 2008).

Protein NFX1-91 má i druhou variantu sestřihu zvanou NFX1-123, jejíž přítomnost naopak zvyšuje telomerázovou aktivitu. Protein NFX1-123 se *in vivo* váže k proteinům vázajícím polyadenylovaný konec, a tím podporuje aktivaci promotoru hTERT v keratinocytech (Katzenellenbogen et al., 2007).

Aktivace telomerázy jsou schopny i papilomaviry rodu beta. U HPV-38 byl popsán stejný mechanismus aktivace telomerázy jako u HPV-16 z rodu alfa. Proteiny E6 HPV-5,-8 a -38 jsou schopny indukovat transkripci hTERT, avšak v menší míře, než je tomu u HR HPV rodu alfa. Byla také prokázána schopnost vazby E6 HPV-8 a -38 s E6AP, nikoliv však u HPV-5, avšak tato vazba je odlišná od vazby HPV z rodu alfa. Nejsilněji váže ubiquitin ligázu E6 HPV-38, E6 HPV-8 váže E6AP velmi slabě. Zároveň protein E6 typu 38 vykazuje nejsilnější schopnost vázat se k NFX1-91, což koreluje s nejsilnější schopností aktivovat telomerázu. Proteiny E6 dalších typů HPV rodu beta se k tomuto proteinu neváží (Bedard et al., 2008).

3.2.5. Ovlivnění indukce apoptózy proteinem E6

Důležitou vlastností proteinu E6 i E7 je vliv na programovanou buněčnou smrt, apoptózu. E6 inhibuje apoptózu navozenou proteinem E7 a to jednak mechanismem závislým na p53, tak i mechanismem na p53 nezávislým (Pan and Griep, 1995).

Jedním ze způsobů, jak E6 HPV blokuje apoptózu je inhibice funkce proapoptického proteinu Bak, zprostředkováním jeho degradace ubiquitinací (Thomas and Banks, 1998).

U papilomavirů rodu beta byla také prokázána schopnost vazby E6 s Bak a následně jeho proteasomální degradace (Jackson et al., 2000). V buňkách exprimujících protein E6 beta-PV i alfa-PV bylo dále zjištěno snížené uvolňování cytochromu c z mitochondrií, které má za následek aktivaci kaspázy-3 a přerušování proapoptické signalizační dráhy indukované UV-B (Underbrink et al., 2008).

Protein E6 HPV-16 je dále schopen chránit buňku před apoptózou vyvolanou TNF a apoptóze vyvolané Fas kaskádou (Duerksen-Hughes et al., 1999; Filippova et al., 2004).

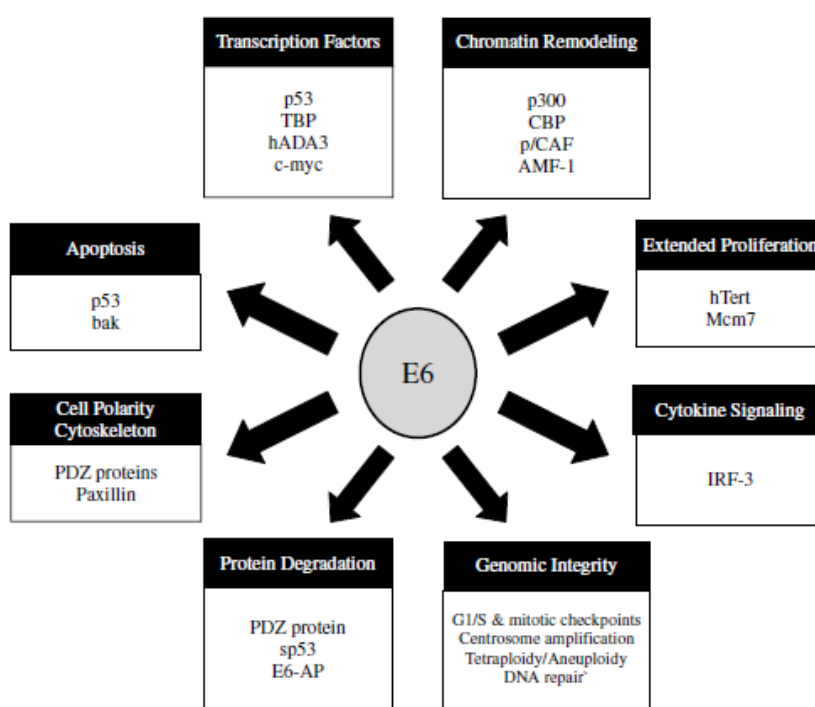
3.2.6. Modulace imunitní odpovědi proteinem E6

Protein E6 HR HPV je také schopen modulovat imunitní odpověď. Jedním z mechanismů je vazba na IRF-3 (lidský faktor regulující interferon, z angl. interferon regulatory factor) a v důsledku toho inhibice transaktivace IRF-3 genů pro IFN β (interferon β), který inhibuje virovou replikaci (Ronco et al., 1998).

V součinnosti s proteinem E7, protein E6 zastavuje transkripci genu pro TLR9 (z angl. toll like receptor, receptor podobný genu *toll*), který reaguje na přítomnost viru v organismu spuštěním signálních drah vedoucích k produkci cytokinů a chemokinů (Hasan et al., 2007).

