

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Barbora Pokrývková

Methylace regulačních oblastí HPV 16 u tonsilárních karcinomů s integrovanou a extrachromozomální formou viru

Methylation of the regulatory sequences of integrated and extrachromosomal form of HPV 16 in tonsillar tumors

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2016

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, 29. 08. 2016

Podpis

Poděkování:

Děkuji své školitelce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a laskavost během tvorby mé diplomové práce, také za možnost studovat tak zajímavé téma. Dále bych chtěla poděkovat zejména RNDr. Martině Salákové, Ph.D. za neocenitelnou metodickou pomoc, poté Mgr. Zuzaně Vojtěchové a RNDr. Janě Šmahelové za technickou asistenci, Mgr. Haně Hájkové, Ph.D. a Mgr. Jitce Veselé za asistenci při sekvenování nové generace a v neposlední řadě celému kolektivu NRL pro papillomaviry a polyomaviry za zaškolení v laboratorních metodách.

Abstrakt

Lidské papilomaviry jsou spojeny s indukcí karcinomu hrdla děložního a řadou dalších karcinomů v anogenitální oblasti a také s významnou částí nádorů hlavy a krku. Přítomnost virových onkoproteinů E6 a E7 může v buňce navodit transformovaný stav, jejich zvýšená hladina je způsobena inaktivací regulačního proteinu E2. Předmětem současného studia jsou mechanismy, kterými je inaktivace E2 způsobena. Jednou z možností je integrace virové DNA do genomu hostitele, ke které dochází v oblasti genu *E2*. Byly však nalezeny karcinomy, kde se virus nachází v extrachromozomální formě. Ukazuje se, že při vzniku tohoto typu nádorů mohou hrát roli epigenetické změny, zejména DNA metylace, či mutace v regulační oblasti viru. Byla provedena analýza stupně metylace u vzorků tonsilárních karcinomů s extrachromozomální a integrovanou formou viru, dále v obou skupinách porovnána virová nálož a potvrzena exprese *E6* a *E7* genu. Výsledky metylační analýzy ukazují zvýšenou metylaci viru s integrovanou DNA, avšak pro některé oblasti nejsou signifikantní. Mutace ve vazebných místech E2 proteinu jsme neodhalili. Exprese virových onkogenů byla potvrzena u všech nádorů bez ohledu na formu virového genomu. Mechanismus indukce nádorů, zejména pro virus s extrachromozomální formou viru, zůstává předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova

Nádory hlavy a krku, tonsilární karcinom, HPV, lidský papilomavirus, DNA metylace, virová nálož, karcinogeneze, E2 vazebná místa.

Abstract

Human papillomavirus is connected with induction of cervical carcinoma as well as for some other anogenital carcinomas and subset of carcinomas of head and neck. Presence of viral E6 and E7 oncoproteins may induce cell transformation, higher load of oncoproteins is caused by the regulatory E2 protein inactivation. Aims of recent study are mechanisms of E2 protein inactivation. One option is integration of viral DNA into the host genome, which is located into the *E2* gene region. Some carcinomas, where virus with extrachromosomal form was presented, were found. It appears that epigenetic changes can play the role in the development of this type of tumors, especially DNA methylation or mutation in the regulatory region of the virus. The methylation degree analysis on samples of tonsillar carcinomas with extrachromosomal and integrated form of the virus was conducted, as well as viral load of both groups was compared and the expression of E6 and E7 gene was confirmed. The results of methylation analysis showed increased methylation of the virus with integrated DNA. Mutations in the E2 protein binding sites are not revealed. The expression of the viral oncogenes were confirmed in all tumors regardless of the form of the viral genome. The mechanism of tumors induction, especially for virus with extrachromosomal form of the virus, remains a subject for further research.

Key words

Head and neck cancer, tonsillar carcinoma, HPV, human papillomavirus, DNA methylation, viral load, carcinogenesis, E2 binding sites.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 9 |
| 2. Cíle práce | 11 |
| 3. Přehled literatury..... | 12 |
| 3.1. Nádory hlavy a krku..... | 12 |
| 3.2. Lidské papilomaviry..... | 15 |
| 3.2.1. Klasifikace..... | 16 |
| 3.2.2. Struktura virionu | 17 |
| 3.2.3. Životní cyklus a patogeneze..... | 17 |
| 3.3. Role HPV v indukci nádorů | 18 |
| 3.3.1. Role virových onkoproteinů..... | 18 |
| 3.3.2. Integrace viru | 21 |
| 3.3.3. Virová nálož..... | 23 |
| 3.3.4. Mutace virové DNA..... | 25 |
| 3.3.5. Epigenetické modifikace..... | 27 |
| 4. Materiál a metody | 31 |
| 4.1. Vzorke pacientů | 31 |
| 4.2. Určení statusu virové DNA..... | 31 |
| 4.3. Detekce mutací v LCR HPV 16 izolátů | 36 |
| 4.3.1. Amplifikace úseku LCR HPV 16..... | 36 |
| 4.3.2. Sekvence PCR produktu..... | 37 |
| 4.3.3. Analýza výsledků..... | 37 |
| 4.4. Hladina metylace E2 vazebných míst HPV 16 izolátů..... | 38 |
| 4.4.1. Bisulfidické ošetření DNA..... | 38 |
| 4.4.2. Příprava knihoven pro sekvenování nové generace | 39 |
| 4.4.3. První amplifikační reakce | 42 |
| 4.4.4. Druhá amplifikační reakce | 43 |
| 4.4.5. Pročištění a kvantifikace | 44 |
| 4.4.6. Emulzní PCR..... | 47 |
| 4.4.7. Pyrosekvenování | 49 |
| 4.4.8. Vyhodnocení výsledků..... | 51 |
| 4.5. Určení virové nálože ve vzorcích ORL..... | 52 |
| 4.5.1. Příprava standardních křivek pro kvantifikaci | 52 |
| 4.5.2. Kvantitativní PCR ORL vzorků | 53 |
| 4.5.3. Detekce E6 a E7 | 53 |

| | |
|--|----|
| 4.5.4. Vyhodnocení výsledků | 54 |
| 4.6. Kvantifikace hladiny exprese E6 a E7 ve vzorcích | 55 |
| 4.6.1. Příprava cDNA | 55 |
| 4.6.2. Optimalizace kvantitativní PCR | 57 |
| 5. Výsledky | 58 |
| 5.1. Určení statusu virové DNA | 58 |
| 5.2. Detekce mutací v LCR HPV 16 izolátů..... | 59 |
| 5.3. Určení stupně metylace E2BS ve vzorcích..... | 65 |
| 5.3.1. Optimalizace PCR E2 vazebných míst LCR | 65 |
| 5.3.2. Příprava knihoven pro NGS sekvenování..... | 68 |
| 5.3.3. Stupeň metylace ve vzorcích s integrovanou a extrachromozomální formou viru... 71 | |
| 5.4. Kvantifikace virové nálože v nádorech | 75 |
| 5.4.1. Příprava standardních křivek | 75 |
| 5.4.2. Určení virové nálože ve vzorcích ORL | 76 |
| 5.4.3. Detekce exprese <i>E6</i> a <i>E7</i> genu..... | 79 |
| 5.5. Stanovení hladiny exprese <i>E6</i> a <i>E7</i> ve vzorcích..... | 80 |
| 5.5.1. Příprava cDNA | 80 |
| 5.5.2. Optimalizace kvantitativní PCR | 81 |
| 6. Diskuze | 83 |
| 7. Souhrn..... | 91 |
| 8. Seznam literatury | 92 |

Seznam zkratek

| | | |
|-------------------|--|---|
| ALDH1A2 | anti-aldehyde dehydrogenase 2 | anti-aldehyd dehydrogenáza 2 |
| AP1 | activator protein 1 | aktivátorový protein 1 |
| APOT | amplification of papillomavirus oncogene transcripts | amplifikace transkriptů virových onkogenů |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool | základní místní srovnávací vyhledávač |
| bp | base pairs | páry bazí |
| CCNA1 | cyclin A1 | cyklin A1 |
| CDK4/6 | cyclin dependent kinase 4/6 | cyklin dependentní kináza 4/6 |
| CDKN2A | cyclin dependent kinase inhibitor 2A | inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A |
| CpG | 5'-cytosine-phosphate-guanine-3' | 5'-cytosin-fosfát-guanin-3' |
| C _t | cycle of threshold | cyklus prahové hodnoty |
| dH ₂ O | distilled water | destilovaná voda |
| Dmt1 | DNA methyltransferase 1 | DNA metyltransferáza 1 |
| E1 – E7 | early protein 1 – 7 | časný protein 1 – 7 |
| E2BS | E2 binding site | vazebné místo proteinu E2 |
| E2F | E2 factor | faktor E2 |
| E6AP | E6 adaptor protein | adaptorový protein E6 |
| emPCR | emulsion PCR | emulzní PCR |
| EtOH | ethanol | etanol |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| GATA4 | sequence (A/T)GATA(A/G) | gen obsahující sekvenci (A/T)GATA(A/G) |
| GRIA4 | glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4 | glutamátový ionotropní receptor typu AMPA podjednotka 4 |
| HNC | head and neck cancer | nádor hlavy a krku |
| HNSCC | head and neck squamous cell carcinoma | dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku |
| HPV | human papillomavirus | lidský papilomavirus |
| L1, L2 | late 1, 2 | pozdní protein 1, 2 |
| LCR | long control region | dlouhá kontrolní oblast |
| MID | multiple identifier | násobný identifikátor |

| | | |
|---------------|---|--|
| Myc | myelocytomatosis | myelocytomatosis |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information | Národní centrum biotechnologických informací |
| NF1 | neurofibromatosis type 1 | neurofibromatóza typ 1 |
| NGS | next generation sequencing | sekvenování nové generace |
| OR | overall survival | celkové přežití |
| ORF | open reading frame | otevřený čtecí rámec |
| ORL | otorhinolaryngology | otorhinolaryngologie |
| OSR2 | odd-skipped-related 2 | lichý-vynechaný-související 2 |
| p14ARF | protein 14 alternate reading frame | alternativní čtecí rámec proteinu 14 |
| p16 | protein 16 | protein 16 |
| p300 | protein 300 | protein velikosti 300 kDa |
| p53 | protein 53 | protein velikosti 53 kDa |
| p97 | promotor 97 | promotor 97 |
| PCR | polymerase chain reaction | polymerázová řetězová reakce |
| PPiáza/PPiase | peptidyl-prolyl isomerase | peptidyl-prolyl izomeráza |
| pRb | protein retinoblastoma | retinoblastomový protein |
| QUMA | quantification tool for methylation analysis | program pro kvantifikační analýzu metylace |
| RLB | reverse line blot assay | zpětná sloupcová hybridizace |
| RT-qPCR | reverse transcription quantitative PCR | kvantitativní PCR s produktem reverzní transkripce |
| SP1 | specifity protein 1 | protein specifity 1 |
| SSC | saline sodium citrate | sůl citrát sodný |
| TBE | Tris - borate - EDTA | Tris - borát - EDTA |
| TE | Tris - EDTA | Tris - EDTA |
| Tef | thyrotroph embryonic factor | tyrotropní embryonický faktor |
| TP63 | transformation-related protein 63 | s transformací spojený protein 63 |
| YY1 | Yin Yang 1 | Yin Yang 1 |

1. Úvod

Papilomaviry jsou již dlouhou dobu známy jako původce verukózních onemocnění u lidí a zvířat. V druhé polovině minulého století začaly být papilomaviry extenzivně zkoumány jako možný biologický karcinogen, indukující nádory u zvířat a později i u lidí. Nyní je známo, že lidský papilomavirus (HPV, human papillomavirus) je spojen s indukcí karcinomů hrdla děložního, některých dalších nádorů anogenitální oblasti mužů a žen a části nádorů hlavy a krku.

HPV ale není jediným rizikovým faktorem vzniku výše zmíněných karcinomů, v oblasti hlavy a krku mezi nejdůležitější patří kouření a konzumace alkoholu. Prognóza pacientů s HPV pozitivními a negativními nádory hlavy a krku se liší. Celosvětově je každý rok diagnostikováno asi 500 000 karcinomů hrdla děložního a více než 650 000 karcinomů hlavy a krku (Gupta *et al.*, 2016). Na trhu jsou dnes dostupné tři profylaktické vakcíny proti nejčastějším typům HPV, ale snižování incidence karcinomů ve vakcinované populaci je pomalý proces, a proto je mortalita v důsledku HPV indukovaných nádorů stále vysoká. V naší laboratoři se již tradičně zabýváme molekulární epidemiologií HPV asociovaných onemocnění a charakterizací virů na molekulární úrovni, v posledních letech se pak především zaměřujeme na nádory hlavy a krku. Přes intenzivní výzkum posledních let nejsou přesné mechanismy karcinogeneze indukované HPV doposud plně známy. Virus kóduje 3 onkoproteiny (E5, E6, E7), jejichž exprese v buňkách hostitele může navodit buněčnou transformaci. Dále je virus schopen integrovat svůj genom do genomu hostitele, což může zvýšit hladinu exprese virových onkoproteinů. Studium integrace viru se v poslední době zabývala také naše laboratoř. Současný výzkum ale ukazuje, že virová integrace není nezbytným a jediným mechanismem indukce karcinogeneze HPV. Také epigenetické modifikace, zejména metylace virové DNA, hrají významnou roli ve virovém životním cyklu. Při objasňování mechanismů indukce neoplázií mnohé studie zohledňují status virové DNA, virus s extrachromozomální či integrovanou formou virové DNA vykazuje rozdílné charakteristiky. Karcinogeneze indukovaná HPV je tedy komplexní děj, který ještě není do detailu objasněn.

V mé práci jsem se zaměřila především na analýzu modifikace vazebných míst pro regulační protein E2 (E2BS, E2 binding sites). Tento protein má, mimo jiné funkce, represivní vliv na expresi virových onkoproteinů. Předchozí studie ukázaly, že modifikace E2BS zabraňuje represivní funkci proteinu E2 a tím napomáhá karcinogenezi, zejména

v případě nádorů s extrachromozomální formou viru. Ve své práci jsem tedy studovala mutace v LCR (long control region, dlouhá kontrolní oblast) a stupeň metylace E2BS.

2. Cíle práce

Tato práce se snaží potvrdit či vyvrátit hypotézu, jež zní: „Methylace CpG (5'-cytosine-phosphate-guanine-3', 5'-cytosin-fosfát-guanin-3') dinukleotidů E2 vazebných míst regulační oblasti HPV 16 funguje jako alternativní mechanismus pro inhibici represivní funkce proteinu E2, což stejně jako v případě integrace viru v místě genu *E2* též vede ke zvýšené expresi proteinů E6 a E7.“

Dílčí cíle práce jsou tedy následující:

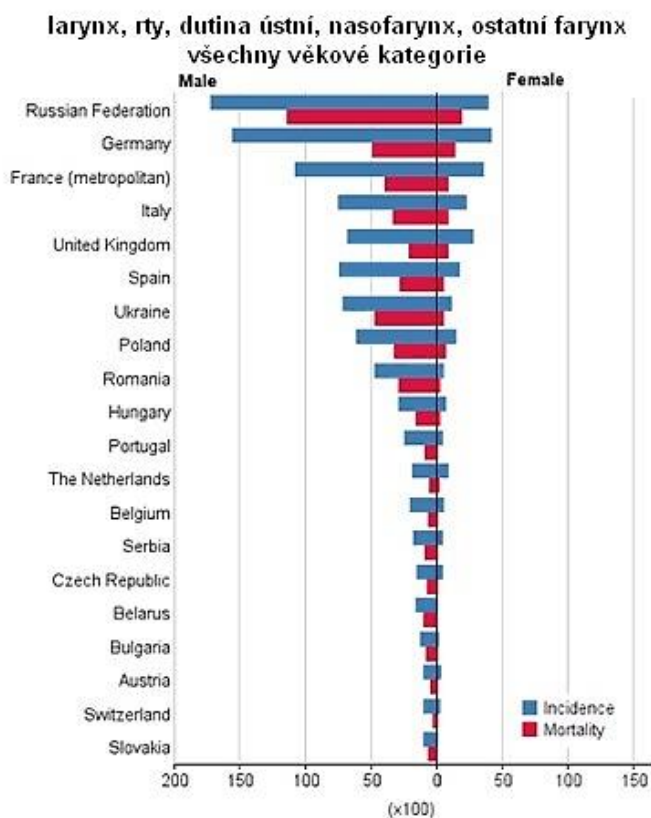
1. Sekvenovat regulační oblast HPV za účelem identifikace a charakterizace mutací, které by mohly znemožňovat vazbu E2 proteinu do této oblasti.
2. Určit stupeň methylace všech E2BS ve vzorcích s integrovanou a extrachromozomální formou virové DNA.
3. Stanovit virovou nálož u vzorků s integrovanou a extrachromozomální formou virové DNA.
4. Stanovit, zda u všech vzorků dochází k expresi *E6* a *E7* genů a případně zjistit hladinu exprese těchto genů ve vzorcích s integrovanou a extrachromozomální formou virové DNA.

3. Přehled literatury

3.1. Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) vznikají transformací dlaždicového epitelu dutiny ústní, orofaryngu, hypofaryngu a laryngu. Jako rizikové faktory, které mohou vyvolat rozvoj onemocnění, jsou uváděny kouření, konzumace alkoholu a infekce lidským papilomavirem.

Každoročně je zaznamenáno přes 650 000 nových případů nádorů hlavy a krku (Gupta *et al.*, 2016) (obrázek č. 1), přičemž množství nádorů indukovaných HPV celosvětově narůstá, zatímco množství HPV negativních nádorů klesá (Gillison *et al.*, 2015). Například v Německu byl během let 1990 – 1999 HPV detekován asi u 37 % karcinomů, kdežto během následujících desíti let byl zaznamenán nárůst až na 63 % (Holzinger *et al.*, 2012).



Obr. č. 1: Incidence a mortalita nádorů hlavy a krku ve 20 zemích Evropy. Graf byl vygenerován databází Globocan s daty k roku 2012. Převzato a upraveno podle databáze Globocan (http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_sex_site_sel.aspx).

V Belgii byl mezi lety 2004 – 2012 zaznamenán nárůst z 13 % na 38 % (Grisar *et al.*, 2016). V České republice bylo mezi lety 2001 – 2007 detekováno 65 % HPV pozitivních karcinomů tonsil (Rotnaglova *et al.*, 2011). Epidemiologové usuzují, že důvodem je mírný pokles užívání tabákových výrobků a také měnící se sexuální chování populace (Castellsague *et al.*, 2016).

Na rozdíl od cervikálních karcinomů, kde je téměř sto procent nádorů přičítáno infekci vysoce rizikovými typy HPV, v nádorech hlavy a krku (HNC, head and neck cancer) jsou HPV detekovány pouze u 25 % případů onemocnění. Nejčastěji je virus detekován v karcinomech orofaryngu, a to v oblasti tonsil, dále v oblasti faryngu, nasofaryngu, dutiny ústní, laryngu a hypofaryngu (tabulka č. 1) (Castellsague *et al.*, 2016). Nejčastěji nacházeným typem viru je HPV 16, avšak v malém množství mohou být také detekovány vysoce rizikové typy 18, 26, 33 a 58 (Jung *et al.*, 2010; Koslabova *et al.*, 2013).

Tabulka č. 1: Prevalence HPV DNA v jednotlivých anatomických podoblastech (převzato a upraveno podle Castellsague *et al.*, 2016).

| Prevalence HPV DNA | | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|
| Oblasti a podoblasti | HPV+/ testované vzorky | % HPV+ vzorků | Oblasti a podoblasti | HPV+/ testované vzorky | % HPV+ vzorků |
| Dutina ústní | 93/1 264 | 7.40 | Nasofarynx | 8/101 | 7.90 |
| Zubní alveoly | 3/44 | 6.80 | Orofarynx | 271/1 090 | 24.90 |
| Dáseň | 3/40 | 7.50 | Tonzily | 156/332 | 47.00 |
| Tvrdé patro | 4/47 | 8.50 | Tři záhyby orofaryngu | 2/11 | 18.20 |
| Spodina ústní | 9/193 | 4.70 | Kořen jazyka | 17/92 | 18.50 |
| Neurčená oblast dutiny ústní | 3/68 | 4.40 | Neurčená oblast orofaryngu | 72/402 | 17.90 |
| Bukální sliznice | 4/169 | 2.40 | Měkké patro | 15/108 | 13.90 |
| Gingivobukální řasa | 2/8 | 25.00 | Jamka orofaryngu | 3/38 | 7.90 |
| Rty | 3/42 | 7.10 | Glosotonzilární rýha | 4/48 | 8.30 |
| Neurčená oblast patra | 3/21 | 14.30 | Přední oblouk orofaryngu | 1/25 | 4.00 |
| Oblast stoliček | 2/15 | 13.30 | Zadní stěna orofaryngu | 1/25 | 4.00 |
| Neurčená oblast jazyka | 57/562 | 10.10 | Larynx | 56/1 042 | 5.70 |
| Hypofarynx | 5/127 | 3.90 | Jamka Epiglottis | 1/8 | 12.50 |
| Hypofarynx / Laringofarynx | 4/98 | 4.10 | Supraglottis | 2/44 | 4.50 |
| Recessus pyriformis | 1/29 | 3.40 | Hlasivka | 12/107 | 11.20 |
| Neurčené oblasti laryngu | 12/56 | 21.40 | Hlasivková štěrbina | 1/30 | 3.30 |
| Neurčená oblast faryngu | 10/39 | 25.60 | Neurčená oblast laryngu | 43/800 | 5.40 |
| Neurčená oblast faryng. zdi | 2/17 | 11.80 | | | |

Bylo zjištěno, že pacienti, v jejichž tonsilárních karcinomech byla přítomna virová DNA, jsou častěji lidé mladšího věku, nekuřáci a pouze příležitostní uživatelé alkoholu na rozdíl od pacientů s nádory HPV negativními (Grisar *et al.*, 2016). Tyto výsledky naznačují, že mechanismus indukce neoplázií v oblasti HNC je u karcinomů různé etiologie odlišný.