3.2.7. E6 a indukce chromosomové nestability

Další z vlastností E6 proteinů HR i LR HPV, která může vést k chromosomálním nestabilitám, je jeho vazba k proteinu hMCM7 (z angl. human minichromosome maintenance protein 7, protein udržující lidský minichromosom), který napomáhá správnému průběhu buněčného cyklu (Kukimoto et al., 1998).



Obr. 3.1: Klíčové funkce proteinu E6, schematické zobrazení, převzato (Münger et al., 2007)

3.3. Protein E7

3.3.1. Obecná charakteristika proteinu

Protein E7 je malý onkoprotein, dlouhý asi 100 aminokyselin. Protein E7 nemá enzymatickou aktivitu, avšak váže tumor supresorový pRb, který funguje jako růstový represor a řídí správný průběh buněčného cyklu (Dyson et al., 1989).

3.3.2. Vazba E7 k pRB

Pro vazbu proteinu E7 k pRB je nezbytný vazebný motiv na N-konci, zvaný LXCXE, složený s aminokyselin leucinu, cysteinu, a glycinu, mezi kterými jsou vloženy libovolné aminokyseliny. Vazba mezi pRB a E7 je nezbytná, avšak nikoliv dostačující pro buněčnou transformaci (Munger et al., 1989). Motiv LXCXE onkoproteinu je důležitý i pro vazbu dalších buněčných proteinů, a to p130, p107 a cyklinu A. Přirozeným vazebným partnerem pRB jsou transkripční faktory rodiny E2F, v níž členy E2F-1, E2F-2 a E2F-3 fungují jako transkripční aktivátory, proteiny E2F-4 a E2F-5 jako transkripční represory, které se vážou k proteinům p130 a p107. E2F funguje jako spouštěč S fáze buněčného cyklu, váže se do určitých míst promotoru, dále se podílí na buněčných aktivitách, jako je například indukce apoptózy. Vazbou proteinu E7 na pRB dochází k narušení komplexu mezi pRB a E2F, čímž dojde ke konstitutivní expresi genů, pro které komplex E2F-pRB funguje jako transkripční represor, čímž dochází k nekontrolovanému navození S-fáze buněčného cyklu (Dyson et al., 1992).

K degradaci pRB dochází ubiquitinační cestou, a to jak za přítomnosti E7, tak i v neinfikovaných buňkách, což značí, že tento způsob regulace pRB je v buňce přirozený, a protein E7 tento mechanismus pouze podporuje (Boyer et al., 1996). Degradace pRB v buňce je časnou záležitostí a probíhá velmi krátce po expresi E7 (Berezutskaya et al., 1997).

Vazba mezi pRB a E7 není prokázána pouze u HR HPV, ale i u E7 LR HPV, kde je však tato vazba daleko slabší, což souvisí s rozdílnými klinickými projevy HR a LR HPV. I u papilomavirů rodu beta byla popsána slabá vazba u HPV-10 a HPV-20, kdežto u HPV-38 a HPV-49 je síla vazby srovnatelná s HPV-16 z rodu alfa. Na rozdíl od HPV z rodu alfa HPV-38 a HPV-49 nezpůsobují degradaci pRB, avšak pouze jeho akumulaci (Cornet et al., 2012).

3. 3.2. Protein E7 a interakce s p21

Dalším proteinem, který je ovlivněn proteinem E7 je p21, patřící do rodiny inhibitorů cyklin dependentních kináz (CDK). E7 je schopen C koncem vázat C konec a blokovat přirozenou funkci p21 v komplexu cyklinu E/CDK/p21. E7 nevyvazuje p21 z komplexu, ale

asociuje s celým tímto komplexem skrze p21, čímž kompetuje o vazbu s přirozeným partnerem komplexu, což je PCNA (z angl. proliferative cell nuclear antigen, jaderný antigen proliferujících buněk). PCNA se pak může vázat na DNA a vzhledem k vysoké koncentraci komplexu cyklin/CDK spouštět replikaci DNA (Funk et al., 1997). U testů prováděných na myších bylo dokázáno, že pokud E7 nemá schopnost inaktivovat p21, procento myší s karcinomem děložního hrdla je signifikantně nižší, což naznačuje význam inaktivace p21 pro vznik karcinomu. Další z možností, jak udržet vysokou hladinu CDK je vazba k p27, který má stejnou funkci jako p21 (Zerfass-Thome et al., 1996).

3.3.3 Vazba proteinu E7 k histon deacetylázám

Protein E7 se dále váže k histon deacetylázám (HDAC1 a HDAC2) pomocí své domény tzv. zinc finger (zinkový prst). Vazba mezi HDAC a E7 není přímá, vyžaduje přítomnost proteinu MI2 β , který funguje jako spojka mezi HDAC a E7. Celý tento komplex působí pozitivně na buněčný růst (Brehm et al., 1999), vazebné místo HDAC pro E7 je navíc důležité pro udržení a stabilitu episomů HPV v hostitelských keratinocytech (Longworth and Laimins, 2004).

3.3.4. Chromozomová nestabilita indukovaná proteinem E7

HPV je schopen indukovat nestabilitu chromozomů, a to především ovlivněním tvorby mitotického aparátu. U preinvasivních i invazivních genitálních lézí exprimujících proteiny E6 a E7 HR HPV byly prokázány defektní centrozomy. Ukázalo se, že problémy s počtem centrozomů jsou spojené s expresí onkoproteinu E7, (nikoliv E6) který způsobuje duplikaci centrozomů, což následně vede k nestabilitě jejich chromosomů (Duensing et al., 2000).

3.3.5. Modlace imunitní odpovědi proteinem E7

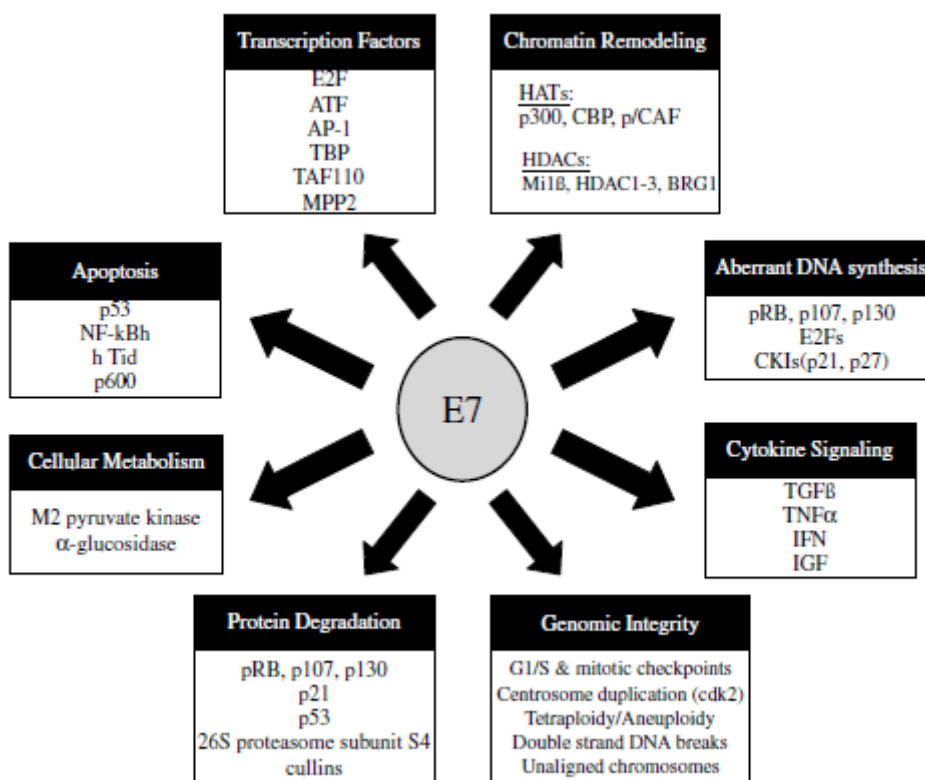
Stejně jako protein E6 i E7 svou pRB-vazebnou doménou se v buňce váže k IRF-1. Jedná se o transkripční faktor promotoru pro interferon β (IFN- β). Přímá vazba ruší transaktivaci IRF-1 a probíhá i u LR HPV, což poukazuje na fakt, že schopnost úniku hostitelskému imunitnímu systému se uplatňuje i u typů HPV způsobujících benigní nádory. Dále bylo prokázáno, že protein E7 dokáže snižovat hodnoty TAP-1, IFN- β , MCP-1, což jsou další důležité proteiny účastníci se protivirové obrany (Um et al., 2002).

S protivirovou obranou také souvisí signalizační dráha spojená s IFN- α , která je v buňkách exprimujících E7 narušena. E7 inhibuje vazbou k proteinu p48, jedné

z podjednotek důležitého trimerního komplexu ISGF3, jeho funkci a vede k narušení celé interferonové kaskády (Barnard and McMillan, 1999; Barnard et al., 2000).

3.3.6. Zabránění apoptóze indukované E7

Protein E7 interferuje se signalizací indukovanou NF- κ B tím, že též umlčuje jeho transkripci. Důvodem, proč k umlčení dochází, může být únik před imunitním systémem hostitele. Mechanismus však není ještě přesně znám. U HPV-38 rodu beta bylo potvrzeno, že umlčuje transkripci NF- κ B (Byg et al., 2012).



Obr. 3.2: Buněční partneři a funkce proteinu E7. Schématické zobrazení, převzato (Münger et al., 2007).

4. Genetické predispozice pro infekci virem HPV

Epidemiologické studie ukazují, že existuje i jistá míra genetické predispozice pro infekci virem HPV a jeho eliminaci a perzistenci. Jedinci, trpící fokální epiteliální hyperplázií (FEH, Heckova choroba), vykazují abnormální predispozici k nákaze HPV-13 a HPV-32 z rodu alfa (Beaudenon et al., 1987; Pfister et al., 1983). Klinickým projevem jsou shluky papilomů, které se mohou spontánně odhojit, avšak nezdědka dochází k projevům rezistence

vůči léčbě. Nověji se FEH také řadí mezi oportunistické projevy spojené s nákazou virem HIV (z angl. human immunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiency) (Moerman et al., 2001).