Přítomnost HPV v HNSCC je důležitým ukazatelem prognózy daného pacienta. Pacienti s HPV pozitivními nádory vykazují lepší hodnotu specifického přežití, než ti, v jejichž nádorech HPV detekována nebyla (Beachler *et al.*, 2012; Koslabova *et al.*, 2013; Rotnaglova *et al.*, 2011). Tato prognostická výhoda platí ale pouze pro pacienty, v jejichž nádorech je detekována jak virová DNA, tak i RNA. Pacienti HPV negativní vykazují přibližně stejné hodnoty přežívání jako pacienti HPV DNA pozitivní/RNA negativní (Jung *et al.*, 2010). Lepší prognóza pacientů s HPV pozitivními nádory je vysvětlována vyšší citlivostí HPV pozitivních nádorů vůči radioterapii (Kimple *et al.*, 2013), která může být způsobena odlišnou imunitní odpovědí u HPV pozitivních a negativních pacientů (Spanos *et al.*, 2009). V HPV pozitivních vzorcích HNC byla detekována zvýšená hladina tumor infiltrujících T-lymfocytů (Partlova *et al.*, 2015), jejich vysoká hladina v periferní krvi pozitivně koreluje s lepším přežíváním oproti pacientům HPV negativním či HPV pozitivním, u kterých vysoká hladina těchto lymfocytů nebyla detekována (Lukesova *et al.*, 2014).

HPV pozitivní nádory bývají méně diferencované a ve srovnání s HPV negativními nádory mají sklon k dřívějšímu rozvoji metastáz. Na druhé straně u pacientů s HPV negativními nádory je vyšší pravděpodobnost opakovaného rozvoje onemocnění a doba mezi vyléčením a následným novým onemocněním je zde kratší než u HPV pozitivních pacientů (Hafkamp *et al.*, 2008).

Kouření je, vedle HPV positivity, nejdůležitějším rizikovým faktorem vzniku orofaryngeálních karcinomů a zhoršuje průběh onemocnění. Se zvyšující se frekvencí a délkou kouření roste riziko vzniku onemocnění bez ohledu na pohlaví či věk pacienta (Toporcov *et al.*, 2015). Práce Berthillera a kol. (2015) ukazuje 1,5 násobné zvýšení rizika onemocnění při vykouření 0 – 3 cigaret denně a více než 2 násobné zvýšení rizika při vykouření 3 – 5 cigaret denně ve srovnání s nekuřáky. Většina pacientů s HPV negativními nádory kouří a jejich prognóza je ve srovnání s HPV pozitivními pacienty horší. U HPV pozitivních pacientů kouření působí jako nezávislý rizikový faktor a dále zhoršuje přežívání i těchto pacientů (Anantharaman *et al.*, 2016).

Konzumace alkoholu je v některých studiích uváděna jako další rizikový faktor, ale jiné studie nenašly statisticky významný rozdíl v riziku vzniku nádorů hlavy a krku a konzumaci alkoholu (Gillison *et al.*, 2015; Gillison *et al.*, 2008; Hashibe *et al.*, 2007). Vyšší riziko rozvoje onemocnění však mají ti, kteří konzumují alkohol s vyšší frekvencí (Hashibe *et al.*, 2007; Toporcov *et al.*, 2015). Nejsilnější asociace mezi rozvojem onemocnění a frekvencí užívání alkoholu byla popsána u osob starších 45 let. Množství užitého alkoholu, které představuje signifikantní riziko vzniku nádorů orofaryngu, je asi 28 g denně, což odpovídá dvěma alkoholickým nápojům (Anantharaman *et al.*, 2016). Podobně jako u kouření i konzumace alkoholu se zdá být významným rizikovým faktorem pouze pro iniciační fázi vzniku HPV negativních nádorů (Gillison *et al.*, 2008). Studie Rotnáglové a kol. (2011) ukázala, že konzumace alkoholu nemá vliv na míru přežití u pacientů s orofaryngeálními nádory.

Dle Gillisonové a kol. (2015) existuje další rizikový faktor pro HPV pozitivní nádory hlavy a krku, a to vyšší počet orálních sexuálních partnerů, který je spojen s vyšší četností nádorů tonzil a báze jazyka.

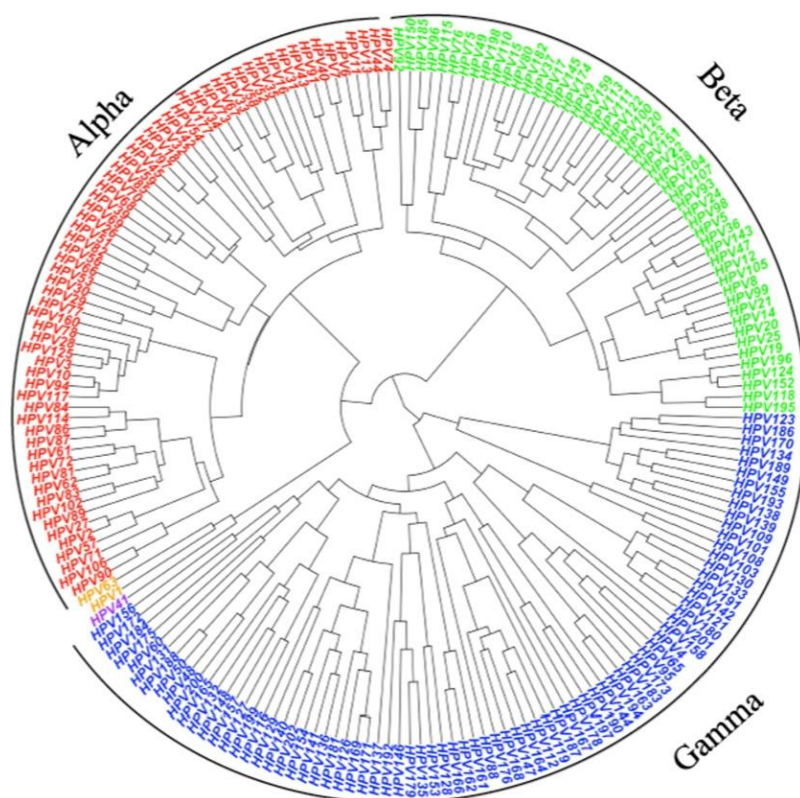
3.2. Lidské papilomaviry

Lidské papilomaviry jsou malé, neobalené DNA viry, které mají onkogenní potenciál. Ve většině případů je infekce HPV asymptomatická a brzy dochází k vyčištění infekce hostitelským imunitním systémem. Virová perzistence zvyšuje pravděpodobnost závažných klinických projevů. Již v roce 1976 profesor Harald zur Hausen publikoval teorii, podle které by lidské papilomaviry mohly být spojeny s indukcí karcinomů v oblasti genitálií (zur Hausen, 1976). V následujících letech byla izolována virová DNA HPV typů 16 a 18 z biopsií cervikálního karcinomu (Boshart *et al.*, 1984; Durst *et al.*, 1983) a později prokázána virová etiologie tohoto onemocnění. V roce 2008 byla profesoru zur Hausenovi za objevení papilomavirů jako příčiny vzniku cervikálních karcinomů udělena Nobelova cena v oblasti fyziologie a medicíny. Další výzkum prokázal přítomnost HPV v jiných anogenitálních oblastech, jako je vulva, vagína, anus a penis, dále ve verukózních karcinomech laryngu (Abramson *et al.*, 1985) a dalších nádorech hlavy a krku. Etiologie HPV byla zkoumána i u karcinomů jiné lokalizace, například prostaty či plic (Hrbacek *et al.*, 2011; Kulski *et al.*, 1990; Tachezy *et al.*, 2012).

3.2.1. Klasifikace

Rodina *Papillomaviridae* čítá celkem 39 druhů (dle databáze International committee on taxonomy of viruses (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>)). Jejich zástupci napadají savce, ptáky a plazy. Klasifikace lidských papilomavirů byla ustanovena na základě podobností sekvencí pro majoritní kapsidový protein L1 (late, pozdní). V dnešní době je známo přibližně 200 typů HPV (Bzhalava *et al.*, 2015), které se rozdělují do pěti rodů: α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus a ν -papillomavirus (de Villiers, 2013) (obrázek č. 2). Každoročně jsou však objeveny nové typy papilomavirů, především díky metagenomickým studiím (Bzhalava *et al.*, 2015).

Podle tkáňové specifity rozdělujeme HPV na kožní a slizniční, přičemž obě skupiny jsou schopny vyvolávat jak benigní, tak maligní léze. Papilomaviry, které vyvolávají benigní léze, se označují jako nízce rizikové, kdežto malignity vyvolávají vysoce rizikové typy papilomavirů. Některé typy HPV není možné dosud jednoznačně označit za nízce či vysoce rizikové.



Obr. č. 2: Taxonomie HPV (převzato a upraveno podle (Bzhalava *et al.*, 2015)).

Nízce rizikové slizniční typy papilomavirů, nejčastěji HPV 6 a 11, mohou indukovat benigní slizniční bradavice, prekancerózy nízkého stupně, rekurentní

respiratorní papilomatózu a papilomatózu hrtanu. Vysoce rizikové slizniční typy, nejčastěji HPV 16, 18, 31, 33 a 45, jsou schopny indukce karcinomů v oblasti anu, cervixu, penisu, vagíny a vulvy a dále v oblasti hlavy a krku, zejména v orofaryngeální oblasti (Durst *et al.*, 1983; Gross *et al.*, 1985).

Prevalence níže rizikových kožních typů papilomavirů je velmi vysoká, avšak infekce je většinou bezpříznaková. V některých případech způsobují benigní kožní bradavice. Některé kožní typy HPV (HPV 5, 8) jsou spojovány s rakovinou kůže, a to u imunosuprimovaných pacientů trpících onemocněním *Epidermodysplasia verruciformis*. V těchto případech mohou léze po expozici UV zářením vyvinout rakovinu kůže (Kremsdorf *et al.*, 1983).

3.2.2. Struktura virionu

Genom HPV tvoří cirkulární dvouřetězcová DNA o velikosti přibližně 7900 párů bází (bp, base pairs), která obsahuje kódující i nekódující sekvence (Danos *et al.*, 1982). Nekódující oblast, značenou LCR, tvoří regulační sekvence a vazebná místa pro transkripční faktory virových genů. Virová DNA kóduje celkem 9 proteinů, sedm nestrukturních a dva kapsidové. Nestrukturní proteiny mají úlohu zejména regulační, exprimují se před replikací virového genomu z jednoho čtecího rámce (ORF, open reading frame). Nastolují výhodné prostředí pro virovou replikaci a úspěšný životní cyklus. Označují se jako E1, E2, E4, E5, E6 a E7 (early, časný) (Danos *et al.*, 1982; Doorbar *et al.*, 1986; Pater & Pater, 1985). Kapsidové proteiny, označované jako L1 a L2 se exprimují z druhého ORF až po skončení virové replikace a podílí se na tvorbě ikosahedrální kapsidy o velikosti přibližně 55 nm (Danos *et al.*, 1982).

3.2.3. Životní cyklus a patogeneze

Místem vstupu HPV do organismu jsou drobná poranění na kůži či sliznici, jimiž se virus dostává do oblasti bazální membrány, kde začíná jeho replikační cyklus. U tonsilárních karcinomů se předpokládá vstup viru skrze epitel tonsilárních krypt (Kim *et al.*, 2007). Během procesu diferenciaci buněk pokožky jsou v první fázi produktivního cyklu postupně exprimovány časně virové proteiny nutné pro replikaci virového genomu. Protein E1 funguje jako virová helikáza (Hughes & Romanos, 1993), E2 funguje jako transkripční faktor pro virové onkogeny E6 a E7 (Phelps & Howley, 1987), E4 je důležitý v pozdní fázi infekce, kdy se účastní úniku nové virové částice z epitelálního povrchu skrze rozrušení cytoskeletu keratinocytů. Proteiny E5, E6 a E7

fungují jako virové onkoproteiny, jejichž činnost vede k buněčné transformaci (Leechanachai *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1989). Tyto onkoproteiny se přímo nepodílejí na replikaci virového genomu, ale plní funkci deregulátorů hostitelského buněčného cyklu. Jsou schopny vázat či inaktivovat některé buněčné proteiny, čímž mohou zabraňovat indukci apoptózy či se vyhýbat účinkům hostitelského imunitního systému.

Později v průběhu diferenciaci epitelálních buněk se exprimují virové kapsidové proteiny. Nová virová částice se uvolňuje do okolí společně s keratinizovanou vrstvou pokožky.

3.3. Role HPV v indukci nádorů

Mechanismy karcinogeneze indukované HPV byly podrobně studovány u pacientek s cervikálním karcinomem. Ukazuje se, že základní principy jsou stejné i u nádorů v oblasti hlavy a krku.

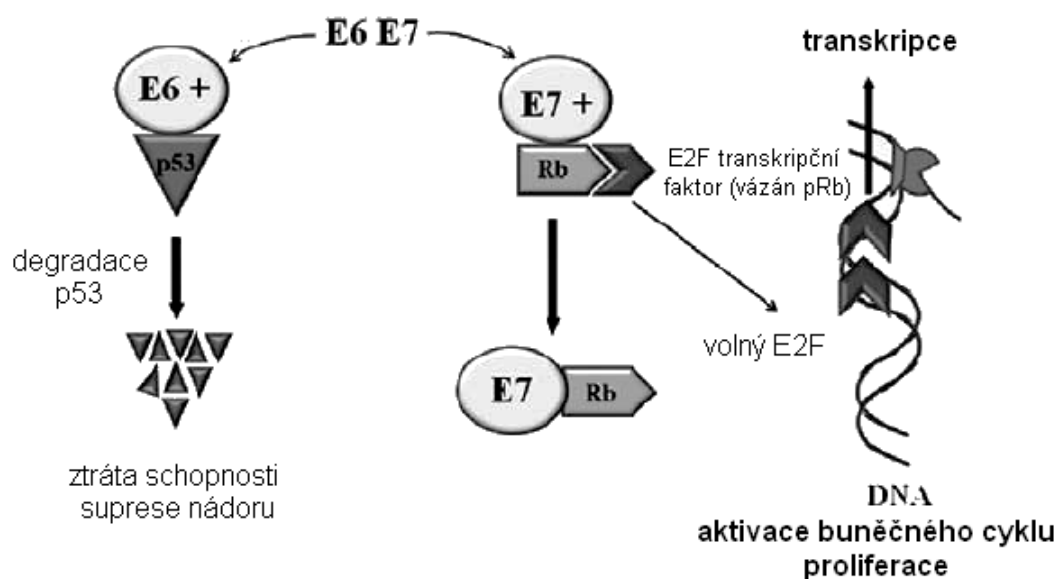
3.3.1. Role virových onkoproteinů

Nezbytným předpokladem HPV indukovaných nádorů je produkce virových onkoproteinů E6 a E7, ty jsou schopny interagovat s mnoha dalšími buněčnými proteiny s různými funkcemi. Virus je tak schopen unikat před hostitelským imunitním systémem, což také může mít vliv na indukci karcinogeneze. Exprese E6 a E7 je *in vitro* dostačující pro buněčnou imortalizaci, ale pro vznik nádoru je nutné, aby došlo k dalším druhotným genetickým změnám (Moody & Laimins, 2010). Činnost virových onkoproteinů byla nejprve podrobně zkoumána u cervikálních karcinomů. Ukázalo se, že v oblasti hlavy a krku mají virové onkoproteiny velmi obdobné funkce (Wilczynski *et al.*, 1998).

Vazbou virového onkoproteinu E6 dochází k degradaci nebo ztrátě funkčnosti nádorového supresorového proteinu p53 o velikosti 53 kDa (protein 53), který je transkripčním faktorem proapoptotických genů či genů zajišťujících opravu DNA. E6 onkoprotein asociuje s E6 adaptorovým proteinem (E6AP), komplex E6-E6AP váže p53 a funguje jako ubiquitin ligáza, p53 je následně polyubiquitinylován a veden k degradaci proteasomem (Scheffner *et al.*, 1993). Protein 53 může být také inaktivován přímou asociací proteinu E6 a proteinu 300 (p300), která brání acetylaci a tím i aktivaci p53 (Thomas & Chiang, 2005). Buněčný cyklus může tedy pokračovat i poté, kdy dojde k mutaci či zlomům hostitelské DNA, neboť je vyřazen první z kontrolních bodů buněčného cyklu. Buňkám je umožněn nekontrolovatelný růst, což je jedním z předpokladů karcinogeneze.

U téměř všech nádorů hlavy a krku, nehledě na mechanismus jejich indukce, dochází k inaktivaci funkce p53 (Balz *et al.*, 2003). HPV negativní nádory hlavy a krku často nesou mutovanou formu p53. Mutace mohou být způsobeny především účinkem kouření (Balz *et al.*, 2003; Gaykalova *et al.*, 2014). Mutovaný p53 není schopen vazby na DNA, tím pádem není schopen aktivovat transkripci proapoptotických genů. Mutace p53 jsou obecně charakteristické pro nádory neasociované s HPV (Balz *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2010), ale i v nádorech HPV DNA pozitivních můžeme mutovaný p53 detekovat (Wiest *et al.*, 2002).

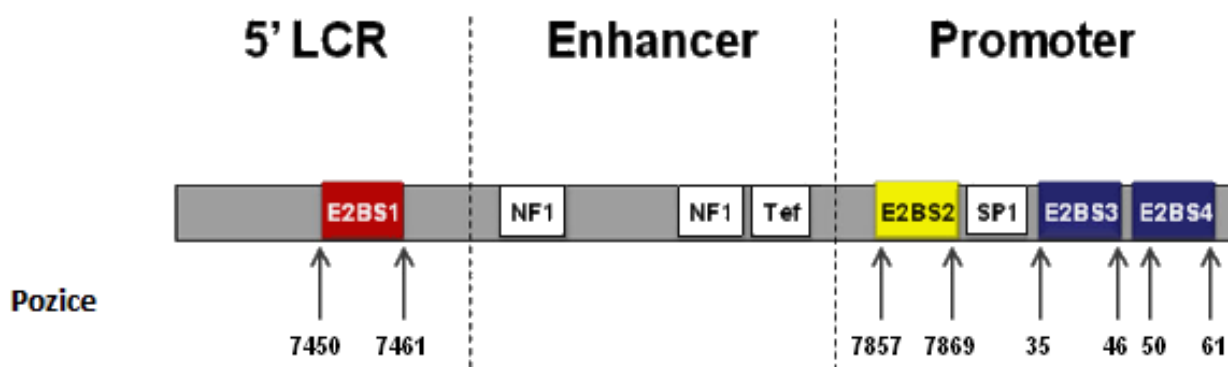
U virového onkoproteinu E7 byla prokázána schopnost vazby a následné degradace retinoblastomového proteinu (pRb, retinoblastoma protein), který se také řadí mezi nádorové supresory (Boyer *et al.*, 1996). Jeho funkcí je kontrolovat přechod buňky do S fáze buněčného cyklu. Za situace, kdy je vstup do S fáze žádoucí, dochází k hyperfosforylaci pRb, tím dochází ke zrušení přirozené vazby mezi pRb a transkripčními faktory rodiny E2F (E2 factor, E2 faktor). Protein E7 vyvazuje hypofosforylovanou formu pRb z komplexu s E2F, dochází tak k nekontrolované indukci transkripce genů pro cyklin E a tím k progresi buněčného cyklu (obrázek č. 3).



Obr. č. 3: Mechanismy působení onkoproteinů na buněčné proteiny. Protein E6 váže a navádí k degradaci tumor supresorový protein 53. Protein E7 vyvazuje hypofosforylovaný tumor supresorový protein Rb. Převzato a upraveno podle Ruttkay-Nedecki a kol. (2013).

Důležitým regulátorem životního cyklu HPV je protein E2, který má schopnost regulovat hladinu virových onkoproteinů E6 a E7 (Dowhanick *et al.*, 1995; Phelps & Howley, 1987). Protein E2 se váže do čtyř oblastí promotoru p97 (p97, promotor 97)

v LCR (obrázek č. 4), tzv. E2 vazebných míst 1, 2, 3 a 4. Do oblasti E2BS1 se protein váže s vysokou afinitou a tím působí jako aktivátor promotoru p97, který spouští transkripci onkogenů *E6*, *E7* a také *E2*. Dochází tak ke zvyšování hladiny proteinů E2, E6 a E7 (Cripe *et al.*, 1987). Vysoká hladina proteinu E2 vede k jeho vazbě i do nízkoafinitních oblastí E2BS3 a E2BS4, čímž dochází k represii p97 a tím i negativní regulaci transkripce *E6* a *E7* (Tan *et al.*, 1992). Takto dochází k udržování hladiny proteinů na úrovni, kterou virus potřebuje pro úspěšné dokončení životního cyklu. Jednou z možností indukce karcinogeneze je ztráta funkce proteinu E2, ke které může docházet několika způsoby. Jednou z možností je virová integrace do hostitelského genomu, ke které dochází často v oblasti *E2* genu (Dowhanick *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 1995; Romanczuk & Howley, 1992). Dalšími jsou genetické či epigenetické modifikace virové DNA, které mohou mít vliv na vazbu E2 do E2BS. Tyto mechanismy budou rozebrány v dalších kapitolách.



Obr. č. 4: Schéma umístění E2BS1 – 4 v oblasti LCR HPV 16 s vyznačením počátečních a koncových nukleotidů. NF1 (neurofibromatosis type 1, neurofibromatóza typ 1), Tef (thyrotroph embryonic factor, tyrotropní embryonický faktor), SP1 (specifity protein 1, protein specifity 1) značí další transkripční faktory vázající se do LCR a ovlivňující aktivitu promotoru p97. Upraveno podle (Chaiwongkot *et al.*, 2013).