Dalším onemocněním spojeným s vyšší pravděpodobností manifestace infekce je vážná kombinovaná imunodeficiency (SCID, z angl. severe combined immunodeficiency). Onemocnění se projevuje snížením hladiny T a B lymfocytů a NK buněk v těle. Vyléčení je možné díky transplantaci hematopoetických kmenových buněk. U těchto pacientů se v řádu několika let po transplantaci objevují často onemocnění vyvolaná kožními typy HPV, které způsobují podobné bradavice jako HPV-beta u pacientů s EV (Gaspar et al., 2004).

Neméně závažným onemocněním je tzv. WHIM syndrom, (akronym z anglických slov wart/bradavice, hypogammaglobulinemia, infection/infekce, myelokathexis) který se projevuje nedostatkem leukocytů a protilátek, zároveň zvýšenou susceptibilitou k virovým a bakteriálním nákazám. U těchto pacientů vznikají bradavice, kondylomata, léze cervixu a vulvy. Senzitivita k tvorbě bradavic vzniká mutací genu pro chemokinové receptory, což vede k syntéze defektního proteinu (Hernandez et al., 2003) a následně k jeho nekontrolované aktivaci (Balabanian et al., 2005). V obou předešlých případech jsou pacienti imunosuprimovaní. U těchto pacientů dochází k častější infekci virem HPV a výskytu onemocnění asociovanými s HPV.

Ve vzorcích pacientů, u nichž dojde k maligní transformaci lézí z autozomálně recesivního onemocnění, je také častěji prokazována přítomnost kožních typů HPV, a to především HPV-5 a HPV-8 (Orth, 1986; Orth et al., 1978). Maligní transformace je multifaktoriální proces, pro vznik malignit vyvolaných alfa-PV jsou rizikovými faktory jednak přítomnost vysoce onkogenních typů HPV-16 a -18, ale i asociace s hostitelskými genetickými faktory, které ovlivňují rozvoj nemoci. U karcinomů kůže, spojených s beta-PV je situace složitější, neboť se malignity vyskytují pouze u pacientů s EV nebo imunosuprimovaných jedinců, zároveň jsou důležitým rizikovým faktorem i vnější vlivy, jako je UV záření. V průběhu studia onemocnění EV byly objeveny geny EVER1 a EVER2, které jsou narušeny u pacientů s tímto onemocněním. Jedná se o integrální membránové proteiny exprimované v různých tělních buňkách. Produkty těchto genů interagují se zinkovým transportérem (ZnT-1), který je odpovědný za zinkový eflux a rezistenci k zinkové toxicitě (Palmiter and Findley, 1995). Vazba těchto dvou komponent je tedy v normálních buňkách důležitá k zajištění homeostázy zinku, ale i k regulaci jeho vnitrobuněčného transportu. Další funkcí komplexu EVER/ZnT-1 je regulace transkripce buněčných transkripčních faktorů,

příčemž nejdůležitější je AP-1. I když mechanismus nebyl dosud plně objasněný, soudí se, že souvisí s hladinou volného zinku. Snížením hladiny AP-1 v buňce dochází k posílení genové exprese viru a perzistence virového genomu v keratinocytech. Důsledkem narušení homeostázy zinku, je i snížení schopnosti imunitního systému rozpoznat přítomnost viru (Lazarczyk et al., 2008), neboť nedostatek zinku působí negativně na vznik lymfocytů (Cook-Mills and Fraker, 1993) a interleukinů 4 a 5 (Shi et al., 1998).

5. Molekulární mechanismy kancerogeneze vyvolané HPV z rodu alfa a beta

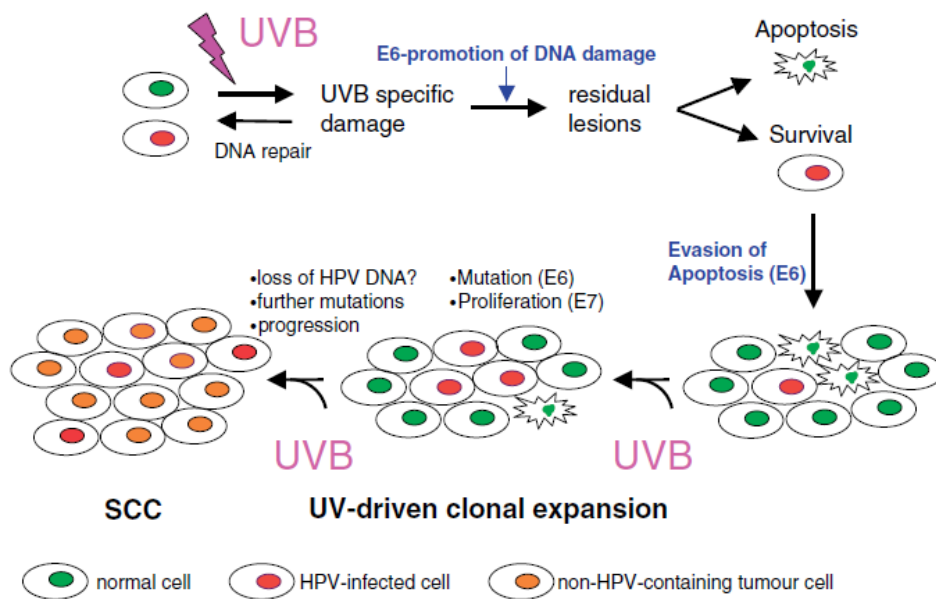
Při integraci DNA HR HPV z rodu alfa DNA do genomu hostitele již není životní cyklus HPV produktivní. Tento jev je prvním krokem při indukci maligní transformace (Pirisi et al., 1987). Frekvence integrace genomu HPV vzrůstá společně s progresí intraepiteliálních neoplázií. K integraci dochází z hlediska genomu hostitelské buňky náhodně, z hlediska virového genomu dochází k integraci v místě ORF časných proteinů E1 a E2. E2 protein je inhibítoem transkripce E6 a E7 virových onkogenů, a proto se jeho přerušení integrací projeví zvýšenou expresí produktů těchto genů (von Knebel Doeberitz et al., 1991; Ziegert et al., 2003).

Součinností virových onkoproteinů E5, E6 a E7 dochází k deregulaci buněčného cyklu hostitelské buňky. Proteiny E6 a E7 mají klíčovou roli v indukci maligní transformace (von Knebel Doeberitz et al., 1988). Váží spoustu buněčných proteinů, přičemž nejdůležitější je vazba a indukce degradace p53 virovým proteinem E6 a vazba a degradace pRB virovým proteinem E7 (Dyson et al., 1989; Werness et al., 1990). Vazby mezi onkoproteiny a jejich partnery vede k deregulaci buněčného cyklu a indukci a akumulaci mutací v hostitelské DNA.

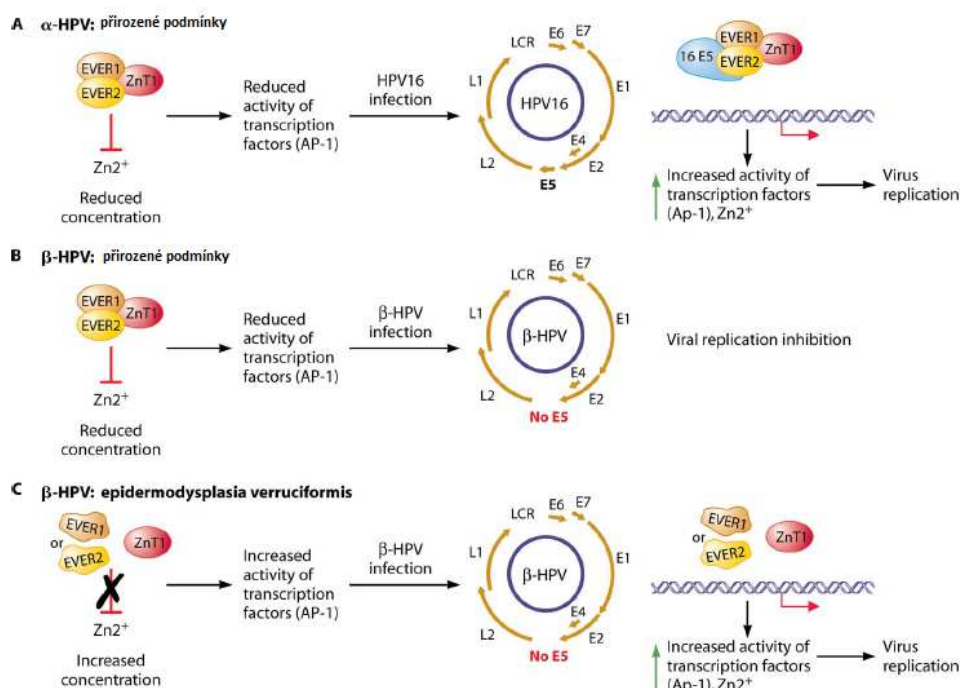
HPV z rodu beta se v mnohém liší od HPV z rodu alfa. Důležitým rozdílem je neschopnost integrace virového genomu beta-PV do genomu hostitele. Dále neobsahují ORF pro protein E5, nenavádí p53 k ubiquitinilaci (Li and Coffino, 1996). Protein E7 HPV-38 z rodu beta je schopen vazby a akumulace pRB (Cornet et al., 2012). Transformace indukovaná beta-PV vyžaduje přítomnost UV záření (Pfefferle et al., 2008). UV-B záření je schopno vyvolat poškození buněčné DNA. Protein E6 beta-PV je schopen vazby

antiapoptoticého proteinu Bak, který je po expozici UV záření veden k degradaci (Underbrink et al., 2008) (Obrázek 5.1).

Hlavním rozdílem v genomu alfa-HPV a beta-HPV je přítomnost ORF pro protein E5. Bylo prokázáno, že protein E5 je schopen vázat se na EVER proteiny a ZnT-1, což má za následek neschopnost komplexu EVER/ZnT-1 inhibovat funkci transkripčního faktoru MTF-1 (z angl. metal regulatory transcriptional factor, regulační transkripční faktor kovů) (Lazarczyk et al., 2008), který indukuje syntézu metalothioneinů, jež v buňkách váží ionty kovů a nastolují jejich homeostázu (Heuchel et al., 1994). Dále komplex inhibuje funkci transkripčního faktoru AP-1, což vede k podpoře replikace virového genomu. Narušení homeostázy zinku se zdá pro HPV klíčové. Papilomaviry z rodu alfa tohoto dosahují narušením funkce proteinů EVER v komplexu se ZnT-1, kdežto HPV z rodu beta využívají dědičného poškození genů *EVER* pro aktivaci transkripce, kterou si v důsledku absence proteinu E5 nejsou schopny jinak zajistit (Lazarczyk et al., 2009) (Obrázek 5.2).