3.3.2. Integrace viru

Lidský papilomavirus má podobně jako jiné DNA viry prokazatelnou schopnost integrace virové DNA do hostitelského genomu (Matsukura *et al.*, 1986). U řady cervikálních karcinomů byla virová DNA nalezena v integrované formě, což vedlo k domněnce, že virová integrace je příčinou buněčné transformace. Avšak pozdější studium ukázalo, že mnohé vzorky cervikálních prekanceróz a karcinomů obsahují extrachromozomální nebo extrachromozomální i integrovanou formu virové DNA (Cheung *et al.*, 2013). Studie Vinokurové a kol. (2008) uvádí, že frekvence integrace se zvyšuje se závažností onemocnění a je častější u některých typů HR HPV. Studie De Marco a kol. (2007) ukázala výskyt převážně extrachromozomální formy DNA v cervikálních preneoplastických lézích. Vinokurová a kol. (2008) také uvádí, že většina prekancerózních lézí obsahuje virovou DNA v extrachromozomální formě, kdežto ve vzorcích cervikálních karcinomů je virová DNA z většiny integrovaná. Stejná studie též ukázala, že ve vzorcích cervikálních karcinomů je integrace ve vysoké míře detekována u typu HPV 18, dále u typu 45 a 16, zatímco u nižšího stupně onemocnění typ 18 nebyl nalezen v integrované formě vůbec. Usuzuje se, že k virové integraci do genomu hostitelských buněk dochází v důsledku nestability způsobené činností virových onkoproteinů E6 a E7 (Vinokurova *et al.*, 2008). Zcela recentní práce Schütze a kol. (2016) stanovila rozdíl v *in vitro* onkogenicitě vyvolané E6/E7 onkoproteiny různých HR HPV typů. U buněk immortalizovaných HPV typy s nižší onkogenitou byl nalezen vyšší počet genetických změn v genomu hostitelské buňky. To naznačuje, že postupné nahromadění těchto změn je u méně onkogenních typů nutné k dosažení immortalizovaného stavu buněk. Výsledky Vinokurové a Schütze nabízejí vysvětlení nižšího počtu karcinomů hrdla děložního čípku v populaci, které jsou pozitivní právě na tyto HPV typy.

Řada studií analyzovala frekvenci integrace u nádorů v oblasti hlavy a krku, jejich výsledky se však velmi liší, pravděpodobně v důsledku rozdílných metodických přístupů. Souhrnně se dá říct, že v průměru byla nalezena integrace v 50 % nádorů hlavy a krku, tedy o něco málo méně, než u cervikálního karcinomu. Existují však i studie, kde byla virová DNA nalezena jen ve formě extrachromozomální (Mellin *et al.*, 2002).

Již poměrně dlouhou dobu je známo, že důsledkem integrace cirkulárního virového genomu je časté narušení ORF genu *E2*, čímž dochází ke ztrátě jeho regulační funkce (Dowhanick *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 1995; Romanczuk & Howley, 1992). Jeon a kol. (1995) ve své práci popisuje dva možné typy integrace. V prvním případě dochází

k integraci jedné kopie virové DNA, která je následně amplifikována, ve druhém případě může být integrována konkatemerní forma virové DNA. Recentně bylo zjištěno, že místa integrace jsou cílena téměř do všech virových genů, ale častěji byla lokalizovaná v *E2* ORF. Virové onkogeny *E6* a *E7* však byly vždy přítomné v intaktní formě a byly aktivně přepisované (Akagi *et al.*, 2014). V mnoha studiích se uvádí, že integrace udává buňkám růstovou výhodu oproti buňkám s extrachromozomální formou viru, neboť má za následek zvýšenou hladinu virových onkoproteinů *E6* a *E7* způsobenou disrupcí *E2* genu (Jeon *et al.*, 1995; Snijders *et al.*, 1992). Studie Cheunga a kol. (2013) ale neprokázala vliv fyzického statusu virového genomu na hladinu virových onkoproteinů, stejně jako další studie (Hafner *et al.*, 2008; Olthof *et al.*, 2015). Recentně se objevily práce využívající metody celogenomového sekvenování, komplexního studia transkriptomu a DNA metylačního profilu nádorových buněčných linií a nádorů hlavy a krku. Výsledky těchto studií naznačují, že zvýšení exprese virových onkogenů, ke kterému vede vyřazení *E2* genu výše uvedenými mechanismy, nemusí být jediným mechanismem vedoucím k nádorové transformaci.

Proces integrace HPV do hostitelského genomu se zdá být sice náhodný, nebyly detekovány preferenční lokusy integrace v hostitelském genomu, ale např. ve studii Wentzensena a kol. (2002) provedené na cervikálních karcinomech byla integrace zjištěna především v běžných fragilních oblastech chromozomů. Integrovaná virová DNA byla nalezena na různých hostitelských chromozomech a pravděpodobně, v důsledku náhody, může dojít k integraci v místě či blízkosti důležitých buněčných genů, například tumor supresorů či genů pro signální proteiny (Klimov *et al.*, 2002; Wentzsen *et al.*, 2002). V případě nádorů hlavy a krku byla provedena studie Parfenova a kol. (2014), která analyzovala vzorky HNSCC celogenomovým sekvenováním a zjistila častější integraci v místech či blízkosti hostitelských nádorových supresorových či reparačních genů, které vedou ke ztrátě funkce příslušných proteinů. Recentní další studie žádná dominující integrační místa nenalezla, jen v jednom případě byla integrace detekována v místě transkripčního faktoru *TP63* (transformation-related protein 63, s transformací spojený protein 63) (Vojtechova *et al.*, 2016), dále byly integrace časté v běžných fragilních místech podobně jako u cervikálních karcinomů.

V práci Parfenova a kol. (2014) byl dále dokumentován výskyt změněných transkriptů, amplifikace buněčné DNA kódující virové onkogeny, přerušení nádorových supresorových genů a mezichromozomální přestavby u nádorů s integrovanou formou HPV. Podobné výsledky publikoval i Akagi a kol. (2014), který zkoumal buněčné linie

a omezený počet nádorů hlavy a krku. V této práci ukázali, že k integraci HPV dochází častěji ve specifických oblastech chromozomů v různých buněčných liniích, což má za následek chromozomové přestavby. Parfenov a kol. (2014) ukázali na mnohé chromozomové aberace, ke kterým dochází během procesu imortalizace. Na základě svých výsledků hypotetizují, že k maligní transformaci u nádorů asociovaných s HPV může dojít i v důsledku masivních změn genomu, které se odehrávají velmi rychle. Jedná se o jev označovaný jako chromotripsis a představuje alternativní mechanismus maligní transformace k doposud uvažovanému postupnému hromadění mutací. Schütze a kol. (2016) ve své recentní studii dokumentuje jev chromotripsis u jedné buněčné linie HPV 16 imortalizované onkoproteiny E6/E7. V důsledku tohoto jevu zde došlo k rozsáhlým změnám chromozomu 8 a tím získání virového onkogenu *myc* (myelocytomatosis).

3.3.3. Virová nálož

Virová nálož udává množství virové genetické informace v přítomném vzorku a reflektuje schopnost viru se množit.

Virová nálož roste s věkem pacienta a délkou virové perzistence, při tranzientní infekci je nálož nízká, stejně jako u pacientů mladšího věku (Beachler *et al.*, 2015; Prata *et al.*, 2015). Vysoká virová nálož je detekována především při infekci jedním typem HPV, cervikální léze infikované různými typy HPV obsahují nižší nálož viru. Lillsunde Larssonová a kol. (2014) srovnávala virovou nálož v karcinomech vagíny a vulvy, přičemž vyšší hladinu virové nálože detekovala v oblasti vagíny. Deng a kol. (2013), kteří studovali nádory hlavy a krku, zjistili vyšší virovou nálož u nádorů laryngu ve srovnání s nádory jiné lokalizace.

Vliv hladiny virové nálože byl studován i ve vztahu k závažnosti onemocnění a jeho prognóze. Vysoká virová nálož je detekována v benigních lézích, tyto léze vykazují vysokou infekčnost. V klinické praxi se využívá detekce HPV pro vyhledávání rizikových žen s možnou přítomností neoplázií, používané testy detekují klinicky relevantní virovou nálož.

Práce Suna a kol. (2015) detekovala významně vyšší hladinu virové nálože ve vzorcích cervikálních karcinomů oproti vzorkům prekancerózních lézí. Vysoká virová nálož u žen s normální cervikální cytologií je spojena s vyšším rizikem indukce lézí, podobně pacientky s přítomnými lézemi a vysokou virovou náloží vykazují častější progresi do cervikálních karcinomů (van Duin *et al.*, 2002). Prata a kol. (2015) ve své práci navrhuje, že přítomnost vysoké virové nálože může být prediktivním faktorem vzniku

cervikálních lézí. Studie Dase a kol. (2015) nepotvrdila vliv virové nálože v cervikálních karcinomech na hodnotu přežívání.

Odlišné výsledky byly získány v oblasti hlavy a krku. Pacienti s nádory tonsil, které obsahují vyšší virovou nálož, mají lepší celkové i nemoc-specifické hodnoty přežívání a nižší pravděpodobnost rekurence onemocnění (Cohen *et al.*, 2008). Podobné výsledky publikoval i Mellin a kol. (2002). Pacientky s nízkou hladinou virové nálože vykazují vyšší procento vyčištění infekce v oblasti hlavy a krku (Beachler *et al.*, 2015).

Přítomnost virové DNA nemusí znamenat, že dochází k transkripci virového genomu, avšak vysoká hladina virové RNA, tedy transkripčně aktivního viru, je detekována u nádorů s vyššími hodnotami virové nálože a transkripčně aktivní virus vykazuje silnější asociaci s indukci nádorů (Jung *et al.*, 2010; Weinberger *et al.*, 2006).

Vysoká virová nálož a s tím související vysoká hladina onkoproteinů E6 a E7 způsobuje snížení množství pRb v nádorech hlavy a krku a v důsledku toho zvýšení exprese proteinu p16 (protein 16), který plní funkci supresorového proteinu (Hafkamp *et al.*, 2003; Wiest *et al.*, 2002). Exprese p16 vede k zástavě buněčného cyklu, neboť váže komplex cyklinu D a CDK4/6 (cyclin dependent kinase 4/6, cyklin dependentní kináza 4/6). Nádory, které nejsou asociovány s HPV, nevykazují zvýšenou expresi p16 (Holzinger *et al.*, 2012). Studie Junga a kol. (2010) zjistila 15 násobné zvýšení průměru i mediánu hladiny exprese p16 v nádorech s přítomným transkripčně aktivním virem, kdežto u HPV negativních nádorů či HPV pozitivních/RNA negativních nádorů byl medián exprese p16 nižší než ve zdravé tkáni.

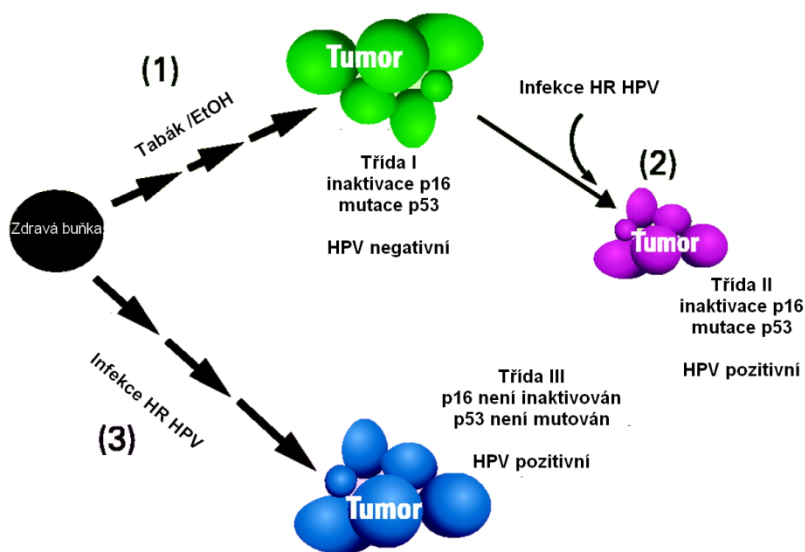
Studie Holzingerové a kol. (2012) ukazuje, že vysoká hladina p16 pozitivně koreluje s hodnotou celkové doby přežití, avšak pouze v kombinaci s vysokou náloží virové RNA, která je dle této studie určující pro předpověď hodnot přežívání (OR, overall survival). Na základě přítomnosti virové DNA a hladiny exprese p16 Weinberger a kol. (2006) navrhli rozdělení pacientů s nádory hlavy a krku do 4 skupin podle přítomnosti virové DNA a hladiny exprese p16 (tabulka č. 2). U nádorů třídy III je detekována vysoká virová nálož a nízká hladina p53 a pRb. Charakteristika těchto nádorů odpovídá HNSCC asociovanými s papilomaviry. Ačkoliv u nádorů zařazených do třídy II byla detekována virová DNA, virová nálož je nízká, virus je transkripčně neaktivní, což nevede ke zvýšení hladiny p16. Tyto nádory jsou svou charakteristikou velmi podobné nádorům třídy I, které nejsou asociovány s HPV. Zde je rizikovým faktorem zejména kouření a užívání alkoholu (Weinberger *et al.*, 2006). Rozdílné mechanismy indukce nádorů hlavy a krku dokumentuje obrázek č. 5.

Práce Huanga a kol. (2014) ukazuje, že zvýšená virová nálož HPV 16 E7 v karcinomech dutiny ústní koreluje s vyšší četností vzdálených metastáz, oproti pacientům s nádory s nízkou virovou náloží nebo HPV negativními.

Studie ukazující vliv statusu virového genomu na množství kopií nejsou jednoznačné. Některé ukazují, že u nádorů s extrachromozomální formou virové DNA je přítomno větší množství kopií virového genomu oproti nádorům s integrovanou virovou DNA (Das *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 1995), zatímco jiné vliv statusu neprokázaly (Cheung *et al.*, 2013; Hafner *et al.*, 2008; Olthof *et al.*, 2015).

Tabulka č. 2: Rozdělení HNSCC podle hladiny p16 a přítomnosti virové DNA. Převzato a upraveno podle (Weinberger *et al.*, 2006).

| | Normální hladina p16 | Zvýšená hladina p16 |
|---------------------|----------------------|---------------------|
| HPV 16 ⁻ | Třída I | Třída IV |
| HPV 16 ⁺ | Třída II | Třída III |



Obr. č. 5: Různé mechanismy indukce HNSCC. HNSCC mohou být indukovány užíváním tabáku a alkoholu, a to díky mutacím p53, p16 a pRb (třída I). Následná infekce HR HPV může mít aditivní vliv na indukci nádorů, není prvotním induktorem neoplázií (třída II). U nádorů indukovaných HR HPV (třída III) nejsou detekovány mutace tumor supresorových genů, virus je schopen bránit jejich funkcím činností svých onkoproteinů. Převzato a upraveno podle (Weinberger *et al.*, 2006).

3.3.4. Mutace virové DNA

HPV 16 se vyskytuje v několika odlišných subtypech a ty se vyznačují odlišnou geografickou distribucí. Tyto subtypy se rozlišují na základě podobností LCR na Evropský, Euroasijský, Africký typu 1 a 2, Americko-Asijský a Severoamerický.

Usuzuje se, že HPV polymorfismy v oblasti LCR mohou ovlivňovat onkogenní potenciál viru. Evropský subtyp HPV 16 nalezený ve vzorcích cervikálních karcinomů vykazoval podle studie Kämmera a kol. (2002) velký polymorfismus v oblasti LCR. Tyto polymorfismy však neměly vliv na aktivitu promotoru p97 ovlivňující transkripci virových onkoproteinů ve srovnání s referenčním subtypem, ani se neprokázal jejich vliv na závažnost onemocnění. Autoři této studie ale ukázali, že naopak přítomnost polymorfismů v oblasti genu *E6* se závažností onemocnění pozitivně koreluje. Ve studii Cheunga a kol. (2013) našli mutace v oblasti LCR HPV 16, nenalezli však rozdíl v distribuci těchto změn v závislosti na fyzickém statusu virové DNA. Jednou z častých mutací virové DNA, která je častá u nádoru cervixu je mutace ve vazebné oblasti pro transkripční faktor Yin Yang 1 (YY1). Tento faktor se váže do těsné blízkosti promotoru p97 regulační oblasti HPV a snižuje jeho aktivitu (Lace *et al.*, 2009b). Mutace vazebných míst YY1 brání represivní funkci proteinu, což vede ke zvýšené transkripční aktivitě p97 a zvýšení množství virových onkoproteinů (Lace *et al.*, 2009a).

Jen málo prací se věnovalo studiu polymorfismů HPV 16 v nádorech hlavy a krku. Studie Dua a kol. (2012) popisuje rozdíly v četnosti známých mutací genu *E6* u cervikálních karcinomů a karcinomů tonsil. Byla nalezena mutace, jež je velmi častá u tonsilárních karcinomů, avšak u karcinomů cervixu se téměř nevyskytuje. Jedná se o záměnu aminokyseliny argininu na glycin v pozici 10. Dále bylo ukázáno, že záměna leucinu na valin v pozici 83 je nejčastější právě u tonsilárních karcinomů. Obě zmíněné mutace však nemají vliv na hodnoty přežívání či závažnost onemocnění.

I když byly identifikovány varianty v oblasti genu *E2*, spíše se ukazuje, že sekvence genu *E2* jsou konzervované a možné varianty náleží transaktivačním či koncovým oblastem (Kahla *et al.*, 2014).

Mutace v sekvenci *E2* vazebných míst, které by mohly být dalším mechanismem vedoucím k narušení funkce proteinu *E2* zábranou jeho vazby, se snažily identifikovat mnohé studie. Mutaci v cervikálních karcinomech, nacházející se v oblasti *E2* vazebných míst v pozici 3684, popisuje práce Kahly a kol. (2014). Tato záměna cytosinu na adenin má za následek změnu kódované aminokyseliny. Dále ve studii Pientonga a kol. (2013) byly v malém množství nalezeny mutace v oblasti *E2BS*, avšak virová DNA v této studii náležela převážně variantě HPV 16 asijského typu. Studie Chaiwongkota a kol. (2013) nenalezla žádné mutace v oblasti *BS* v testovaných vzorcích, identifikovala ale 7 mutací v jiných místech regulační oblasti HPV 16. Ve studii Cheunga a kol. (2013) byly podobně

objevy mutace v oblasti nebo přilehlém okolí transaktivační domény *E2* genu, avšak žádné mutace v oblasti *E2* vazebných míst.

3.3.5. Epigenetické modifikace

Epigenetika se zabývá změnami struktury chromatinu, které ovlivňují genovou expresi a tím ovlivňují fenotyp. Mezi hlavní epigenetické modifikace se řadí metylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinylation a sumoylation histonů a metylace DNA. V současné době se v souvislosti s infekcí HPV studují epigenetické modifikace, zejména metylace DNA (Badal *et al.*, 2003; Bryant *et al.*, 2014b). K metylaci DNA dochází v oblastech CpG dinukleotidů, kdy je pomocí enzymu metyltransferázy metylován cytosin za vzniku 5-methylcytosinu, což vede k inhibici transkripce.

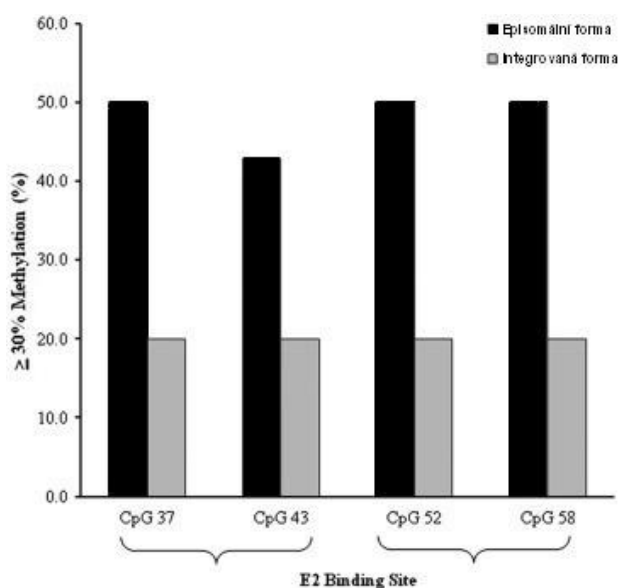
Lidský papilomavirus typu 16 obsahuje 112 CpG dinukleotidů, které jsou nerovnoměrně rozloženy ve virovém genomu. Studie na buněčných liniích odvozených od cervikálních karcinomů (CaSki) ukázaly, že k metylaci nedochází na všech CpG dinukleotidech, ale pouze na některých v různých oblastech virové DNA. Oblast s vysokým stupněm metylace odpovídá oblasti vazby transkripčních aktivátorů AP1 (activator protein 1, aktivátorový protein) a NFI v promotoru p97 (Badal *et al.*, 2003). Studie Parka a kol. (2011) ukázala, že rozmístění metylačního vzoru podél celé virové DNA v HNSCC odpovídá tomu, jež vykazuje buněčná linie SiHa, což je buněčná linie odvozená od cervikálního karcinomu. Přibližně 55 % CpG dinukleotidů není metylováno, především v oblastech *E2*, LCR a *E6*.

Methylace DNA byla navržena jako další mechanismus indukce karcinogeneze HPV. Ukazuje se, že metylace *E2* vazebných míst HPV DNA může ovlivňovat funkci proteinu *E2* (Kim *et al.*, 2003) a tím způsobit zvýšení hladiny virových onkoproteinů *E6* a *E7*. Hypermethylace *E2BS* vede naopak k transkripční represí.