Obr. 5.1: Model vlivu UV záření a HPV infekce na vývoj rakoviny kůže. HPV infekce funguje jako prvotní faktor pro rozvoj rakoviny, v kombinaci s UV zářením v místech exponovaných sluncem. Ozáření UV paprsky vede k poškození DNA v buňkách pokožky. V buňkách napadených HPV, E6 podporuje zachování buňky s poškozenou DNA a chrání buňku před apoptózou. Neinfikované buňky podléhají po poškození DNA apoptóze. Tak se s časem zvyšuje pravděpodobnost selekce maligního klonu. Převzato a modifikováno (Akgul et al., 2006).



Obr. 5.2.: Navrhovaný model indukce virové replikace u HPV rodu alfa a beta. (A) V normálních keratinocytech je aktivace AP-1 rodiny transkripčních faktorů blokována EVER1/EVER2/ZnT-1 komplexem. Keratinocyty infikované virem HPV-16 exprimují protein E5, který po vazbě na komplex EVER/ZnT-1 umožní expresi transkripčních faktorů nutných pro replikaci virového a buněčného genomu. (B) Nepřítomnost proteinu E5 v buňkách infikovaných HPV rodu beta neumožňuje vegetativní replikaci viru. (C) U pacientů s EV jsou prokazovány mutace v genech *EVER*, které brání vytvoření komplexu EVER/ZnT-1. Je tady stimulován transkripční faktor, který umožní replikaci buněčného genomu, ale i replikaci přítomných virů rodu beta. Převzato a modifikováno (Lazarczyk et al., 2009).

6. Závěr

Historicky lze říci, že se výzkum HPV soustředil po mnoho let především na HR HPV z rodu alfa, neboť tyto papilomaviry způsobují karcinom hrdla děložního. Na tuto nemoc jen v ČR ročně umírá zhruba 400 žen, celosvětově je toto nádorové onemocnění v incidenci na druhém místě a umírá na něj okolo 270 000 žen ročně (Arbyn et al., 2011). Od první izolace viru HPV-16 z karcinomu hrdla děložního v roce 1983 uběhlo pouhých 23 let, než byly na trh v roce 2006 a 2007 uvedeny profylaktické vakcíny. Jejich klinické zkoušky a dnes již i výsledky získané v populacích plošně očkovaných těmito vakcínami, ukazují jejich bezpečnost, imunogenitu a vysokou účinnost v zabránění vyvolání onemocnění asociovaných s vakcinálními typy HPV. Tato ochrana přetrvává minimálně deset let. Výzkum papilomavirů rodu beta se zintenzivnil teprve nedávno. Vylepšují se detekční techniky umožňující záchyt širokého spektra kožních typů HPV i serologické metody zaměřené na zjištění prevalence protilátek specifických především pro beta-HPV. Vylepšují se tedy naše vědomosti o jejich

epidemiologii. Zkoumá se onkogenicita typů beta-HPV a případná asociace s maligní transformací kožních lezí EV pacientů a asociace s NMSC. Je snaha objasnit mechanismy, jakými tyto viry k malignizaci přispívají. Dá se očekávat, že i mezi beta-HPV typy bude nalezeno více těch s onkogením potenciálem. Otázce papilomavirů se věnuje celosvětově mnoho laboratoří, proto se očekává celkem rychlý postup ve výzkumu a nalezení odpovědí na dosud nevyřešené otázky.

7. Použitá literatura

- Accardi, R., Dong, W., Smet, A., Cui, R., Hautefeuille, A., Gabet, A.S., Sylla, B.S., Gissmann, L., Hainaut, P., and Tommasino, M. (2006). Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO* 7, 334-340.
- Adam, J.L., Briggs, M.W., and McCance, D.J. (2000). A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H⁺-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology* 272, 315-325.
- Akgul, B., Cooke, J.C., and Storey, A. (2006). HPV-associated skin disease. *J Pathol* 208, 165-175.
- Arbyn, M., Castellsague, X., de Sanjose, S., Bruni, L., Saraiya, M., Bray, F., and Ferlay, J. (2011). Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 22, 2675-2686.
- Ashrafi, G.H., Haghshenas, M.R., Marchetti, B., O'Brien, P.M., and Campo, M.S. (2005). E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA. *Int J Cancer* 113, 276-283.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., *et al.* (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105, 2449-2457.
- Barnard, P., and McMillan, N.A. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259, 305-313.
- Barnard, P., Payne, E., and McMillan, N.A. (2000). The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology* 277, 411-419.
- Beaudenon, S., Praetorius, F., Kremsdorf, D., Lutzner, M., Worsaae, N., Pehau-Arnaudet, G., and Orth, G. (1987). A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol* 88, 130-135.
- Bedard, K.M., Underbrink, M.P., Howie, H.L., and Galloway, D.A. (2008). The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol* 82, 3894-3902.

Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (1997). Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 8, 1277-1286.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo j* 3, 1151-1157.

Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4624.

Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18, 2449-2458.

Brimer, N., Lyons, C., and Vande Pol, S.B. (2007). Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein. *Virology* 358, 303-310.

Byg, L.M., Vidlund, J., Vasiljevic, N., Clausen, D., Forslund, O., and Norrild, B. (2012). NF-kappaB signalling is attenuated by the E7 protein from cutaneous human papillomaviruses. *Virus Res* 169, 48-53.

Caldeira, S., Zehbe, I., Accardi, R., Malanchi, I., Dong, W., Giarre, M., de Villiers, E.M., Filotico, R., Boukamp, P., and Tommasino, M. (2003). The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 77, 2195-2206.

Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9, 2335-2349.

Clifford, G.M., Smith, J.S., Plummer, M., Munoz, N., and Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73.

Conrad, M., Bubb, V.J., and Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67, 6170-6178.

Cook-Mills, J.M., and Fraker, P.J. (1993). Functional capacity of the residual lymphocytes from zinc-deficient adult mice. *Br J Nutr* 69, 835-848.

Cornet, I., Bouvard, V., Campo, M.S., Thomas, M., Banks, L., Gissmann, L., Lamartine, J., Sylla, B.S., Accardi, R., and Tommasino, M. (2012). Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J Virol* 86, 2366-2370.

Crusius, K., Auvinen, E., and Alonso, A. (1997). Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15, 1437-1444.

Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A. (2000). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* 20, 65-69.

de Villiers, E.M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*.

de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.

Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers* 23, 297-313.

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.

Duensing, S., Lee, L.Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C.P., and Munger, K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10002-10007.

Duerksen-Hughes, P.J., Yang, J., and Schwartz, S.B. (1999). HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology* 264, 55-65.

Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3812-3815.

Dyson, N., Guida, P., Munger, K., and Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 66, 6893-6902.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.

Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., and Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* 21, 1205-1209.

Fehrmann, F., Klumpp, D.J., and Laimins, L.A. (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 77, 2819-2831.

Filippova, M., Parkhurst, L., and Duerksen-Hughes, P.J. (2004). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279, 25729-25744.

Forslund, O., Iftner, T., Andersson, K., Lindelof, B., Hradil, E., Nordin, P., Stenquist, B., Kirnbauer, R., Dillner, J., and de Villiers, E.M. (2007). Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* 196, 876-883.

Frattoni, M.G., and Laimins, L.A. (1994). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204, 799-804.

Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11, 2090-2100.

Gaspar, H.B., Harwood, C., Leigh, I., and Thrasher, A.J. (2004). Severe cutaneous papillomavirus disease after haematopoietic stem-cell transplantation in patients with severe combined immunodeficiency. *Br J Haematol* 127, 232-233.

Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., and Galloway, D.A. (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18, 2269-2282.

Giuliano, A.R., Lu, B., Nielson, C.M., Flores, R., Papenfuss, M.R., Lee, J.H., Abrahamsen, M., and Harris, R.B. (2008). Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis* 198, 827-835.

Hasan, U.A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T. (2007). TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 178, 3186-3197.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8, 3905-3910.

Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70-74.

Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., and Schaffner, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo j* 13, 2870-2875.

Horn, S., Pfister, H., and Fuchs, P.G. (1993). Constitutive transcriptional activator of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8. *Virology* 196, 674-681.

Hwang, E.S., Nottoli, T., and Dimaio, D. (1995). The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 211, 227-233.

Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14, 3065-3073.

Kabsch, K., and Alonso, A. (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated. *J Virol* 76, 12162-12172.

Katzenellenbogen, R.A., Egelkrout, E.M., Vliet-Gregg, P., Gewin, L.C., Gafken, P.R., and Galloway, D.A. (2007). NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol* 81, 3786-3796.

Kessis, T.D., Slebos, R.J., Nelson, W.G., Kastan, M.B., Plunkett, B.S., Han, S.M., Lorincz, A.T., Hedrick, L., and Cho, K.R. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3988-3992.

Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.

Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., and Ishibashi, M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11612-11616.

Klingelutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.

Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K., and Kanda, T. (1998). Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 258-262.

Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L.M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G.F., Wazer, D.E. (2002). Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22, 5801-5812.

Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., and Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 348-370.

Lazarczyk, M., Pons, C., Mendoza, J.A., Cassonnet, P., Jacob, Y., and Favre, M. (2008). Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J Exp Med* 205, 35-42.

Li, X., and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 70, 4509-4516.

Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004). The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78, 3533-3541.

Majewski, S., and Jablonska, S. (1997). Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* 36, 659-685.

Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., and Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033-8039.

Matlashewski, G., Schneider, J., Banks, L., Jones, N., Murray, A., and Crawford, L. (1987). Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming. *Embo j* 6, 1741-1746.

May, M., Grassmann, K., Pfister, H., and Fuchs, P.G. (1994). Transcriptional silencer of the human papillomavirus type 8 late promoter interacts alternatively with the viral trans activator E2 or with a cellular factor. *J Virol* 68, 3612-3619.