Bylo ukázáno, že pouhá přítomnost metylace virového genomu nemá prognostický význam, důležitá je však kvantita metylovaných CpG v jednotlivých vazebných místech (Cheung *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2015). Stupeň metylace se během virového životního cyklu viru liší, avšak výsledky jsou kontroverzní. Ve studii Kima a kol. (2003) byla detekována zvýšená metylace v oblastech *E2BS* u buněk méně diferenciovaných, naopak hypomethylace u buněk ve vyšším diferenciačním stádiu. Studie Badala a kol. (2003) detekovala zvýšený stupeň metylace v asymptomatických stěrech, velmi zřídka ale v karcinomech, stupeň metylace zde klesal s mírou progresu neoplázií. Studie Bryanta a kol. (2014b) naopak ukazuje, že stupeň metylace *E2BS* u cervikálních karcinomů

postupně vzrůstá s rozvojem onemocnění. Také recentní studie Leunga a kol. (2015) popisuje vysokou metylaci E2BS v cervikálních karcinomech oproti zdravé tkáni či premaligním lézím. Studie Brandsma a kol. (2009) analyzovala virový metylom, nemetylovaná virová DNA byla nalezena ve vzorcích pacientů s negativním cytologickým nálezem, kdežto vysoký stupeň metylace byl nalezen ve vzorcích pacientů pokročilých stádií onemocnění. Studie Parka a kol. (2011) ale ukazuje jiné výsledky. V pokročilých stádiích onemocnění detekoval nízkou hladinu metylace v oblasti E2BS, stejně jako ve zbytku oblasti LCR.

V další studii cervikálních karcinomů byl navíc zohledněn status virové DNA. Vzorky s extrachromozomální formou DNA vykazovaly stejnou hladinu metylace jak v premaligních lézích, tak v invazivních karcinomech. Oblast E2BS2 vykazovala nízkou hladinu metylace bez ohledu na status virového genomu. V oblasti E2BS1, E2BS3 a v oblasti promotoru byla u vzorků s extrachromozomální formou genomu naměřena vyšší hladina metylace u CpG dinukleotidů než u vzorků integrovaných (obrázek č. 6) (Chaiwongkot *et al.*, 2013; Cheung *et al.*, 2013). Naopak, v jiné studii prováděné na vzorcích vulvárních karcinomů, nebyl detekován rozdíl hladiny metylace E2BS u vzorků integrovaných oproti extrachromozomálním (Bryant *et al.*, 2014a).



Obr. č. 6: Srovnání hladiny metylace u vzorků cervikálních karcinomů s integrovanou (šedá) a čisté extrachromozomální formou viru (černá). Převzato a upraveno podle studie Cheunga a kol. (2013).

V nádorech oblasti hlavy a krku byly také zkoumány hladiny metylace v E2BS. Vysoká hladina metylace v oblasti E2BS3 a E2BS4 byla ve studii Reuschenbachové a kol.

(2015) spojena s častou integrací oproti vzorkům s nízkou hladinou metylace. V oblasti E2BS2 byla v HNSCC detekována velmi nízká hladina metylace, v oblastech E2BS1, 3 a 4 naopak hladina vysoká, podobně jako u vzorků cervikálních karcinomů (Zhang *et al.*, 2015).

Stupeň metylace může být ovlivněn i počtem integrovaných kopií ve vzorku. Vzorky s malým počtem integrovaných kopií (1-2 kopie/buňka) nevykazovaly metylace v regulačních oblastech, kdežto ve vzorcích s mnoha kopiemi integrovaného genomu byla detekována vysoká hladina metylace (Chaiwongkot *et al.*, 2013). Methylace má obvykle negativní vliv na transkripci buněčných genů. Studie Vinokurové a kol. (2011) ale ukazuje, že vysoká metylace v oblasti E2BS1 vede naopak k posílení transkripce z promotoru p97 a tím ke zvyšování hladiny virových onkoproteinů. Methylace v oblastech E2BS3 a 4 zase může zabránit vazbě E2 do těchto míst a tím i jeho represivní funkci (Chaiwongkot *et al.*, 2013). Skutečnost, že vyšší hladina metylace byla detekována u extrachromozomálních vzorků může vysvětlit vysokou hladinu E6 a E7 onkoproteinů i za přítomnosti intaktního proteinu E2. Reuschenbachová a kol. (2015) ukazují zvýšenou hladinu exprese E6 a E7 mRNA v HNSCC ve vzorcích s vysokou (>80 %) hladinou metylace oblasti E2BS4 oproti těm s hladinou nízkou (<20 %). Vliv metylace E2BS HNSCC na hladinu onkoproteinů potvrzuje i práce Zhanga a kol. (2015).

Další oblast, která se zkoumá v souvislosti s metylací je oblast pozdních genů, L1 a L2. Wilson a kol. (2013) analyzovali virový metylom a ukázali, že hladina metylace je zvýšená právě na hranici L1/L2 oblasti, v 16 bp dlouhé oblasti obsahující 4 CpG. V těchto místech se nachází vazebná místa pro transkripční faktory E2F 1 a E2F 6, podílejících se na regulaci buněčného cyklu. Hladina metylace v oblasti L1/L2 vzrůstá s vyšším stádiem onemocnění a je také ovlivněna přítomností virové DNA v integrovaném stavu. Stupeň metylace zde však nemá vliv na hladinu exprese virových onkoproteinů (Bryant *et al.*, 2014a).

Methylace DNA je studována nejen u virového genomu, ale zkoumá se i její vliv na expresi různých buněčných genů, například nádorových supresorů, v souvislosti s HPV infekcí. Studie Schlechta a kol. (2015) našla zvýšený stupeň metylace genu *CDKN2A* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A) ve vzorcích HPV pozitivních orofaryngeálních karcinomů ve srovnání se vzorky negativními. Produkty tohoto genu, p16 či p14ARF (protein 14 alternate reading frame, alternativní čtecí rámec proteinu 14), jsou nádorovými supresory. Dalším buněčným genem, jehož exprese je ovlivněna metylací, je *cyklin A1* (*CCNA1*, *cyclin A1*). Promotor tohoto genu je metylován

v HPV pozitivní linii SiHa působením onkoproteinu E7, přičemž zvýšená metylace reprimuje expresi *CCNA1*. Protein E7 interaguje s proteinem Dmt1 (DNA methyltransferase 1, DNA metyltransferáza 1), který se účastní udržování hladiny metylace DNA, tento komplex může zvyšovat hladinu metylace promotoru *CCNA1* (Chalertpet *et al.*, 2015). Změněný stupeň metylace byl detekován také v genech pro proteiny účastnících se buněčné adheze a transportu kationtů (Wilson *et al.*, 2013). Podle další studie hypometylace promotorů genů pro nádorové supresory *ALDH1A2* (anti-aldehyde dehydrogenase 2, anti-aldehyd dehydrogenáza 2), *OSR2* (odd-skipped-related 2, lichý-vynechaný-související 2) a hypermetylace promotorů *GATA4* (sekvence (A/T)GATA(A/T)), *GRIA4* (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4, glutamátový ionotropní receptor typu AMPA podjednotka 4) pozitivně koreluje s přežíváním pacientů s nádory orofaryngu asociovaných s HPV 16 (Kostareli *et al.*, 2013).

4. Materiál a metody

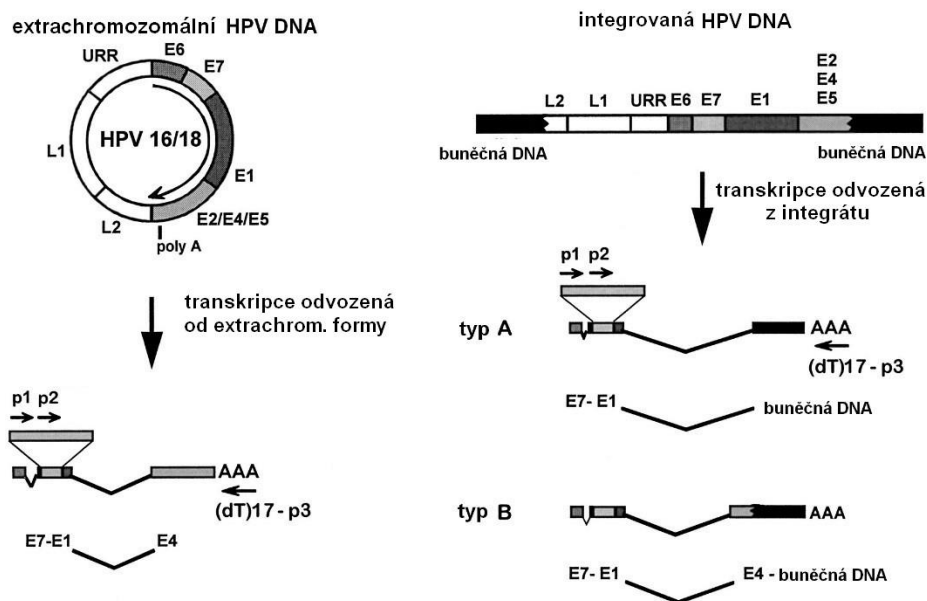
4.1. Vzorčky pacientů

Vzorčky byly získány od pacientů s primárním dlaždicobuněčným karcinomem patrových tonzil léčených na Klinice otorinolaryngologie (ORL, otorhinolaryngology) a chirurgie hlavy a krku 1. LF Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole během let 2001-2014. Do studie byli zařazeni pouze pacienti, kteří podepsali informovaný souhlas. Pacienti byli léčeni chirurgickým odstraněním nádorů následovaným radioterapií. Vzorčky tkáně tonsilárních karcinomů (N=18) byly patologem fixovány v mrazícím médiu a poté zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C. Vzorčky (mimo ORL 137, ORL 243, ORL 244, ORL 257, ORL 265, ORL 280) byly poprvé použity ve studii Vojtěchové a kol. (2016), ve které byla sledována integrace virové DNA do hostitelského genomu. Moje práce uvedenou studii doplňuje. Izolace virové nukleové kyseliny (DNA i celkové RNA) byla provedena Mgr. Vojtěchovou na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Izolace DNA byla provedena QIAamp DNA Mini kitem (Qiagen, Německo) a celková RNA byla izolována miRVana kitem (Life Technologies, USA) podle firemního protokolu. Koncentrace vyizolované DNA a RNA byla zjištěna spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Detekce a HPV typizace byla provedena pomocí metody RLB (reverse line blot assay, zpětná hybridizace produktů amplifikace na membránu) dle publikovaného protokolu (Tachezy *et al.*, 2013). Všechny vzorky byly určeny jako HPV 16 DNA pozitivní (Vojtechova *et al.*, 2016). Do doby další analýzy byla DNA uchovávána v mrazničce při teplotě -20 °C, RNA při teplotě -80 °C.

4.2. Určení statusu virové DNA

Určení virového statusu bylo provedeno na základě metody APOT (amplification of papilloma virus oncogene transcripts, amplifikace transkriptů onkogenů papilomaviru). U vzorků ORL 137, ORL 243, ORL 244, ORL 257, ORL 265, ORL 280 jsem provedla vyšetření metodou APOT osobně, u zbývajících vzorků provedla tuto analýzu Mgr. Vojtěchová. Metoda APOT se skládá z reverzní transkripce celkové mRNA, dvou polymerázových řetězových reakcí (PCR, polymerase chain reaction) s primery specifickými pro oblast časného genu *E7* HPV 16 a oligo(dT) primerem s navázaným adaptorem následovaných sekvenováním (Klaes *et al.*, 1999). Velikost transkriptu z extrachromozomální formy HPV 16 je přibližně 1050 bp, fúzní transkripty jiné velikosti

lze pokládat za integrované (obrázek č. 7). Pro ověření a identifikaci přesných integračních míst jsou produkty vyříznuty z gelu a sekvenovány (Klaes *et al.*, 1999).



Obr. č. 7: Znázornění HPV DNA ve formě integrované a extrachromozomální s odvozenými transkripty. Transkripce odvozenou z integrované formy virové DNA mohou vznikat dva typy transkriptů, v obou případech však na HPV DNA navazuje část buněčné DNA. Obrázek převzat a upraven podle Klaes a kol. (1999)

Sekvence použitých primerů pro amplifikační a sekvenační reakce byly navrženy podle práce Klaese a kol. (1999) a jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Sekvence primerů použitých pro reverzní transkripci, první a druhé PCR metody APOT. Všechny sekvence podle Klaese a kol. (1999).

| Název primeru | Sekvence 5'-3' |
|---------------|--------------------------------------|
| (dT)17-p3 | GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT |
| P3 | GACTCGAGTCGACATCG |
| P1for16 | CGGACAGAGCCATTACAAT |
| P2for16 | CCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACG |

Pro reverzní transkripci jsem použila 1,1 µg RNA a doplnila do 11 µl H₂O prosté RNáz. Množství RNA a vody u jednotlivých vzorků znázorňuje tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Vstupní množství RNA ORL vzorků a vody prosté RNáz pro reverzní transkripci metody APOT. K+ - pozitivní kontrola, K- - negativní kontrola.

| Vzorek | Koncentrace RNA (ng/μl) | Množství RNA (μl) | H ₂ O prostá RNáz (μl) |
|----------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| ORL 137 | 970,55 | 1,13 | 9,87 |
| ORL 257 | 436,85 | 2,52 | 8,48 |
| ORL 265 | 2288,72 | 0,48 | 10,52 |
| ORL 243 | 2455,09 | 0,45 | 10,55 |
| ORL 244 | 1113,84 | 0,99 | 10,01 |
| ORL 280 | 416,19 | 2,64 | 8,36 |
| K+ SiHa | 313,30 | 3,51 | 7,49 |
| K- (H₂O) | - | - | 11,00 |

Vzorky ORL s RNáz-prostou vodou jsem inkubovala 10 min při 70 °C, poté ihned přesunula na led a zde chladila po dobu 5 min. Směs pro reverzní transkripci o objemu 9 μl sestávala ze 2,22× ředěného pufru M-MLV (Promega, USA), 1,11mM směsi nukleotidů (Promega, USA), 1,11μM primeru (dT)17-P3 (Klaes *et al.*, 1999), 0,22 U inhibitoru ribonukleázy RNasinu (Promega, USA), 50 U M-MLV reverzní transkriptázy (Promega, USA) a 2,25 μl vody prosté RNáz. Směs jsem řádně promíchala a přidala k 11 μl vzorku. Jako pozitivní kontrola sloužila RNA izolovaná z buněčné linie SiHa, což je linie odvozená z cervikálního karcinomu obsahující 1 až 2 kopie HPV 16 na buňku. Jako negativní kontrolu jsem použila destilovanou vodu namísto templátové RNA. Takto připravené reakce o celkovém objemu 20 μl jsem inkubovala po dobu 1 h při 37 °C a následně inaktivovala při 90 °C po dobu 5 min v termobloku Techne Dri-Block DB-2D (Bibby Scientific Limited, UK). Získaná cDNA byla použita pro PCR.

Reakční směs pro první PCR se skládala z 1× ředěného pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM směsi nukleotidů (Promega, USA), 1,5mM roztoku MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,25μM primeru P1for16, 0,25μM primeru P3 (oba podle Klaese a kol. (1999)), 1,5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 35,7 μl destilované sterilní vody (dH₂O, distilled H₂O) a 4 μl templátové cDNA. Jako negativní kontrolu jsem použila destilovanou vodu namísto templátové cDNA, jako pozitivní kontrolu cDNA linie SiHa. Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) za následujících podmínek: iniciační fáze denaturace probíhala při 94 °C po dobu 3 min, dále následovalo 29 cyklů skládajících se ze 40 s denaturace při 94 °C, 30 s nasedání primerů při 59 °C a 4 min prodlužování řetězce při 72 °C. Závěrečná fáze extenze trvala 7 min při 72 °C.

Reakční směs pro druhou PCR byla, až na použité primery, totožná s reakcí první. V této reakci jsem použila 0,25 μ M primer P2for16 a 0,25 μ M primer (dT)17-P3 (oba podle Klaese a kol. (1999)), do reakce jsem jako templát přidala 4 μ l produktu první PCR. Jako negativní kontrolu jsem využila dH₂O namísto templátu a produkt první PCR buněčné linie SiHa jako kontrolu pozitivní. Druhá PCR probíhala za obdobných podmínek jako první PCR v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Podmínky první a druhé PCR se lišily v teplotě nasedání primerů, u druhé PCR byla nastavena teplota 67 °C.

Produkty druhé PCR jsem analyzovala pomocí gelové elektroforézy. Připravila jsem 2% gel z 2 g agarózy NuSieve™ 3:1 (Lonza, Švýcarsko), 100 ml tris-borát-EDTA pufru (TBE) a 4 μ l barviva GelRed™ (Biotium, USA) pro následnou vizualizaci. Analýza probíhala při napětí 150 V po dobu 120 min, jako žebříček jsem použila Massruller Low Range Fermentas (Thermo Fisher Scientific, USA). Produkty na gelu jsem poté vizualizovala pomocí přístroje UVP EC3 Imaging systém (UVP, USA).

V dalším kroku byly PCR produkty převedeny z gelu alkalickým transferem (metoda Southern blot) na nylonovou membránu (PerkinElmer, USA). Nejdříve jsem gel inkubovala v 200 ml 0,25M HCl po dobu 10 min při pokojové teplotě, poté v destilované vodě a po dobu 20 min v zásaditém roztoku (transferový pufr, 0,6M NaCl a 0,4M NaOH). Na skleněnou misku naplněnou transferovým puffrem jsem položila skleněnou desku a na ni 3 vrstvy filtračního papíru W1, jehož přesahující konce byly smáčeny dostatečným množstvím transferového pufru. Na střed filtračního papíru jsem položila nejprve agarózový gel s PCR produkty, nylonovou membránu namočenou ve 2 \times koncentrovaném roztoku SSC (saline sodium citrate, sůl citrátu sodného; 0,3M NaCl s 0,03M citrát sodný, pH 7,0) a 3 vrstvy filtračního papíru W3 smočeném v transferovém puffru. Na celý systém jsem navrstvila širokou vrstvu buničité vaty a skleněnou desku se závažím. Alkalický transfer probíhal přes noc. Po transferu jsem membránu přelila neutralizačním roztokem (1M Tris s 1,2M NaCl, pH 7,4) a kývala na kývačce Gyro-rocker SSL3 (Bibby Scientific, UK) 15 min. Poté jsem membránu opláchla destilovanou vodou a přelívala 2 \times koncentrovaným roztokem SSC po dobu 15 min. Membránu jsem zabalila do filtračního papíru a aluminiové folie a 2 hodiny zapékala v peci OF 1E při 80 °C (Jeio Tech, Korea), poté uložila do lednice do dalšího použití.

Pro izolaci PCR produktů užitých na jejich následnou sekvenaci jsem provedla gelovou elektroforézu. Připravila jsem 3% gel ze 40 ml TBE, 1,5 g agarózy s nízkou teplotou tání NuSieve™ GTG™ (Lonza, Švýcarsko) a 2 μ l barviva GelRed™ (Biotium,

USA). Analýza trvala 60 min při napětí 110 V. K vizualizaci produktů jsem využila transiluminátor ETX-F20.M (Vilber, Německo). PCR produkty jsem z gelu vyřezala ostrým skalpelem a přenesla do čisté 1,5ml mikrokumavky. Pro samotnou izolaci produktu z gelu jsem použila MinElute gel extraction kit (Qiagen, Německo) dle protokolu výrobce. Směs pro sekvenační reakci se skládala z 8 μ l dH₂O, 0,5 \times ředěného sekvenačního pufru BigDye™ Terminator, 4 μ l BigDye™ Terminator verze 3.1 Ready Reaction Mixu (oba Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2 μ M primeru P2for16 a 2 μ l DNA APOT-PCR produktu. Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Počáteční fáze denaturace trvala 1 min při 96 °C, dále následovalo 39 cyklů sestávajících z 30 s denaturace při 96 °C, z 15 s nasedání primerů za teploty 58 °C a 4 min elongace vláken při 60 °C. Pro pročištění reakcí jsem ke každému vzorku přidala 88 μ l roztoku obsahujícího 3 μ l 3M acetátu sodného, 62,5 μ l 96% etanolu (EtOH, ethanol) a 22,5 μ l dH₂O. Vzorky jsem inkubovala za pokojové teploty 15 min, poté centrifugovala při 13000 \times g odstředivkou Mikro 20 Hettich (Hettich, Německo) po dobu 20 min. Po odstranění supernatantu jsem přidala 250 μ l 70% EtOH, vzorky poté centrifugovala po dobu 5 min a následně ze zkumavek odsála veškerý EtOH. Pro dokonalé odstranění EtOH vzorky vysychaly na vzduchu při pokojové teplotě asi 15 min. K vysušeným peletům jsem přidala 25 μ l formamidu (Sigma-Aldrich, USA), poté jsem vzorky denaturovala v Thermal cycler GeneQ (Bioer-Technology, Čína) při teplotě 98 °C po dobu 5 min a ihned přesunula na led a nanasla na sekvenační destičku. Sekvenační analýza probíhala na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Analýzu získaných sekvencí jsem provedla v programu Chromas (Technelysium, Austrálie), sekvence jsem srovnala s referenční HPV 16 sekvencí (GenBank: K02718.1) v online programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, základní místní vyhledávač srovnání) Národního centra biotechnologických informací NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3. Detekce mutací v LCR HPV 16 izolátů

4.3.1. Amplifikace úseku LCR HPV 16

Pro amplifikaci 682 bp dlouhého úseku nekódující virové DNA jsem použila metodu PCR s primery V16 C a V16 D (Xi *et al.*, 1993) pokrývající oblast LCR, jejich sekvence je uvedena v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Primery použité pro amplifikaci a sekvenaci LCR HPV 16 podle studie Xi a kol. (1993).

| Název primeru | Sekvence 5'-3' |
|---------------|---------------------------------|
| V16 C | GCTTCAATTCGGTTGCATG |
| V16 D | CGTCGCAGTAACTGTTGCTTGCAGTACACAC |
| V16 E | TAAGGTTTAACTTCTAAGGCC |
| V16 F | AATGAACAATGTATGACTAACC |

Reakce probíhala v objemu 50 μ l a obsahovala 34,8 μ l dH₂O, 1 \times koncentrovaného reakčního pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 2,5mM roztok MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,25mM roztok nukleotidů (Promega, USA), 0,5 μ M primery (V16 C a V 16 D), 5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) a 1 μ l templátové DNA. Amplifikační reakce probíhala v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) dle nastavených podmínek. Fáze iniciační denaturace probíhala při 94 °C po dobu 5 min. Dále následovalo 35 cyklů skládajících se z 1 min denaturace při 94 °C, 1 min fáze nasedání primerů při 62 °C a 2 min prodlužování řetězce při 72 °C. Závěrečná fáze extenze probíhala při 72 °C po dobu 10 min. Amplifikovány byly všechny vzorky ORL, jako pozitivní kontrolu jsem použila DNA z buněčné linie SiHa. Jako negativní kontrolu jsem použila DNA buněčné linie HaCaT odvozené z lidských keratinocytů, která je negativní na HPV. Další negativní kontrolou byla reakce s 1 μ l destilované H₂O namísto templátové DNA.