Moerman, M., Danielides, V.G., Nousia, C.S., Van Wanseele, F., Forsyth, R., and Vermeersch, H. (2001). Recurrent focal epithelial hyperplasia due to HPV13 in an HIV-positive patient. *Dermatology* 203, 339-341.

Molano, M., Van den Brule, A., Plummer, M., Weiderpass, E., Posso, H., Arslan, A., Meijer, C.J., Munoz, N., and Franceschi, S. (2003). Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 158, 486-494.

Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., and 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, 4417-4421.

Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, C.J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527.

Münger, K., Howley, P., and DiMaio, D. (2007). *The Papillomaviruses*. Springer Science + Business Media LLC, 205-208.

Nakagawa, S., and Huibregtse, J.M. (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20, 8244-8253.

Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E., and Lambert, P.F. (2003). The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77, 6957-6964.

O'Brien, V., and Campo, M.S. (1998). BPV-4 E8 transforms NIH3T3 cells, up-regulates cyclin A and cyclin A-associated kinase activity and de-regulates expression of the cdk inhibitor p27Kip1. *Oncogene* 17, 293-301.

Oh, S.T., Kyo, S., and Laimins, L.A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* 75, 5559-5566.

Olson, C., Jr., and Cook, R.H. (1951). Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* 77, 281-284.

Orth, G. (1986). Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found Symp* 120, 157-174.

Orth, G. (2006). Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol* 18, 362-374.

Orth, G., Jablonska, S., Favre, M., Croissant, O., Jarzabek-Chorzelska, M., and Rzeska, G. (1978). Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1537-1541.

Palmiter, R.D., and Findley, S.D. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo j* 14, 639-649.

Pan, H., and Griep, A.E. (1995). Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* 9, 2157-2169.

Pfefferle, R., Marcuzzi, G.P., Akgul, B., Kasper, H.U., Schulze, F., Haase, I., Wickenhauser, C., and Pfister, H. (2008). The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol* 128, 2310-2315.

Pfister, H., Hettich, I., Runne, U., Gissmann, L., and Chliff, G.N. (1983). Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47, 363-366.

Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 61, 1061-1066.

Purdie, K.J., Suretheran, T., Sterling, J.C., Bell, L., McGregor, J.M., Proby, C.M., Harwood, C.A., and Breuer, J. (2005). Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 125, 98-107.

Reh, H., and Pfister, H. (1990). Human papillomavirus type 8 contains cis-active positive and negative transcriptional control sequences. *J Gen Virol* 71, 2457-2462.

Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., and Howley, P.M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12, 2061-2072.

Rous, P., and Beard, J.W. (1935). The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 62, 523-548.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.

Schiller, J.T., Vass, W.C., Vousden, K.H., and Lowy, D.R. (1986). E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* 57, 1-6.

Shi, H.N., Scott, M.E., Stevenson, M.M., and Koski, K.G. (1998). Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection. *J Nutr* 128, 20-27.

Shope, R.E., and Hurst, E.W. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits : with a note on the histopathology. *J Exp Med* 58, 607-624.

Song, S., Gulliver, G.A., and Lambert, P.F. (1998). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2290-2295.

Straight, S.W., Herman, B., and McCance, D.J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 69, 3185-3192.

Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., and 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. *J Virol* 67, 4521-4532.

Thomas, M., and Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17, 2943-2954.

Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2005). E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell* 17, 251-264.

Tsao, Y.P., Li, L.Y., Tsai, T.C., and Chen, S.L. (1996). Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 70, 7535-7539.

Um, S.J., Rhyu, J.W., Kim, E.J., Jeon, K.C., Hwang, E.S., and Park, J.S. (2002). Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett* 179, 205-212.

Underbrink, M.P., Howie, H.L., Bedard, K.M., Koop, J.I., and Galloway, D.A. (2008). E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol* 82, 10408-10417.

Veldman, T., Liu, X., Yuan, H., and Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8211-8216.

von Knebel Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsch, D., and zur Hausen, H. (1991). Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1411-1415.

von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E., and Gissmann, L. (1988). Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 48, 3780-3786.

Waterson, A.P., and Almeida, J.D. (1969). Virological aspects of neurological disease. *Postgrad Med J* 45, 351-360.

Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.

Winer, R.L., Feng, Q., Hughes, J.P., O'Reilly, S., Kiviat, N.B., and Koutsky, L.A. (2008). Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *J Infect Dis* 197, 279-282.

Winer, R.L., Lee, S.K., Hughes, J.P., Adam, D.E., Kiviat, N.B., and Koutsky, L.A. (2003). Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 157, 218-226.

Xu, M., Luo, W., Elzi, D.J., Grandori, C., and Galloway, D.A. (2008). NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol* 28, 4819-4828.

Yasumoto, S., Burkhardt, A.L., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1986). Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* 57, 572-577.

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W., and Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323-2330.

Zhang, B., Spandau, D.F., and Roman, A. (2002). E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes. *J Virol* 76, 220-231.

Ziegert, C., Wentzensen, N., Vinokurova, S., Kisseljov, F., Eienkel, J., Hoeckel, M., and von Knebel Doeberitz, M. (2003). A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 22, 3977-3984.

Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., and O'Connor, M.J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 73, 6209-6219.
Viral Particle Explorer 2 [online]. 2013 [cit. 2013-08-20]. Dostupné z http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=110t.