Úspěšnost amplifikační reakce jsem ověřila elektroforeticky na 2% gelu (100 ml TBE, 2 g agarózy NuSieve™ 3:1 (Lonza, Švýcarsko) a 4 μ l barviva GelRed™ (Biotium, USA)). Elektroforéza probíhala při 135 V po dobu 60 min, jako žebříček jsem použila Massruller Low Range Fermentas (Thermo Fisher Scientific, USA). Produkty na gelu jsem vizualizovala pomocí přístroje UVP EC3 Imaging systém (UVP, USA).

Následně jsem provedla další elektroforézu za účelem izolování PCR produktu. Agarózový 3% gel jsem připravila ze 40 ml TBE, 1,5 g agarózy s nízkou teplotou tání NuSieve™ GTG™ (Lonza, Švýcarsko) a 2 μ l barviva GelRed™. Elektroforéza probíhala

při napětí 110 V po dobu 60 min, vizualizaci jsem provedla pomocí transiluminátoru ETX-F20.M (Vilber, Německo). Část gelu s PCR produktem jsem vyřízla skalpelem a přenesla do mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml a amplikony jsem vyizolovala pomocí MinElute gel extraction kitu (Qiagen, Německo), dle protokolu výrobce. Izolovaná DNA PCR produktu byla posléze skladována v mrazničce při -18 °C.

4.3.2. Sekvence PCR produktu

Získanou DNA PCR produktu jsem sekvenovala. Sekvenační reakci jsem připravila obdobně, jako je popsáno v kapitole 4.2, avšak s odlišnými primery. Použila jsem 0,2 μ M primery (V16 C, V16 D, V16 E, V16 F), pro každý primer jsem namíchala samostatnou reakci. Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Program jsem nastavila následovně: počáteční denaturace 1 min při 96 °C, následovalo 39 cyklů skládajících se z 30 s denaturace při 96 °C, 15 s nasedání primerů při 58 °C (pro primery V16 C a V16 D) či 50 °C (pro primery V16 E a V16 F) a 4 min elongace vláken při 60 °C. Po dokončení reakce jsem jednotlivé vzorky pročistila postupem uvedeným v kapitole 4.2. Sekvenační analýza probíhala na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.3.3. Analýza výsledků

Výstupní sekvence jsem analyzovala programem Chromas (Technelysium, Austrálie) a programy balíčku LaserGene, konkrétně SeqMan pro a MegAlign (DNASTAR, USA). Sekvence jsem srovnala s referenční sekvencí HPV 16 (GenBank: K02718.1).

4.4. Hladina metylace E2 vazebných míst HPV 16 izolátů

4.4.1. Bisulfidické ošetření DNA

Principem metody bisulfidické konverze DNA je nahrazení nemetylovaných cytosinů uracilem po ošetření NaHSO₃, přičemž metylované cytosiny zůstávají intaktní. Po sekvenční analýze je tedy možné určit, zda se na daném místě metylovaný cytosin nachází či nikoliv.

Bisulfidickou konverzi jsem provedla s využitím EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO Research, USA) dle protokolu výrobce. Objem DNA použitý pro konverzi DNA, jsem vypočítala tak, aby každá reakce obsahovala 300 ng DNA. U všech vzorků byl tento objem menší než výrobcem vyžadovaných 20 µl, proto bylo nutné doplnit reakci destilovanou H₂O do objemu 20 µl. Mimo ORL vzorků jsem konvertovala i DNA SiHa, kterou jsem využila v dalších pokusech jako negativní kontrolu, neboť tato buněčná linie vykazuje nízký stupeň metylace, a DNA CaSki jako pozitivní kontrolu, protože tato buněčná linie naopak vykazuje vysokou hladinu metylace (Badal *et al.*, 2003). CaSki je buněčná linie odvozená z buněk cervikálního karcinomu a obsahuje asi 600 kopií HPV 16. Přesné složení reakce uvádí tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: Ředění DNA pro bisulfidickou konverzi. Výsledný objem je 20 µl.

| vzorek | DNA (µl) | dH ₂ O (µl) | vzorek | DNA (µl) | dH ₂ O (µl) |
|----------------|----------|------------------------|----------------|----------|------------------------|
| ORL 104 | 3,04 | 16,96 | ORL 161 | 0,43 | 19,57 |
| ORL 111 | 0,92 | 19,08 | ORL 181 | 1,18 | 18,82 |
| ORL 116 | 1,26 | 18,74 | ORL 187 | 0,76 | 19,24 |
| ORL 125 | 0,58 | 19,42 | ORL 243 | 2,25 | 17,75 |
| ORL 126 | 0,58 | 19,42 | ORL 244 | 1,50 | 18,5 |
| ORL 128 | 0,80 | 19,2 | ORL 257 | 6,25 | 13,75 |
| ORL 133 | 1,17 | 18,83 | ORL 265 | 0,94 | 19,06 |
| ORL 137 | 4,39 | 15,61 | ORL 280 | 0,23 | 19,77 |
| ORL 155 | 0,84 | 19,16 | CaSki | 5,73 | 14,27 |
| ORL 160 | 0,62 | 19,38 | SiHa | 1,84 | 18,16 |

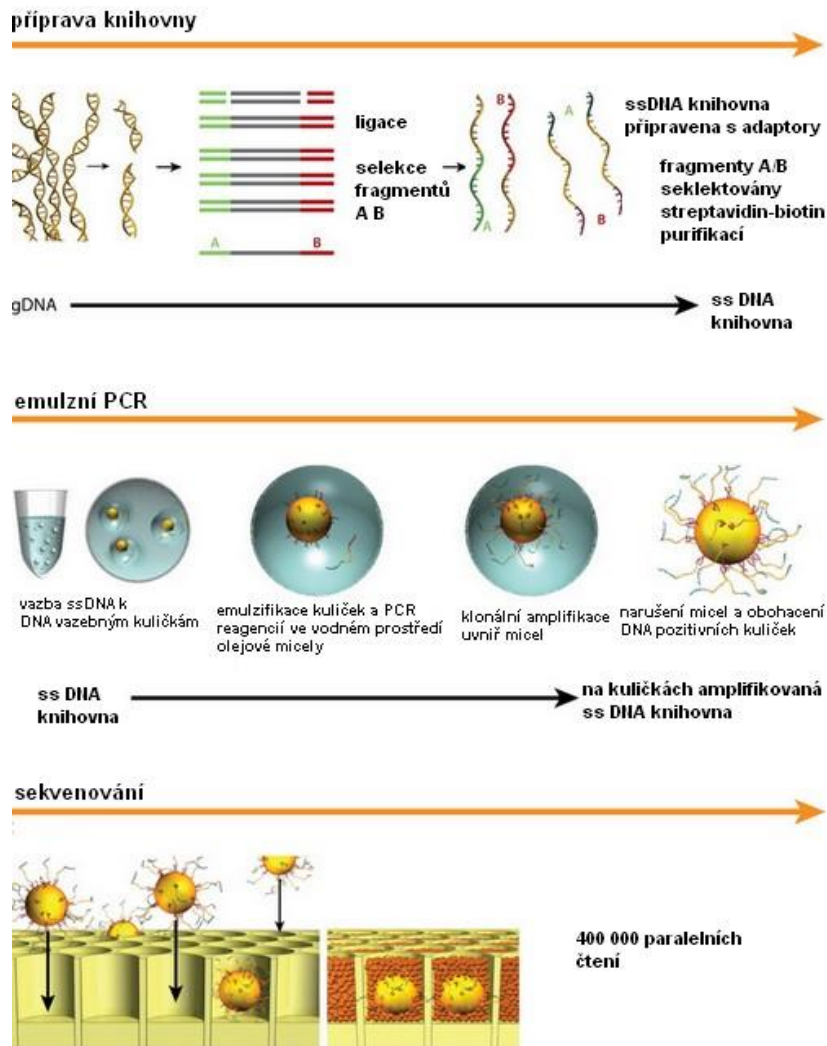
Takto naředěnou DNA jsem přidala k 130 µl konverzního pufru CT (ZYMO Research, USA), reakce jsem následně vložila do Peltier Thermal Cycleru 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Iniciační fáze trvala 8 min při 98 °C, fáze konverze trvala 3,5 hodiny při 64 °C. Poté byl vzorek chlazen při 4 °C. Následně jsem pročistila všechny vzorky pomocí Zymo-Spin™ IC kolonek a reagentů (ZYMO Research, USA). Do každé

kolonky jsem nanesla 600 μ l vazebného M-Binding pufru, poté vzorek konvertované DNA.

Tuto kolonku se vzorkem jsem poté centrifugovala po dobu 30 s při 16060 \times g odstředivkou Biofuge Fresco (Heraeus, Německo). Centrifugovaný roztok jsem odstranila, vzorek uchycený v kolonce jsem pročistila 100 μ l M-Wash promývacího pufru a centrifugovala 30 s při 16060 \times g. Pak jsem na kolonku přidala 200 μ l M-Desulphonation pufru, desulfonace probíhala 20 min za pokojové teploty. Po uplynutí této doby jsem vzorek centrifugovala 30 s při 16060 \times g a následně 2 \times pročistila 200 μ l M-Wash pufru a centrifugovala 30 s při 16060 \times g. Poté jsem kolonku vložila do čisté 1,5ml zkumavky, na kolonku jsem nanesla 10 μ l M-elučního pufru a provedla centrifugaci 30 s při 16060 \times g. Získanou konvertovanou DNA jsem uchovávala v mrazničce při teplotě -70 $^{\circ}$ C.

4.4.2. Příprava knihoven pro sekvenování nové generace

Při pyrosekvenování dochází po inkorporaci nukleotidu DNA polymerázou během sekvenační reakce k uvolnění pyrofosfátu. Uvolněný pyrofosfát aktivuje enzym luciferázu, která produkuje světlo. Systém firmy Roche zahrnuje tři nezbytné kroky: přípravu knihoven pro sekvenování, emulzní PCR a samotnou sekvenační reakci (obrázek č. 8). Pro přípravu knihoven je nutné pomocí PCR reakce napojit na žádanou sekvenci (amplikon) adaptorovou sekvenci, která odliší jednotlivé sekvenované vzorky od sebe a je komplementární s oligonukleotidy navázanými na agarózových kuličkách použitých při emulzní PCR. Ekvimolární množství amplikonů je smícháno s agarózovými kuličkami, je provedena emulzní PCR, kdy v olejovém váčku odděleném vodou je právě 1 agarózová kulička s navázaným 1 fragmentem amplikonu. Výsledkem je asi milion kopií každého fragmentu. Kuličky se nanášejí na destičku se stovkou tisíc jamek, v každé jamce je jediná kulička, sekvenace fragmentů každé kuličky je samostatně vyhodnocována odečítáním množství světelných reakcí (shrnuto v publikaci Mardis (2008)). Sekvenační reakce využívá přístroj GS Junior (454, Roche, USA).



Obr. č. 8: Schéma pyrosekvenace firmy 454, Roche. Sekvenace zahrnuje přípravu knihoven, emulzní PCR a sekvenční reakci. Převzato a upraveno podle Mardis (2008).

Pro amplifikaci úseků E2 vazebných míst LCR jsem použila speciální primery, které vychází ze sekvenace konvertované DNA. Pro sekvenaci oblasti E2BS1 a E2BS234 byly nejprve navrženy primery ze studie Chaiwongkot a kol. (2013). Na základě předběžných výsledků, které ukázaly, že publikované primery pro oblast E2BS1 nefungují, jsem pro účely této studie navrhla nové primery pro sekvenaci oblasti E2BS1 pomocí online programu Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Pro sekvenaci oblasti E2BS234 jsem použila primery ze studie Chaiwongkot a kol. (2013). Sekvence všech primerů využitých pro tvorbu knihoven jsou uvedeny v tabulce č. 7. Primery s označením NGS (next generation sequencing, sekvenování nové generace) obsahují adaptorové sekvenace pro sekvenování nové generace.

Tabulka č. 7: Sekvence primerů využitých k přípravě knihoven pro sekvenování. Primery E2BS234 F a E2BS234 R podle studie Chaiwongkot a kol. (2013), primery E2BS1 F a E2BS1 R byly nově navrženy pro účely této práce. Primery s označením NGS obsahují adaptorové sekvence pro NGS.

| Název primeru | sekvence (5'-3') |
|----------------------|--|
| E2BS1 F | TTGTTTAAATATTTATTAATTGTGTTGTG |
| E2BS1 R | AAACTATTTAAAAAACACATTTTATACC |
| E2BS234 F | AAATTGTATATGGGTGTGTGTAAT |
| E2BS234 R | AACATTACAATTCTCTTTTAATAAA |
| E2BS1-NGS F | CACGACGTTGTAAAACGACTTGTTTTAATATTTATTAATTGTGTTGTG |
| E2BS1-NGS R | CAGGAAACAGCTATGACCAAACATTTAAAAAACACATTTTATACC |
| E2BS234-NGS F | CACGACGTTGTAAAACGACAAATTGTATATGGGTGTGTGTAAT |
| E2BS234-NGS R | CAGGAAACAGCTATGACCAAACATTACAATTCTCTTTTAATAAA |

Pro potvrzení, že publikované a nově navržené primery amplifikují oblast našeho zájmu, jsem provedla PCR s kontrolní buněčnou linií CaSki a náhodně vybranými vzorky ORL 116 a 181 jako templátem. Během procesu optimalizace jsem vyzkoušela dvě různé DNA polymerázy, a to AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) a Hot Start ZymoTaq DNA polymerázu (Zymo Research, USA).

Pro amplifikaci oblasti E2BS1 obsahovala reakční směs o objemu 25 μ l 1 \times koncentrovaný reakční pufr, 0,25mM směs nukleotidů (vše Zymo Research, USA), 0,12 μ M primery E2BS1 F a E2BS1 R, 2 U Hot Start ZymoTaq DNA polymerázy (Zymo Research, USA) 1 μ l templátové DNA a 10,45 μ l dH₂O. Pro amplifikaci oblasti E2BS234 jsem 25 μ l reakční směs namíchala obdobně, použila jsem 0,12 μ M primery E2BS234 F a E2BS234 R. Všechny reagenty ve zkumavce jsem řádně promíchala, amplifikační reakce probíhala v Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) za následujících podmínek: fáze iniciační aktivace polymerázy trvala 10 min při 95 °C. Následovalo 49 cyklů skládajících se z 30s iniciační fáze za teploty 95 °C, 40s fáze nasedání primerů při teplotě 48 °C a 40s fáze elongační při 72 °C. Závěrečná extenze vláken probíhala při 72 °C po dobu 7 min. Elektroforeticky jsem ověřila, zda došlo k řádné amplifikaci. Oblast E2BS1 je dlouhá 163 bp, oblast E2BS234 je dlouhá 179 bp. Dále jsem obě oblasti sekvenovala metodou popsanou v kapitole 4.2. Pro sekvenaci jsem použila 0,2 μ M primery E2BS1 F/ E2BS1 R/ E2BS234 F/ E2BS234 R, pro každý primer jsem namíchala samostatnou reakci. Podmínky reakce pro jednotlivé typy primerů se nelišily, počáteční denaturace trvala 1 min při 96 °C, následovalo 39 cyklů skládajících se z 30 s denaturace při 96 °C, 15 s nasedání primerů při 50 °C a 4 min elongace vláken při 60 °C. Reakce byly následně přečištěny (viz kapitola 4.2), po nanesení na sekvenační

destičku byly vzorky sekvenovány přístrojem ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA). Získané sekvence jsem srovnala s konvertovanou referenční sekvencí HPV 16 (GenBank: K02718.1, konverze programem MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)). Pro porovnání jsem využila program SeqMan balíčku LaseGene (DNASTAR, USA).

4.4.3. První amplifikační reakce

Pro přípravu knihoven pro NGS jsem přihlížela k manuálu „Amplicon Library Preparation Method Manual“ firmy 454 Sequencing (Roche, USA). Provedla jsem PCR s primery pokrývající E2 vazebné oblasti LCR, které navíc obsahovaly adaptorové sekvence pro další tzv. „nested“ PCR. Primery byly navrženy zvlášť pro oblast E2BS1 (primery E2BS1-NGS) a E2BS234 (primery E2BS234-NGS), jejich sekvence je vyznačena v tabulce č. 7. Amplifikační reakce o objemu 25 μ l pro oblast E2BS1 linie CaSki, ORL 187 a ORL 126 se skládala z 1 \times ředěného reakčního pufru s hořčnatými ionty ZymoTaqTM, 0,25mM směsi nukleotidů, 2 U ZymoTaqTM DNA polymerázy (vše Zymo Research, USA), z 0,12 μ M primerů (E2BS1-NGS F a E2BS1-NGS R), 10,45 μ l dH₂O a 1 μ l 20 \times ředěné templátové DNA. Pro amplifikaci vzorků ORL 111, 125, 128, 137, 155, 160, 243 jsem použila 3 μ l neředěné templátové DNA, pro zbývající vzorky ORL 1 μ l neředěné templátové DNA a 0,4 μ M primery. Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycleru 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Iniciační fáze aktivace polymerázy trvala při 95 °C 10 min, poté následovalo 49 cyklů sestávajících z 30 s při 95 °C, 40 s při 55 °C, min při 72 °C. Závěrečná extenze vláken probíhala 7 min při 72 °C. Pro vzorky ORL 187, ORL 126 a linii CaSki jsem nastavila pouze 40 cyklů amplifikace.

Pro oblast E2BS234 linie jsem PCR provedla v objemu 25 μ l, reakce se skládala z 1 \times ředěného reakčního pufru s hořčnatými ionty ZymoTaqTM, 0,25mM směsi nukleotidů, 2 U ZymoTaqTM DNA polymerázy (vše Zymo Research, USA), 0,4 μ M primerů (E2BS234-NGS F a E2BS234-NGS R), 7,05 μ l dH₂O a 3 μ l neředěné templátové DNA. Reakce v Peltier Thermal Cycleru 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) probíhala obdobně jako u oblasti E2BS1, avšak teplotu nasedání primerů jsem nastavila na 50 °C a celkově proběhlo 50 cyklů reakce. Jako pozitivní kontrola reakce sloužila DNA buněčné linie CaSki, jako negativní kontrola dH₂O místo templátu. Správnost amplifikace jsem ověřila gelovou elektroforézou. Koncentrace obou PCR produktů jsem změřila na přístroji QubitTM 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Tento přístroj využívá fluorescenční barvy, proto jsem při přípravě jednotlivé vzorky uchovávala ve tmě. Pro měření jsem použila 1 μ l PCR produktu. Produkty PCR jsem uchovávala při teplotě -70 °C.

4.4.4. Druhá amplifikační reakce

Produkty první amplifikační reakce jsem použila jako templát pro druhou nested-PCR. Jako primery jsem použila MIDy (multiple identifiers, násobné identifikátory) specifické pro každý jednotlivý ORL vzorek, jejichž část je komplementární s adaptorem primerů E2BS1-NGS a E2BS234-NGS. MIDy fungují jako značka pro rozpoznání vzorku po NGS. Pro obě oblasti každého vzorku jsem použila jeden MID, neboť výsledné sekvence jsou od sebe rozeznány díky odlišným sekvencím primerů. Produkt amplifikační reakce tedy nese sekvenci ORL vzorku a dále MID pro sekvenování nové generace. PCR pro oblast E2BS1 o objemu 25 μ l se skládala z 1 \times ředěného reakčního pufru s hořčnatými ionty ZymoTaqTM, 0,5mM směsi nukleotidů, 2 U ZymoTaqTM DNA polymerázy (vše Zymo Research, USA), 0,2 μ M MIDy (pro každý ORL vzorek jiný MID, jejich seznam je uveden v tabulce č. 8), 9,8 μ l dH₂O a 1 μ l produktu první PCR. Reakce pro všechny vzorky oblasti E2BS234 a oblasti E2BS1 u vzorku ORL 244 obsahovala navíc 0,2 μ l MgCl₂ iontů (Thermo Fisher Scientific, USA), neboť zkušební reakce (vzorek ORL 244) bez hořčnatých iontů tvořila nespecifické produkty amplifikace. Aby výsledný objem reakce byl 25 μ l, přidala jsem pouze 9,6 μ l dH₂O.

Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycleru 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) za těchto podmínek: aktivace polymerázy trvala 10 min při 95 °C, dále následovalo 35 cyklů složených z 30 s při 95 °C, 40 s při 60 °C, 1 min při 72 °C. Závěrečná fáze trvala 10 min při 72 °C. Jako negativní kontrolu jsem použila dH₂O namísto templátu a jako pozitivní kontrolu produkt první PCR linie CaSki.

Amplifikaci jsem zkontrolovala elektroforeticky, produkty amplifikace oblasti E2BS1 jsou velké 232 bp a oblasti E2BS234 253 bp.

Tabulka č. 8: Čísla použitých MIDů pro jednotlivé ORL vzorky.

| Název vzorku | MID (F+R) |
|---------------------|------------------|
| ORL 244 | 1 |
| ORL 111 | 2 |
| ORL 116 | 3 |
| ORL 125 | 4 |
| ORL 126 | 5 |
| ORL 128 | 6 |
| ORL 133 | 7 |
| ORL 155 | 8 |
| ORL 161 | 9 |
| ORL 181 | 10 |
| ORL 187 | 11 |
| ORL 137 | 12 |
| ORL 257 | 13 |
| ORL 265 | 14 |
| ORL 243 | 15 |
| ORL 280 | 16 |
| ORL 160 | 17 |

4.4.5. Pročištění a kvantifikace

Amplikony jsem purifikovala pomocí roztoku Agencourt AMPure XP magnetických kuliček (Beckman Coulter, USA). Do PCR zkumavek jsem k PCR produktům přidala 24 μ l (v poměru 1:1) AMPure kuliček. Po důkladném promíchání jsem zkumavky 10 min inkubovala při pokojové teplotě. Poté jsem zkumavky přenesla na magnetický stojánek (DynaMag™-2 magnet, Thermo Fisher Scientific, USA) a 5 min inkubovala, aby mohlo dojít k přitáhnutí magnetických kuliček na stěnu PCR zkumavek dotýkajících se magnetického stojánku. Poté jsem ze zkumavek pipetou odstranila supernatant, k peletu jsem přidala 30 μ l vody prosté RNáz, obsah zkumavek jsem resuspendovala. Po dvouminutové inkubaci na magnetickém stojánku jsem přenesla 25 μ l supernatantu do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, do kterých jsem přidala 25 μ l AMPure kuliček. Tento proces pročišťování jsem dvakrát zopakovala. Při třetím pročištění jsem místo 30 μ l vody prosté RNáz do každé zkumavky k peletu přidala 150 μ l 70% EtOH. Zkušavky jsem inkubovala za pokojové teploty na magnetickém stojánku 1 min, poté jsem odsála veškerý supernatant a k vyschlému peletu přidala 20 μ l vody prosté RNáz a zkumavky přenesla na magnetický stojánek. Po 2 min inkubace jsem 15 μ l supernatantu přenesla do nové 1,5 μ l zkumavky.

Pro určení koncentrace jednotlivých pročištěných ampliconů jsem využila přístroj Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro účely měření jsem použila 1 μl každého ampliconu. Ze získaných koncentrací (c ; $\text{ng}/\mu\text{l}$) a délky ampliconů (d ; bp) jsem vypočítala počet molekul v 1 μl roztoku u každého ampliconu pomocí následujícího vzorce:

$$\text{poč. molekul}/\mu\text{l} = \frac{(c \times 6,022 \times 10^{23})}{656,6 \times 10^9 \times d}$$

Ve vzorci je použita Avogadrova konstanta ($6,022 \times 10^{23}$) a konstanta $656,6 \times 10^9$, která udává molární hmotnost 1 bp. Amplicony jsem naředila na koncentraci 10^9 molekul/ μl . K 1 μl ampliconu jsem přidala množství vody prosté RNáz vypočtené podle následujícího vztahu:

$$V_{H_2O}[\mu\text{l}] = \frac{\text{poč. molekul}/\mu\text{l}}{10^9} - 1$$

Způsob ředění je uveden v tabulce č. 9. Takto připravené knihovny pro NGS sekvenování jsem ekvimolárně smíchala. Pět μl každého naředěného ampliconu jsem smíchala v jedné 1,5 ml mikrozkušavce. Tato zkumavka obsahovala 10^9 každého ampliconu. Dále jsem připravila ředění $10^8 - 10^5$ ampliconů, přičemž ředění 10^5 jsem využila pro emulzní PCR (emPCR, emulsion PCR).

Tabulka č. 9: Koncentrace, délka, počet molekul v 1 µl amplikonů a množství RNáz prosté H₂O přidané k 1 µl amplikonů. Ve sloupci s označením vzorků značí číslo za lomítkem E2 vazebnou oblast (/1 - E2BS1, /2 – E2BS234), kterou PCR produkt obsahuje.

| vzorky | koncentrace (ng/µl) | délka amplikonu (bp) | počet molekul v 1 µl | RNáz-prostá H₂O (µl) |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| 1-244/1 | 2,48 | 232 | 9 804 006 008 | 8,80 |
| 1-244/2 | 4,77 | 253 | 17 291 701 531 | 16,29 |
| 2-111/1 | 5,04 | 232 | 19 924 270 274 | 18,92 |
| 2-111/2 | 2,20 | 253 | 7 975 208 253 | 6,98 |
| 3-116/1 | 8,16 | 232 | 32 258 342 349 | 31,26 |
| 3-116/2 | 6,22 | 253 | 22 548 088 789 | 21,55 |
| 4-125/1 | 7,27 | 232 | 28 739 969 225 | 27,74 |
| 4-125/2 | 0,80 | 253 | 2 889 200 444 | 1,89 |
| 5-126/1 | 11,40 | 232 | 45 066 801 811 | 44,07 |
| 5-126/2 | 7,80 | 253 | 28 275 738 353 | 27,28 |
| 6-128/1 | 10,40 | 232 | 41 113 573 582 | 40,11 |
| 6-128/2 | 10,80 | 253 | 39 151 022 334 | 38,15 |
| 7-133/1 | 8,40 | 232 | 33 207 117 124 | 32,21 |
| 7-133/2 | 12,60 | 253 | 45 676 192 724 | 44,68 |
| 8-155/1 | 3,51 | 232 | 13 875 831 084 | 12,88 |
| 8-155/2 | 7,29 | 253 | 26 426 940 076 | 25,43 |
| 9-161/1 | 4,67 | 232 | 18 461 575 830 | 17,46 |
| 9-161/2 | 11,10 | 253 | 40 238 550 733 | 39,24 |
| 10-181/1 | 13,00 | 232 | 51 391 966 977 | 50,39 |
| 10-181/2 | 11,60 | 253 | 42 051 098 063 | 41,05 |
| 11-187/1 | 6,11 | 232 | 24 154 224 479 | 23,15 |
| 11-187/2 | 10,20 | 253 | 36 975 965 538 | 35,98 |
| 12-137/1 | 8,79 | 232 | 34 748 876 133 | 33,75 |
| 12-137/2 | 7,66 | 253 | 27 768 225 100 | 26,77 |
| 13-257/1 | 9,76 | 232 | 38 583 507 515 | 37,58 |
| 13-257/2 | 10,70 | 253 | 38 788 512 868 | 37,79 |
| 14-265/1 | 11,40 | 232 | 45 066 801 811 | 44,07 |
| 14-265/2 | 14,40 | 253 | 52 201 363 113 | 51,20 |
| 15-243/1 | 4,56 | 232 | 18 026 720 724 | 17,03 |
| 15-243/2 | 7,57 | 253 | 27 441 966 581 | 26,44 |
| 16-280/1 | 12,60 | 232 | 49 810 675 686 | 48,81 |
| 16-280/2 | 4,21 | 253 | 15 261 648 521 | 14,26 |
| 17-160/1 | 5,55 | 232 | 21 940 416 671 | 20,94 |
| 17-160/2 | 11,00 | 253 | 39 876 041 267 | 38,88 |

4.4.6. Emulzní PCR

Emulzní PCR jsem provedla s využitím manuálu „emPCR Amplification Method Manual – Lib-A“ a GS Junior Titanum emPCR Lib-A kitu navrženého pro sekvenční systém GS Junior (454 Sequencing, Roche, USA).

Připravila jsem 1× ředěný roztok ze 430 µl reagentie Mock Mix (454 Sequencing, Roche, USA) a 1,72 ml vody prosté nukleáz (Thermo Fisher Scientific, USA). Emulzní olej jsem přidala do míchací zkumavky Turrax[®] (IKA, Německo) nasazené na elektrické míchadlo Ultra-Turrax[®] (IKA, Německo), poté jsem přidala 2 ml 1× ředěného Mock Mixu a obsah zkumavky byl míchán po dobu 5 min.

Dále jsem připravila reakční směsi Live Amp Mix A a Live Amp Mix B. Obě směsi se skládaly z 205 µl vody prosté nukleáz (Thermo Fisher Scientific, USA), dále z reagentií obsažených v GS Junior Titanum emPCR Lib-A kitu (454 Sequencing, Roche, USA), a to 260 µl přísad Additive, 135 µl Amp Mixu, 35 µl enzymového Enzyme Mixu, 1 µl peptidyl-prolyl izomerázy (PPIáza). Mix A obsahoval 40 µl Amp Primeru A a Mix B obsahoval 40 µl Amp Primeru B. Obě směsi jsem promíchala a dále skladovala na ledu.

Připravila jsem 1× promývací roztok smícháním 0,5 ml reagentie Wash Buffer (454 Sequencing, Roche, USA) s 4,5 ml vody prosté nukleáz (Thermo Fisher Scientific, USA). K reagentiím Capture Beads A a Capture Beads B obsahujících kuličky pro uchycení knihoven (454 Sequencing, Roche, USA) jsem přidala 1 ml promývacího roztoku, roztoky jsem promíchala a centrifugovala pro vytvoření peletu obsahující kuličky. Supernatant jsem odstranila, do zkumavek s kuličkami přidala další 1 ml promývacího roztoku a postup promytí jsem zopakovala. K promýtým reagentiím Capture Beads A a Capture Beads B jsem přidala 10 µl knihovny (ředění 1× 10⁵) připravené v sekci 4.4.5. a zkumavky jsem promíchala.

Celkem 600 µl připraveného Live Amp Mixu B jsem přidala do zkumavky Capture Beads B, zkumavku jsem promíchala a její obsah přenesla pipetou do míchací zkumavky Turrax[®]. Zkumavka Turrax[®] byla míchána po dobu 5 min na elektrickém míchadle Ultra Turrax[®]. Poté jsem přidala 600 µl Live Amp Mixu A do zkumavky Capture Beads A, zkumavku promíchala a její obsah také přenesla do míchací zkumavky Turrax[®]. Obsah zkumavky byl míchán po dobu 5 min míchadlem Ultra Turrax[®].

Pomocí pipety Combitip (Eppendorf, Německo) jsem přenesla 100 µl emulze ze zkumavky Turrax[®] do pruhových 8 jamkových zkumavek s víčkem. Proces amplifikace probíhal v DNA Engine Dyad[®] Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) za následujících

podmínek: Počáteční denaturace trvala 4 min při 94 °C, následovalo 50 cyklů skládajících se z 30 s při 94 °C, 4,5 min při 58 °C a 30 s při 68 °C. Poté byly vzorky uchovávány při teplotě 10 °C.

Produkty emPCR jsem ze zkumavek odsála do 50ml zkumavky (součást GS Junior Titanium Oil and Breaking Kitu, 454 Sequencing, Roche, USA) pomocí vakuové odsávačky KNF LAPOPORT® (KNF, USA). Jamky jsem dvakrát promyla 100 µl izopropanolu a znovu odsála do téže zkumavky. Protože na dně zkumavek ulpívala spousta produktu, obsah sběrných zkumavek jsem rozdělila do dvou a v obou doplnila objem izopropanolem do 35 ml. Zkumavky jsem míchala do úplného rozpuštění peletu, poté centrifugovala na centrifuze Eppendorf 5804 (Eppendorf, Německo) při 930×g 5 min. Supernatant jsem částečně odstranila, obsahy obou zkumavek smíchala do jedné a opět centrifugovala pro úplné odstranění supernatantu. Do zkumavky s peletem jsem přidala 10 ml Enhancing pufu (454 Sequencing, Roche, USA), obsah zkumavky resuspendovala, doplnila izopropanolem do objemu 40 ml a promíchala. Zkumavku jsem centrifugovala při 930×g 5 min, supernatant jsem odstranila, zbývající obsah zkumavky doplnila do 35 ml izopropanolem, promíchala, poté jsem zkumavku opět centrifugovala při 930×g 5 min a supernatant jsem odstranila. Obsah zkumavky jsem doplnila do 35 ml Enhancing pufrem, promíchala, centrifugovala při 930×g 5 min, supernatant jsem odsála tak, aby ve zkumavce zbývaly asi 2 ml pufu. Obsah zkumavky jsem přenesla do 1,7 ml zkumavky s víčkem (454 Sequencing, Roche, USA), centrifugovala odstředivkou Eppendorf® MiniSpin® (Eppendorf, Německo) při 10 000×g po dobu 15 s a supernatant odstranila. Pelet jsem dvakrát omyla 1 ml Enhancing pufu, zkumavka centrifugovala při 10 000×g po dobu 15 s a supernatant odstranila.

Pro zakoncentrování produktu emPCR jsem připravila rozpouštěcí roztok (125 µl NaOH s 9,88 ml vody prosté nukleáz (Thermo Fisher Scientific, USA)). Do zkumavky s peletem jsem přidala 2 × 1 ml rozpouštěcího roztoku, zkumavku jsem inkubovala 2 min za pokojové teploty, poté centrifugovala při 10 000×g po dobu 15 s a supernatant odstranila. Pak jsem přidala 3 × 1 ml Annealing pufu usnadňující nasedání primerů (454 Sequencing, Roche, USA), zkumavku jsem promíchala a centrifugovala při 10 000×g po dobu 15 s. Poté jsem přidala 45 µl Annealing pufu, 15 µl Enrich Primeru A a 15 µl Enrich primeru B (vše 454 Sequencing, Roche, USA), zkumavku jsem promíchala a inkubovala 5 min při 65 °C, poté ihned přenesla na led. Poté jsem zkumavku promyla 3 × 1 ml Enhancing pufu, centrifugovala při 10 000×g po dobu 15 s, supernatant jsem odstranila.

Poté jsem do zkumavky vnesla 1 ml Enhancing pufru, zkumavku jsem promíchala a uchovávala do dalšího použití při pokojové teplotě. Během inkubace jsem připravila další reagentie, a to směs s magnetickými obohacujícími kuličkami Enrichment beads (454 Sequencing, Roche, USA), které jsem nejdříve promíchala a přenesla na magnetický stojánek. Po 3 min inkubace jsem odstranila supernatant, přidala 500 μ l Enhancing pufru a zkumavku promíchala. Po přenesení na magnetický stojánek a vytvoření peletu jsem odstranila supernatant a opět přidala 500 μ l Enhancing pufru. Po inkubaci na magnetickém stojánku a odstranění supernatantu jsem přidala 80 μ l Enhancing pufru a obsah zkumavky jsem promíchala. Takto připravené Enrichment Beads jsem přidala do 1,7 ml zkumavky s produktem emPCR, obsah zkumavky jsem promíchala a 5 min inkubovala na míchadle Revolver™ Adjustable Lab Rotator (Labnet, USA). Poté jsem zkumavku přenesla na magnetický stojánek a po vytvoření pelety jsem odstranila supernatant. Kuličky jsem promývala 1 ml Enhancing pufru do té doby, než byl supernatant úplně čirý (celkem 11 \times). Omyté kuličky jsem resuspendovala v 70 μ l rozpouštěcího roztoku, promíchala a inkubovala v magnetickém stojánku do vytvoření peletu. Supernatant jsem přenesla do nové 1,7 ml zkumavky s víčkem (454 Sequencing, Roche, USA), centrifugovala při 10 000 \times g po dobu 15 s a supernatant odstranila. K peletu jsem přidala 3 \times 1 ml Annealing pufru, obsah zkumavky jsem promíchala, centrifugovala při 10 000 \times g po dobu 15 s a supernatant odstranila. Poté jsem přidala 100 μ l Annealing pufru a obsah zkumavky jsem promíchala. Ke kuličkám jsem přidala 15 μ l sekvenačního Seq Primeru A a 15 μ l Seq Primeru B (vše 454 Sequencing, Roche, USA), zkumavku jsem promíchala a inkubovala 5 min při 65 °C, poté přenesla na led na 2 min. Přidala jsem 2 \times 1 ml Annealing pufru, zkumavku jsem promíchala a supernatant odstranila. Po přidání 1 ml Annealing pufru jsem zkumavku přenesla na počítadlo kuliček GS Junior Bead Counter v2 (454 Sequencing, Roche, USA). Pomocí rysky jsem určila počet kuliček, pro reakci jsem jich použila přibližně 500 000. Tyto kuličky jsem uchovávala v lednici do přípravy sekvenační reakce.

4.4.7. Pyrosekvenování

Pro samotný proces sekvenace jsem použila manuál „Sequencing Method Manual“, přístroj GS Junior a GS Junior Titanium Sequencing Kit (454 Sequencing, Roche, USA). Součástí tohoto kitu je velké množství reagentií, jejichž složení je patentované firmou Roche (USA). Před sekvenační reakcí byl přístroj pročištěn dle manuálu výrobce. Sekvenační reakci jsem nanášela na destičku PicoTiterPlate (454 Sequencing, Roche, USA), která musela být před nanesením kuliček ošetřena předem připravenými pufrů.

Do láhve s CB pufrem jsem přidala 6,6 ml suplementu CB pufru (vše 454 Sequencing, Roche, USA), láhev jsem následně promíchala inverzí a 40 ml připraveného CB pufru jsem přenesla do čisté 50ml zkumavky typu Falcon, poté jsem přidala 6,5 μ l Apyrázy (454 Sequencing, Roche, USA). Takto připravený Bead pufr 2 (BB2) jsem promíchala inverzí a inkubovala na ledu. Na PicoTiterPlate jsem nanesla 350 μ l BB2 pufru a destičku jsem centrifugovala při 1 620 \times g na centrifuze Eppendorf 5804 (Eppendorf, Německo) se speciálním nástavcem pro destičku po dobu 5 min. BB2 pufr jsem poté odsála pipetou.

Dále jsem připravila reagentie pro jednotlivé vrstvy nanášené na destičku:

- **Vrstva 1, 3, 4:** Do zkumavek s reagentiemi (Enzyme Beads, PPIase Beads) jsem přidala 1 ml BB2, zkumavky jsem promíchala a přenesla na magnetický stojánek. Po vytvoření peletu jsem supernatant odstranila. Kuličky jsem 3 \times promyla 1 ml BB2, promíchala a inkubovala na magnetickém stojánku do vytvoření peletu. Do zkumavky s kuličkami s navázanými enzymy Enzyme Beads (454 Sequencing, Roche, USA) jsem přidala 400 μ l BB2, do zkumavky s kuličkami s navázanou PPIázou PPIase Beads (454 Sequencing, Roche, USA) 410 μ l BB2 (vrstva 4). Obě zkumavky jsem promíchala a uchovávala na ledu. Pro vytvoření enzymové pre-vrstvy (vrstva 1) jsem do čisté 1,7 ml zkumavky přidala 300 μ l BB2, 110 μ l Enzyme Beads. Po vytvoření enzymové post-vrstvy (vrstva 3) jsem smíchala 180 μ l BB2 s 230 μ l Enzyme Beads.
- **Vrstva 2:** Kuličky s DNA jsem smíchala s 6 μ l kontrolních kuliček Control Beads XLTF (454 Sequencing, Roche, USA), obsah zkumavky jsem centrifugovala při 9 300 \times g po dobu 15 s, supernatant odstranila tak, aby bylo ponecháno 100 μ l supernatantu ve zkumavce. Poté jsem přidala 500 μ l BB2, zkumavku jsem inkubovala 10 min při pokojové teplotě na míchadle Revolver™ Adjustable Lab Rotator, pak centrifugovala při 9 300 \times g po dobu 15 s a až na 50 μ l supernatant odsála. Přidala jsem 40 μ l polymerázy, 20 μ l kofaktoru polymerázy a 65 μ l BB2. Tuto směs jsem promíchala a inkubovala při pokojové teplotě po dobu 10 min. Přidala jsem 1 ml BB2 k obalujícím kuličkám Packing Beads (454 Sequencing, Roche, USA) a obsah zkumavky jsem promíchala. Zkumavku jsem promyla 3 \times 1 ml roztoku BB2, centrifugovala při 9 300 \times g po dobu 5 min, supernatant odsála. Poté jsem přidala 200 μ l BB2 a zkumavku uchovávala na ledu. Ke směsi DNA kuliček a polymerázy

s kofaktorem jsem přidala 175 μ l pročištěných Packing Beads, reagentie jsem promíchala a inkubovala za pokojové teploty po dobu 5 min.

Na PicoTiterPlate jsem nanasla 350 μ l vrstvy 1, destičku jsem centrifugovala při 1 620 \times g po dobu 5 min, pak jsem obsah destičky odsála pipetou. Poté jsem nanasla 350 μ l vrstvy 2, destičku centrifugovala při 1 620 \times g po dobu 10 min, obsah destičky odsála. Pak jsem nanasla vrstvu 3 (350 μ l), destičku opět centrifugovala při 1 620 \times g po dobu 10 min a potom odsála, nakonec jsem nanasla 350 μ l vrstvy 4, destičku centrifugovala při 1 620 \times g 5 min a následně odsála. Do očištěného sekvenačního přístroje jsem přenesla destičku a byl spuštěn proces sekvenace, který čítal 100 sekvenačních cyklů.

4.4.8. Vyhodnocení výsledků

Získaná data byla upravena v programu GS Amplicon Variant Analyzer (454 sequencing, Roche, USA), kde jsem vložením sekvencí primerů pro oblasti E2BS1 a E2BS234 a MIDů získala sekvence obou oblastí každého ORL vzorku ve formátu .fasta. Sekvence jsem poté analyzovala v online programu QUMA - Quantification tool for methylation analysis (<http://quma.cdb.riken.jp/>). Pro analýzu jsem použila nekonvertované referenční sekvence oblasti E2BS1 a E2BS234 bez sekvence primerů. Dále jsem porovnála procento metylovaných cytosinů ve skupině vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru u jednotlivých vazebných oblastí.

Pro určení, zda se liší stupeň metylace v jednotlivých oblastech obou skupin vzorků, jsem použila jednak určení průměrných hodnot a mediánu metylace v jednotlivých CpG, dále jsem určila, zda hodnoty splňují normální rozdělení. Podle negativního výsledku Shapiro-Wilkova testu normality jsem se rozhodla použít neparametrický Mann-Whitney U test.

Testovaná nulová hypotéza zní: Stupeň metylace ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou viru se neliší. Statistickou analýzu jsem prováděla v programu R.2.15.0 (<https://www.r-project.org/>). Pro tvorbu grafů jsem použila program GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, USA).

4.5. Určení virové nálože ve vzorcích ORL

4.5.1. Příprava standardních křivek pro kvantifikaci

Standardní křivky kontrol pro kvantifikaci virové nálože jsem připravila s využitím klonu HPV 16 a *RNázy P*. *RNáza P* je gen, který se v diploidní buňce nachází ve dvou kopiích. Plazmid *RNázy P* byl připraven dříve Dr. Salákovou zaklonováním do pCR-BluntII-TOPO (Thermo Fisher Scientific, USA) vektoru (Salakova *et al.*, 2016), genom HPV 16 zaklonovaný do plazmidu pBR322 pochází z referenčních materiálů Národní referenční laboratoře pro papillomaviry a polyomaviry. Oba plazmidy jsem izolovala s pomocí Qiagen Plasmid Midi kitu (Qiagen, Německo) dle protokolu výrobce. Vyizolovanou plazmidovou DNA jsem rozpustila ve 200 μ l TE (10 mM Tris/ 1 mM EDTA, pH 8,0) pufru. Koncentraci izolované DNA jsem změřila na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Plazmidová DNA HPV 16 a *RNázy P* pro přípravu standardních křivek byly naředěny v TE pufru na výslednou koncentraci 10^7 kopií/ μ l, 10^6 kopií/ μ l, 10^5 kopií/ μ l, 10^4 kopií/ μ l, 10^3 kopií/ μ l, 10^2 kopií/ μ l, 10 kopií/ μ l a 1 kopii/ μ l. Všechny reakce poté probíhaly ve 3 opakováních.

Složení kvantitativní amplifikační reakce pro standardní křivku *E6* HPV 16 jsem upravila podle publikovaného postupu (Gravitt *et al.*, 2003). Reakce o objemu 15 μ l se skládala ze 1,5 μ l vody prosté RNáz, $1\times$ koncentrovaného reakčního pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 4mM roztoku $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM roztoku nukleotidů, 0,2 μ M primerů (*E6 F*, *E6 R*), 0,1 μ M TaqMan *E6* DNA próby, 1,5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) a 1,5 μ l templátové DNA jednotlivých ředění. Sekvence použitých primerů a próby je znázorněna v tabulce č. 10. Jako negativní kontrolu amplifikace jsem použila vodu prostou RNáz místo DNA templátu. Amplifikační reakce probíhala v přístroji RotorGene 6000 (Qiagen, Německo) za následujících podmínek: 2 min iniciační fáze při 50 °C, 12 min fáze při 95 °C, poté 40 cyklů sestávajících z 15 s při 95 °C a 30 s při 55 °C.

Reakce pro křivku *RNázy P* o objemu 15 μ l byla upravena podle Salákové a kol. (2016) a sestávala 6,26 μ l vody prosté RNáz, $1\times$ koncentrovaného reakčního pufru Thermo Fisher, 4mM roztoku $MgCl_2$, 0,2mM roztoku nukleotidů (vše Thermo Fisher Scientific, USA), 0,3 μ M primerů (*RNAP F*, *RNAP R*), 0,25 μ M TaqMan próby, 0,94 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) a 1,5 μ l templátové DNA. Sekvence použitých primerů a próby je znázorněna v tabulce č. 10. Jako negativní kontrola reakce sloužila voda prostá RNáz místo templátové DNA. Reakce probíhala v přístroji

RotorGene 6000 (Qiagen, Německo) za těchto podmínek: iniciační fáze při 95 °C 15 min, 45 cyklů z 15 s při 95 °C a 60 s při 60 °C. Standardní křivky jsem vygenerovala programem RotorGene 6000.

Tabulka č. 10: Sekvence primerů a prób pro kvantitativní PCR. Sekvence primerů a próby pro *RNazu P* podle Salakova a kol. (2016) a pro HPV 16 *E6* podle Gravitt a kol. (2003).

| Název primeru / próby | Sekvence 5'-3' |
|-------------------------|-----------------------------------|
| E6 F | ATGACTTTGCTTTTCGGGAT |
| E6 R | CTTTGCTTTTCTTCAGGACA |
| TaqMan HPV 16 E6 | FAM-ACGGTTTGTGTATTGCTGTTCTAA-3BQ1 |
| RNAP F | AGATTTGGACCTGCGAGCG |
| RNAP R | GAGCGGCTGTCTCCACAAGT |
| TaqMan RNazaP | FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1 |

4.5.2. Kvantitativní PCR ORL vzorků

Pro určení virové nálože (počet kopií virové DNA na buňku) jsem provedla kvantitativní PCR s DNA ORL vzorků jako templátem. Připravila jsem oddělené reakce s primery pro amplifikaci *RNázy P* a HPV 16 *E6* ve dvou opakováních pro každý vzorek. Reakce jsem namíchala stejně jako při přípravě standardních křivek (viz 4.5.1.). Jako negativní kontrolu jsem použila vodu prostou RNáz namísto templátu a jako pozitivní kontrolu DNA linie CaSki a SiHa. Dále jsem v každé reakci kvantifikovala i DNA příslušných standardů o koncentraci 10^3 a 10^6 kopií/ μ l jako další kontrolu. Podmínky amplifikace byly stejné jako pro jednotlivé standardy.

Z výsledných dat program RotorGene 6000 (Qiagen, Německo) generoval křivky určující průběh amplifikace, k těm jsem importovala odpovídající standardní křivky. Z hodnot koncentrace standardu pro *RNazu P* jsem vypočítala počet buněk v daném vzorku vydělením dvěma. Dále jsem vypočítala počet buněk v jednotlivých vzorcích ORL. Virovou nálož jsem vypočetla z počtu kopií genu *E6* u jednotlivých vzorků, a to dělením této hodnoty počtem buněk ve vzorku.

4.5.3. Detekce E6 a E7

Pro potvrzení, zda v ORL vzorcích dochází k expresi genů *E7* jsem provedla PCR s primery specifickými pro oblast genu *E7* (sekvence primerů viz tabulka č. 11) a cDNA jako templátem. Detekci HPV 16 *E6* virového transkriptu jsem neprováděla, tento pokus provedla Mgr. Vojtěchová dříve pro účely předcházející studie (Vojtechova *et al.*, 2016).

Provedla jsem detekci *E7* u vzorků ORL 243, ORL 137, ORL 257, ORL 265, ORL 244, ORL280, u zbývajících vzorků byla tato analýza také provedena Mgr. Vojtěchovou pro účely předcházející studie (Vojtechova *et al.*, 2016).

Amplifikační reakce o objemu 25 μ l se skládala z 1 \times koncentrovaného reakčního pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 1,5mM roztoku MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM roztok nukleotidů (Promega, USA), 0,5 μ M primery (*E7forwA* a *E7revA*), 0,5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 17,4 μ l vody prosté RNáz a 2 μ l cDNA vzorků. Jako negativní kontrola sloužil produkt reverzní transkripce negativní kontroly a voda namísto cDNA, jako pozitivní kontrola DNA linie SiHa. Reakce probíhala v Peltier Thermal cycleru s nastaveným programem shodně jako pro β -globinovou reakci v sekci 4.5.1. Zda došlo k amplifikaci produktu o velikosti 69 bp bylo ověřeno pomocí gelové elektroforézy.

Tabulka 11: Sekvence primerů pro amplifikaci genu *β -globin* (Saiki *et al.*, 1985) v sekci 4.6.2. a primerů pro detekci exprese *E7* genu.

| Název primeru | Sekvence 5'-3' |
|---------------------------|--|
| Primer mix PC03/04 | ACACAACACTGTGTTCACTAGC / CAACTTCATCCACGTTCCACC |
| E7forwA | AGCACACACGTAGACATTCGTA |
| E7revA | AGATGGGGCACACAATTCCT |

4.5.4. Vyhodnocení výsledků

Pro určení, zda se liší stupeň virové nálože v obou skupinách vzorků, jsem použila určení mediánu a průměrných hodnot metylace v jednotlivých oblastech, dále jsem určila, zda hodnoty splňují normální rozdělení. Využit byl Shapiro-Wilkův test normality. Pro statistické vyhodnocení hodnot virové nálože jsem použila neparametrický Mann-Whitney U test. Testovaná nulová hypotéza zní: Virová nálož ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou viru se neliší. Statistickou analýzu jsem prováděla v programu R.2.15.0 (<https://www.r-project.org/>). Pro tvorbu grafů jsem použila program GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, USA).

4.6. Kvantifikace hladiny exprese E6 a E7 ve vzorcích

Pro určení hladiny exprese virových genů je třeba virovou mRNA převést na cDNA, která je poté použita do kvantifikační reakce s primery amplifikujícími oblast genu *E6* a do reakce s primery amplifikující oblast genu *E7*. Principem relativní kvantifikace je porovnání hodnot tzv. hodnoty C_t (cycle of treshold, cyklus prahové hodnoty) vzorků a referenčního genu *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Hodnota C_t udává cyklus, kdy hodnota fluorescence při reakci dosáhne prahové hodnoty. Změna hodnot C_t koreluje se změnou koncentrace cDNA. Dále se při reakcích se vzorky a referenčního genu kvantifikuje kontrolní cDNA (v mém pokusu cDNA buněčné linie SiHa) pro kontrolu stejné účinnosti obou reakcí. Jako zdroj fluorescence byla použita barva SYBR®Green I (Molecular Probes, USA), která se nespecificky váže na dsDNA. S nárůstem dvouřetězcových produktů dochází k nárůstu množství navázaného barviva na dsDNA a tím k nárůstu fluorescence.

4.6.1. Příprava cDNA

Provedla jsem reverzní transkripci vzorků RNA izolované z buněčné linie SiHa a CaSki a ORL vzorků 137 a 243, jejichž cDNA jsem neměla k dispozici. Zbývající cDNA připravila Mgr. Vojtěchová pro účely její studie (Vojtechova *et al.*, 2016).

Z RNA vyizolované z buněčných linií jsem odebrala množství odpovídající 2 μg RNA a doplnila vodou prostou RNáz tak, aby výsledný objem reakce činil 16 μl . Množství RNA a vody je uvedeno v tabulce č. 12. Jako negativní kontrola sloužilo 16 μl vody prosté RNáz. Koncentraci RNA ve vzorcích jsem zjistila měřením na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabulka č. 12: Vstupní množství RNA a vody prosté RNáz vypočtené z koncentrací jednotlivých vzorků. Reverzní transkripci u ostatních vzorků provedla Mgr. Vojtěchová. V – objem, c – koncentrace, K⁻ negativní kontrola.

| vzorek | [c] RNA (ng/ μl) | [V] RNA (μl) | H ₂ O bez RNáz (μl) |
|----------------|------------------------------|---------------------------|---|
| ORL 137 | 970,55 | 2,06 | 13,94 |
| ORL 243 | 2455,09 | 0,81 | 15,19 |
| SiHa | 474,90 | 4,21 | 11,79 |
| CaSki | 345,30 | 5,79 | 10,21 |
| K ⁻ | - | - | 16,00 |

Nejdříve jsem odstranila možnou zbytkovou DNA ve vzorcích. K naředěným vzorkům jsem přidala 1× ředěný pufr (Promega, USA) a 2 U DNázy (Promega, USA). Výsledný objem reakce činil 20 µl. Jako negativní kontrolu DNázování jsem použila RNáz prostou vodu namísto templátové RNA. Vzorky jsem inkubovala 30 min při 37 °C, poté jsem reakci zastavila přidáním 1 µl inhibitoru DNázy Stop Solution (Promega, USA), následovala 10 min inkubace při 65 °C a vzorky jsem přesunula na led. Pro kontrolu DNázování jsem provedla PCR se směsí primerů pro buněčný gen *β-globin* PC 03/04 (Saiki *et al.*, 1985), jejich sekvence je uvedena v tabulce č. 11. Reakce o objemu 25 µl obsahovala 1× ředěný pufr (Fermentas, USA), 4mM roztok MgCl₂, směs obou 5µM primerů PC03/04, 0,2mM směs nukleotidů, 0,63 U Taq Polymerázy (Fermentas, USA) a 13,37 µl vody prosté RNáz. Jako templát jsem použila 0,5 µl RNA vzorků po DNázování. Jako pozitivní kontrolu jsem použila DNA linie SiHa a jako negativní kontrola sloužila voda prostá RNáz namísto templátu a také kontrola DNázování. Reakce probíhala v Peltier Thermal Cycleru za následujících podmínek: iniciační fáze při 95 °C 5 min, následovalo 40 cyklů 1 min při 94 °C, 2 min při 55 °C a 2 min při 72 °C. Závěrečná fáze trvala 3 min při 72 °C. Poté jsem elektroforeticky ověřila, zda došlo k úspěšnému odstranění veškeré přítomné DNA. Pokud DNázování proběhlo správně, neměly by být viditelné žádné produkty o velikosti 110 bp. Protože jsem měla opakovaně pozitivní výsledky, snížila jsem objem vstupní RNA na 1 µg a dále jsem prodloužila inkubaci s DNázou na 1 hodinu.

Vzorky po DNázování jsem inkubovala 10 min při 70 °C a poté přenesla na led na 5 min. Odebrala jsem 8 µl RNA po DNázování a přidala k nim 12 µl směsi pro reverzní transkripci, která obsahovala 1× ředěný pufr M-MLV (Promega, USA), 0,5mM směs nukleotidů (Promega, USA), 0,5µM primer Random Hexamer (Fermentas, USA), 1 U inhibitoru ribonukleázy RNasin (Promega, USA), 2,5 U M-MLV reverzní transkriptázy (Promega, USA) a 3,38 µl vody prosté RNáz. Jako kontrola reverzní transkripce sloužila reakce bez templátu, pouze s přídatkem vody prosté RNáz. Reverzní transkripce probíhala hodinu při 37 °C.

Pro ověření správného průběhu reverzní transkripce jsem opět provedla kontrolní PCR se směsí primerů PC 03/04 pro gen *β-globin* (Saiki *et al.*, 1985), jak je uvedeno výše. Jako pozitivní kontrolu jsem použila DNA izolovanou z buněčné linie SiHa a jako kontrolu negativní vodu namísto templátu, dále kontrolu po DNázování a reverzní transkripci. Potvrzením řádného průběhu reverzní transkripce jsou viditelné produkty o velikosti 110 bp.

4.6.2. Optimalizace kvantitativní PCR

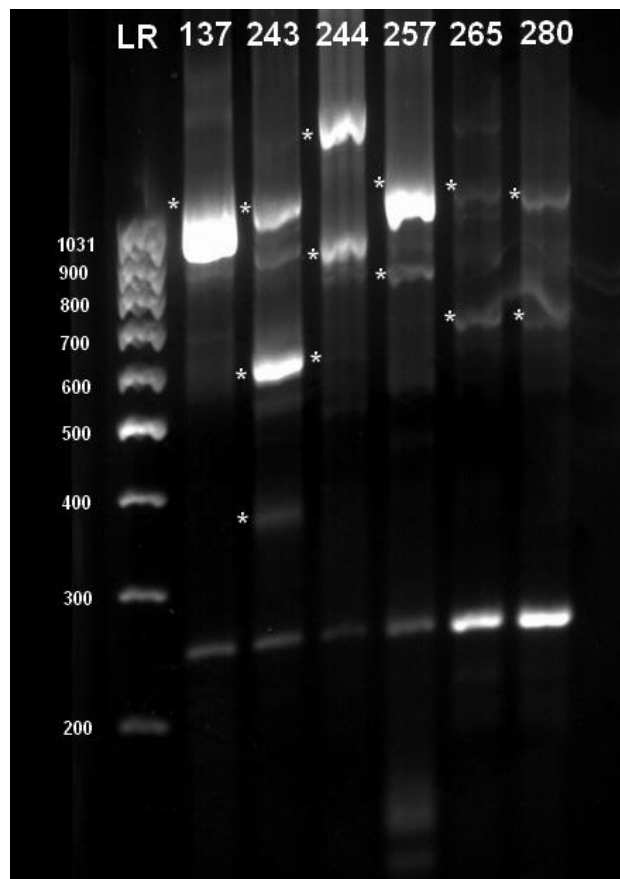
Pro stanovení exprese *E6* a *E7* genu ve vzorcích byla plánovaná RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR) s využitím barvy SYBR®Green I a primerů specifických pro transkripty *E6* a *E7* genu. Provedla jsem optimalizační reakci s barvivem SYBR®Green I (Molecular Probes, USA). Jako templát jsem použila standardy HPV 16 *E6* DNA a primery z tabulky č. 10. Tyto primery nejsou vhodné pro kvantifikaci exprese genu *E6*, neboť nedetekují alternativní transkripty genu, ale jsou vhodné pro určení počtu kopií genu *E6*. V kapitole 4.5.1. jsem ověřila, že primery amplifikují gen *E6*, proto jsem je využila pro optimalizační reakci s barvivem SYBR®Green I. Amplifikační reakce o objemu 15 µl se skládala z 3,13 µl vody prosté RNáz, 1× koncentrovaného reakčního pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 4mM roztoku MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM roztoku nukleotidů, 0,2µM primerů (*E6* F, *E6* R, tabulka č. 10), 25× ředěného SYBR®Green I barviva, 1,5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) a 1 µl templátové DNA jednotlivých ředění HPV 16 *E6*. Negativní kontrolou amplifikace byla reakce s vodou prostou RNáz místo DNA templátu. Amplifikační reakce probíhala v přístroji RotorGene 6000 (Qiagen, Německo) za následujících podmínek: 2 min iniciační fáze při 50 °C, 12 min fáze při 95 °C, poté 50 cyklů sestávajících z 15 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 30 s při 72 °C a fáze tání při 80 °C. Stoupání teplot při tání bylo nastaveno po 1 °C od 70 °C – 99 °C.

Pro určení hladiny exprese genů *E6* a *E7* ve vzorcích bylo nutné připravit standardní křivku získanou kvantifikací různých ředění cDNA linie SiHa pro ověření stejné účinnosti amplifikační reakce cílového genu *E6* a *E7* a referenčního genu *GAPDH*. Standardní křivku cDNA buněčné linie SiHa se nepodařilo připravit, viz sekce 5.5.1.

5. Výsledky

5.1. Určení statusu virové DNA

U vzorků ORL 137, 243, 244, 265 a 280 jsem určila HPV status metodou APOT. Pro vyhodnocení, zda vzorky ORL 137, 243, 244, 265 a 280 obsahují virovou DNA ve formě extrachromozomální či integrované, jsem porovnála výsledky druhé PCR a sekvenace. Výsledky analýzy PCR produktů jsou znázorněny na obrázku 9.



Obr. č. 9: Vizualizace výsledků druhé PCR. Pro sekvenaci byly vybrány vzorky označené hvězdičkou. Čísla jsou označeny jednotlivé ORL vzorky. LR - žebříček (bp) MassRuller Low Range (Fermentas, USA)

Virový transkript odvozený z extrachromozomální formy má velikost přibližně 1050 bp, této velikosti odpovídají PCR amplikony vzorků ORL 137, 257, 265 a 280. Pro sekvenční reakci jsem z gelu vyřezala produkty označené hvězdičkou (obrázek č. 9). Sekvence označených amplikonů jsem analyzovala v online programu BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Vzorek ORL 137 obsahoval pouze sekvenci HPV 16, na konci sekvence jsem detekovala polyA oblast, což značí, že v tomto vzorku nedošlo k integraci virového genomu do genomu hostitele. Tento vzorek jsem podle výsledků sekvenace a velikosti produktu na gelu označila jako extrachromozomální. Donorové místo

sestříhu virového transkriptu bylo v pozici nukleotidu 880, akceptorové místo v pozici nukleotidu 3358 referenční sekvence HPV 16. Vzorky ORL 243 a ORL 244 jsem označila jako integrované, neboť ve všech šesti detekovaných a sekvenovaných amplikonech jsem identifikovala sekvenci HPV 16 a sekvenci lidského genomu (gen *TP63* a *CDC37*). K integraci došlo vždy v pozici nukleotidu 880 virového genomu. Jedná se o integraci typu A (viz obrázek č. 7). Vzorky ORL 257, ORL 265 a ORL 280 jsem označila také jako extrachromozomální, všech šest detekovaných amplikonů obsahovalo pouze DNA HPV 16. Amplikony s kratší velikostí, než je standardní transkript odvozený od extrachromozomální formy viru, obsahovaly také pouze virovou sekvenci a lze je považovat za artefakty odvozené od extrachromozomálního transkriptu. Přehled virového statusu je uveden v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Určení statusu virové DNA na základě výsledků sekvenace produktů druhé PCR. Vzorky označené * vyhodnocovala Mgr. Vojtěchová.

| | Vzorek ORL | | Integrace na chromozomu | gen | region |
|--------------------|------------|---|-------------------------|----------------|-------------------|
| INTEGROVANÝ | 111 | * | 1q32 | - | Intergenní oblast |
| | 125 | * | 20p12.1 | <i>MACROD2</i> | Intron |
| | 128 | * | N/A | - | - |
| | 133 | * | 8p23.2 | <i>CSMD1</i> | Intron |
| | 160 | * | 17q23.1 | <i>TUBD1</i> | Exon |
| | 243 | | 3q28 | <i>TP63</i> | Exon |
| | 244 | | 19p13.2 | <i>CDC37</i> | 5'UTR |
| MIX | 126 | * | 5q35 | <i>CANX</i> | 3'UTR |
| | 187 | * | 13q14 | <i>TSC22D1</i> | Intron |
| EXTRACHROMOZOMÁLNÍ | 104 | * | - | Genom HPV 16 | - |
| | 116 | * | - | Genom HPV 16 | - |
| | 137 | | - | Genom HPV 16 | - |
| | 155 | * | - | Genom HPV 16 | - |
| | 181 | * | - | Genom HPV 16 | - |
| | 257 | | - | Genom HPV 16 | - |
| | 161 | * | - | Genom HPV 16 | - |
| | 265 | | - | Genom HPV 16 | - |
| | 280 | | - | Genom HPV 16 | - |

5.2. Detekce mutací v LCR HPV 16 izolátů

Provedla jsem sekvenační analýzu 682 bp dlouhé oblasti LCR 18 ORL vzorků a následné srovnání sekvencí s referenčním genomem HPV 16 (GenBank: K02718.1). U vzorků ORL 111 a 116 jsem nenalezla žádné odchylky od referenční sekvence. U ostatních vzorků jsem našla jednu nebo více nukleotidových změn. Nejvíce mutací jsem našla ve vzorku ORL 104 a to celkem 11 mutací. Tento vzorek jsem nebyla

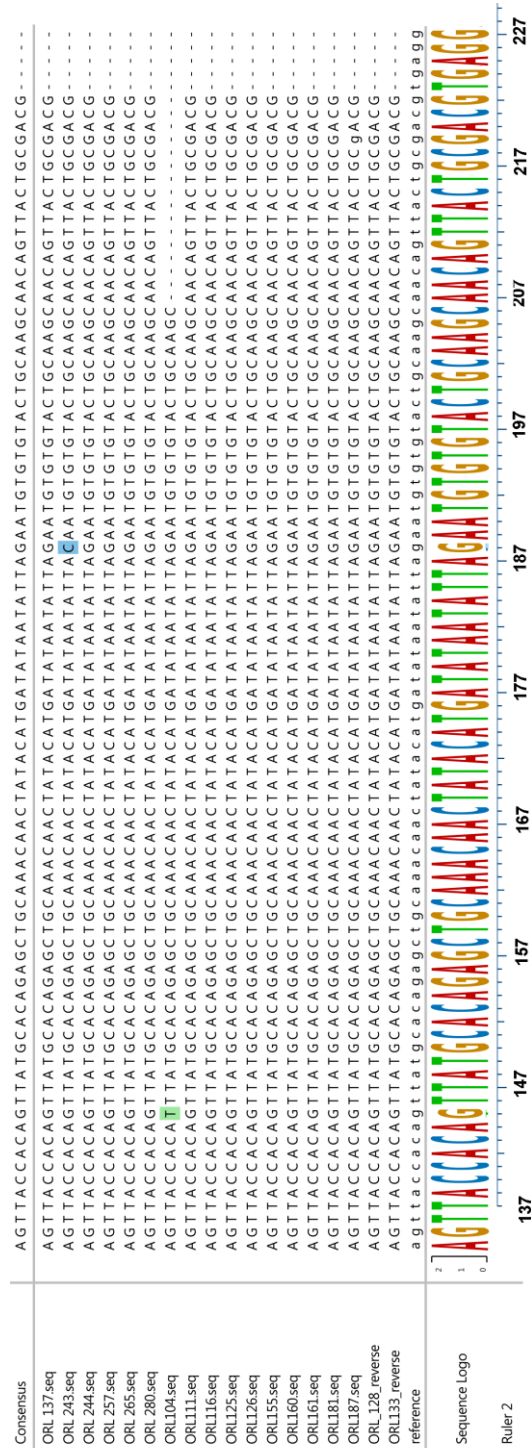
schopna dosekvenovat v celé délce, posledních 16 nukleotidů ve srovnání chybí. Při analýze tří různých chromatogramů se sekvenační reakce zastavila v tomto místě, výsledky sekvenace užitím zpětného primeru nebyly čitelné. Nejčastější změnou, kterou jsem našla u 14 z 18 vzorků je tranzice guaninu na adenin v pozici 7518 referenční sekvence HPV 16. V této oblasti je vazebné místo pro buněčný transkripční faktor YY1. Další detekované mutace jsou náhodné a nevyskytovaly se u více než jednoho vzorku. V oblastech E2 BS1, 2, 3 ani 4 jsem nenalezla mutace. Tabulka č. 14 ukazuje počty mutací jednotlivých vzorků. Poloha mutací v LCR je detailně znázorněna na obrázku č. 10 a tabulce č. 15.

Tabulka č. 14: Počet mutací LCR jednotlivých vzorků ORL.

| Vzorek | Počet mutací |
|----------------|---------------------|
| ORL 104 | 11 |
| ORL 111 | 0 |
| ORL 116 | 0 |
| ORL 125 | 4 |
| ORL 126 | 1 |
| ORL 128 | 2 |
| ORL 133 | 1 |
| ORL 155 | 1 |
| ORL 160 | 1 |
| ORL 161 | 1 |
| ORL 181 | 2 |
| ORL 187 | 1 |
| ORL 137 | 1 |
| ORL 257 | 1 |
| ORL 265 | 3 |
| ORL 243 | 2 |
| ORL 244 | 1 |
| ORL 280 | 1 |

Tabulka č. 15: Rozložení mutací ORL vzorků vzhledem k referenční sekvenci a vyznačení transkripčních faktorů (TF), které se do místa či okolí mutace váží.

| | 7482 | 7486 | 7518 | 7629 | 7666 | 7686 | 7712 | 7726 | 7740 | 7761 | 7783 | 7853 | 7883 | 12 | 13 | 24 | 28 | 109 | 131 | 145 | 188 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ORL 104 | C | A | A | | T | A | | C | G | T | T | | T | | | | | | | T | |
| ORL 111 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 116 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 125 | | | A | | | | | | | | | | | C | | | A | | G | | |
| ORL 126 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 128 | | | A | | | | G | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 133 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 155 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 160 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 161 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 181 | | | A | A | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 187 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 137 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 257 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 265 | | | A | | | | | | | | | | | | | G | | C | | | |
| ORL 243 | | | | | | | | | | | | | | | T | | | | | | C |
| ORL 244 | | | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORL 280 | | | | | | | | | | | | A | | | | | | | | | |
| reference | A | G | G | C | C | C | T | A | T | C | C | G | C | T | C | C | G | T | A | G | G |
| TF | | | YY1 | | | Tef1 | NF1 | | | | YY1 | | | | | | | | | | |



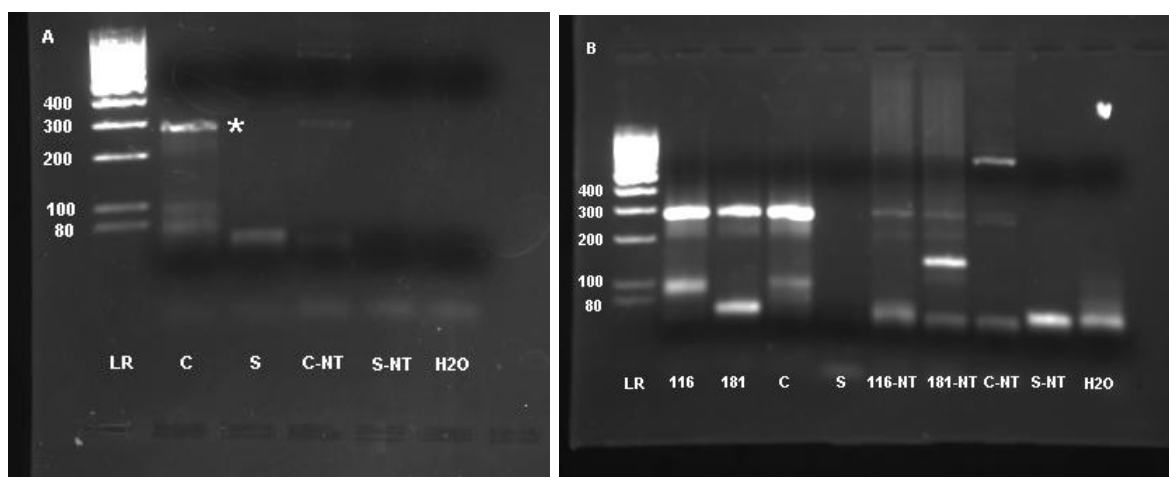
Obr. č. 10: Srovnání sekvencí LCR ORL vzorků s referenčním genomem HPV 16.

5.3. Určení stupně metylace E2BS ve vzorcích

5.3.1. Optimalizace PCR E2 vazebných míst LCR

Po bisulfidickým ošetření DNA všech vzorků ORL a DNA buněčných linií CaSki a SiHa jsem získala konvertovanou DNA, kde metylované cytosiny zůstávají intaktní a nemetylované cytosiny jsou nahrazeny thyminem. Dále jsem amplifikovala E2 vazebná místa metodou PCR.

Při zkušebních PCR jsem využila primery publikované ve studii Chaiwongot a kol. (2013). Pro zkušební a optimalizační reakce jsem jako templát využila konvertovanou DNA buněčné linie CaSki. Pro amplifikační reakce jsem použila DNA polymerázu AmpliTaq Gold, ale PCR s touto DNA polymerázou produkovaly nespecifické amplikony (očekávala jsem amplikony o velikosti 163 bp pro oblast E2BS1 a o velikosti 179 bp pro oblast E2BS234) v oblasti vazebných míst (obrázek č. 11 A a B). Proto jsem použila Hot Start ZymoTaq DNA polymerázu.



Obr. č. 11: Příklad nespecifických produktů amplifikace oblasti E2BS1 (A) a E2BS234 (B) při použití polymerázy AmpliTaq Gold. * - vzorek, který byl vyříznut a sekvenován. LR – žebříček (bp) MassRuller Low Range (Fermentas, USA), C – CaSki, S – SiHa, -NT – DNA před bisulfidickým ošetřením.

Hot Start ZymoTaq DNA polymeráza produkovala silné výtěžky v oblasti E2BS234, avšak v oblasti E2BS1 nedocházelo k tvorbě žádných produktů (obrázek č. 12). Provedla jsem několik optimalizačních reakcí s různým složením a reakčními podmínkami. Nejdříve jsem vyzkoušela naředit templátovou DNA buněčné linie CaSki 1×, 10× a 100×, do reakce jsem přidala 1 – 5 μ l templátu. Dále jsem zvýšila koncentraci primerů z 0,12 μ M na 0,5 μ M a 1 μ M. Množství hořčičných iontů jsem navýšila ze 1,5 mM (obsažených

v pufru) na 2 mM a 2,5 mM. Teplotu nasedání primerů jsem nastavila na 48 °C, 50 °C a 55 °C. I přes tyto změny nedošlo k amplifikaci této oblasti.



Obr. č. 12: Produkt amplifikace oblasti E2BS234 (_2) označený * a žádné viditelné produkty amplifikace oblasti E2BS1 (_1) s polymerázou Hot Start ZymoTaq a primery ze studie Chaiwongkot a kol. (2013). LR – žebříček (bp) MassRuller Low Range (Fermentas, USA), C – CaSki, S – SiHa, -NT – nekonvertovaná DNA, *žádaný produkt.

Produkt amplifikace buněčné linie CaSki oblasti E2BS1 o velikosti cca 300 bp (přibližně určené z gelu, obrázek č. 11A) s polymerázou AmpliTaq Gold jsem sekvenovala, srovnáním získaných sekvencí se sekvencí konvertované virové DNA v programu BISMA (<http://services.abc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/>) jsem zjistila, že sekvence referenční sekvence HPV 16 a sekvenovaných vzorků není shodná (obrázek č. 13).

```

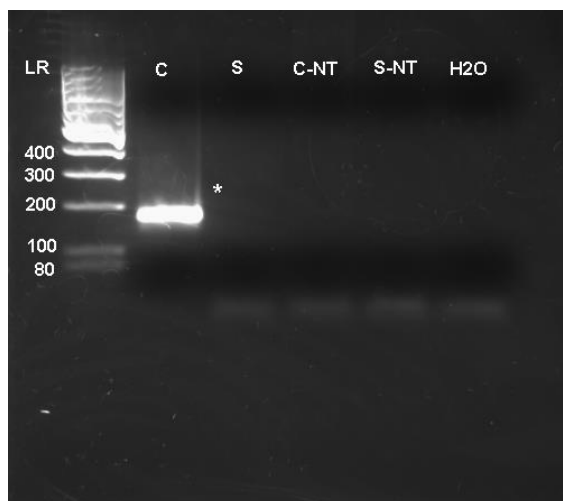
REF SEK 7440      TTTTGTAGTTTTAATCGAATTCGGTTG-TATGTTTTTTGGTATAAAATGTGTTTTTTTAAATAGTT-T-TATGTTAGTAATT
C1              -----TCT--TGAAATT-G--TG-T-TATGT---A--ATAAAATG-ATT-----AATA-TT-GGT-TGA-AGGAA--
C2              -----TTTTA--AAAATT-G--TTGATGT-TGTTG-A--ATAAA-T--ATCGAAAGAGGTAGTGAGGTGTGT-TG-AA--
C3              -----TAATT-G--TG-T-TATGT---A--ATAAAATG-ATT-----AATA-TT-GGT-TGA-AGGAA--
C4              -----TTTTA--AAAATT-G--TTGATGT-TGTTG-A--ATAAA-T--ATCGAAAGAGGTAGTGAGGTGTGT-TG-AA--
C5              -----TTTTA--AAAATT-G--TTGATGT-TGTTG-A--ATAAA-T--ATCGAAAGAGGTAGTGAGGTGTGT-TG-AA--
C6              -----CCCTTCTA-TGTAATT-G--TG-T-TATGT---A--ATAAAATG-ATT-----AATA-TT-GGT-TGA-AGGAA--

REF SEK          ATGGTTTAAATT-TGTACGTTT-TTT-GTTTTGTATGCGTGTAAATTTTTGTTTTTTTGATTTGTA      7539
C1              ATAAT--AAATT-T--A--TTT-TTA-GTTT-TT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----
C2              AT--T--GGGTTAT-TA--TTTATTATGATT-AT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----
C3              ATAAT--AAATT-T--A--TTT-TTA-GTTT-TT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----
C4              AT--T--GGGTTAT-TA--TTTATTATGATT-AT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----
C5              AT--T--GGGTTAT-TA--TTTATTATGATT-AT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----
C6              ATAAT--AAATT-T--A--TTT-TTA-GTTT-TT----GTGTTAAATTTTTGTTTTTTTGAT-----

```

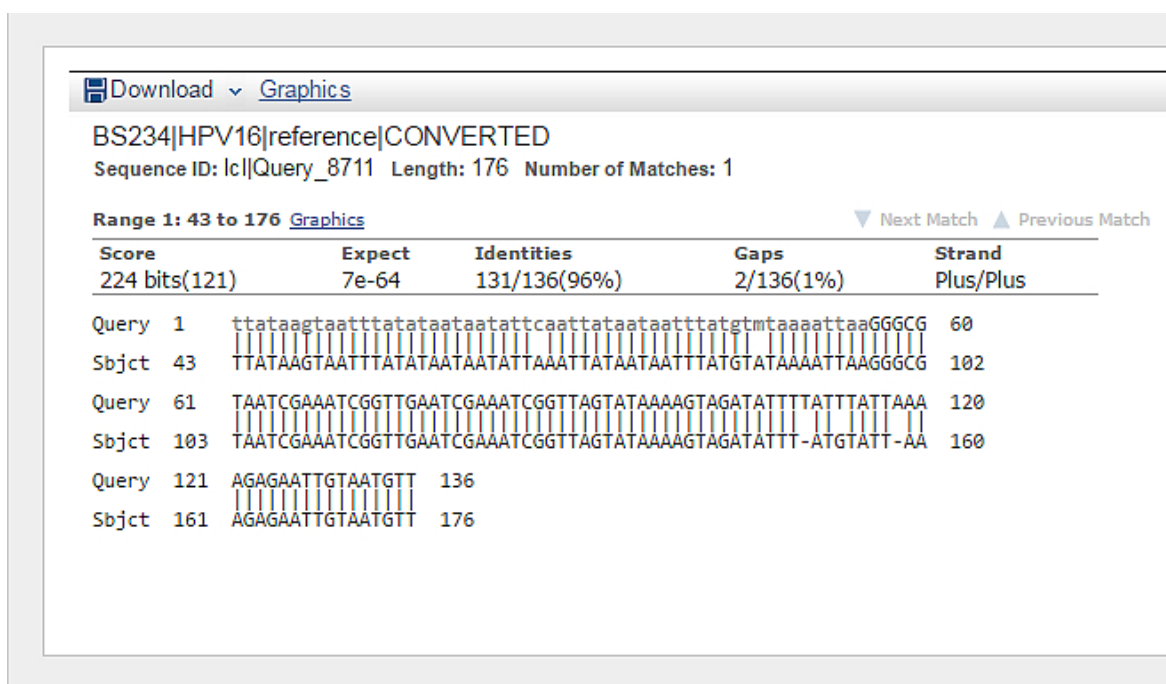
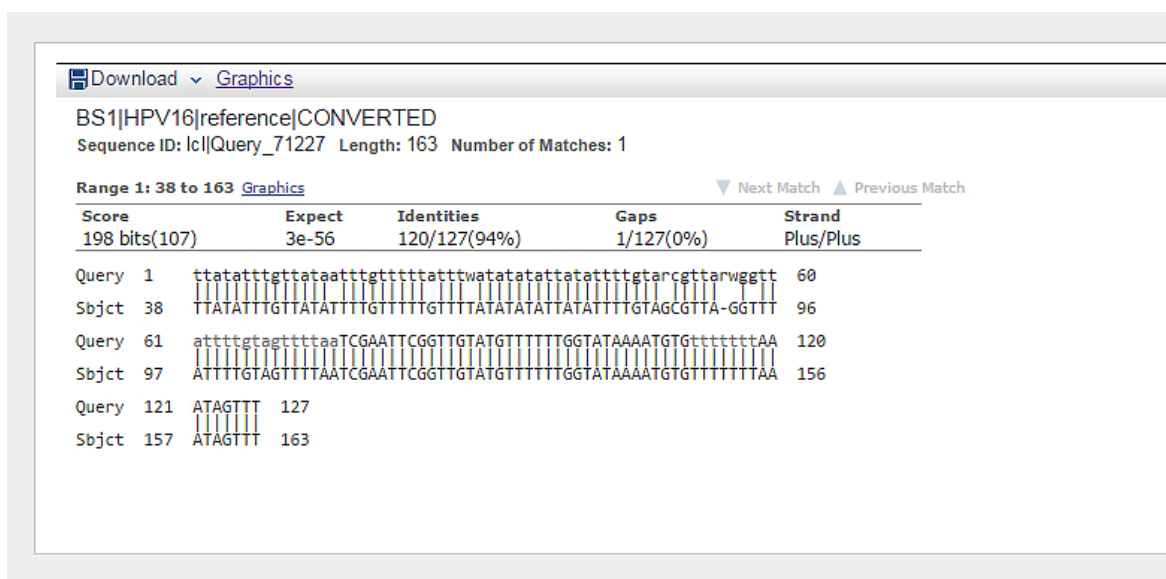
Obr. č. 13: Výstup srovnání sekvencí získaných sekvenací produktů amplifikace s AmpliTaq Gold polymerázou a primerů pro oblast E2BS1 publikovaných ve studii Chaiwongkota a kol. (2013) se sekvencí konvertované virové DNA. Analýzu jsem provedla v programu BISMA (<http://services.abc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/>).

Navrhla jsem nové primery pro oblast E2BS1 pomocí programu Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). PCR s novými primery pro oblast E2BS1 s polymerázou Hot Start ZymoTaq produkovala silné výtěžky bez přítomnosti nespecifických produktů (obrázek č. 14).



Obr. č. 14: Produkt amplifikace oblasti E2BS1 buněčné linie CaSki s využitím nově navržených primerů s polymerázou Hot Start ZymoTaq. LR – žebříček (bp) MassRuller Low Range (Fermentas, USA), C – CaSki, S – SiHa, -NT – nekonvertovaná DNA * - žádaný produkt o velikosti 179 bp.

Pro potvrzení, že primery pro obě oblasti opravdu amplifikují oblast našeho zájmu, jsem produkty PCR sekvenovala. Srovnáním sekvencí s referenčním genomem HPV 16 (GenBank: K02718.1) v online programu NCBI BLAST alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) jsem potvrdila, že primery amplifikují žádané oblasti (obrázek č. 15). Referenční genom HPV 16 jsem před porovnáním konvertovala pomocí programu Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>).



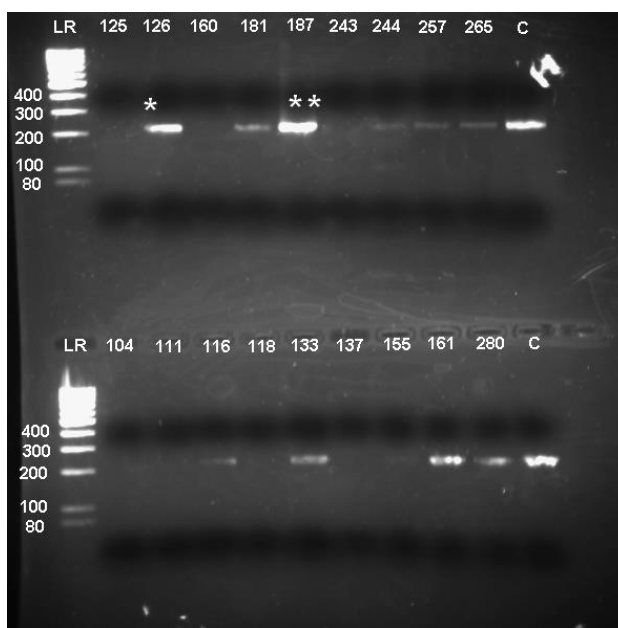
Obr. č. 15: Výsledek srovnání konvertovaných referenčních sekvencí oblastí E2BS1 (nahore) a E2BS234 (dole) se sekvencemi získanými sekvenací ampliconů s využitím nově navržených primerů pro oblast E2BS1 a primerů ze studie Chaiwongkote a kol. (2013) pro oblast E2BS234. Sekvence „Query“ znázorňuje sekvenované amplicony a sekvence „Sbjct“ příslušnou konvertovanou referenční sekvenci.

5.3.2. Příprava knihoven pro NGS sekvenování

Pro tvorbu knihoven pro NGS sekvenování bylo nutné optimalizovat první PCR tak, aby 1 μ l produktu obsahoval 5 – 20 ng DNA. Tuto optimalizaci jsem také prováděla s pomocí konvertované DNA linie CaSki. Jako templát do optimalizačních PCR jsem přidávala různě naředěnou DNA. Jako optimální se ukázalo použití 1 μ l 20 \times naředěné DNA Caski pro oblast E2BS1 (koncentrace produktu 7,27 ng/ μ l) a 1 μ l 150 \times naředěné

DNA Caski pro oblast BS234 (koncentrace produktu 7,84 ng/μl). Amplifikační reakce ORL vzorků přinesla znatelně menší koncentraci produktů oproti amplifikaci buněčné linie CaSki (obrázek č. 16).

Obr. č. 16: Výsledky první PCR ORL vzorků oblasti E2BS1 provedené za stejných podmínek jako u linie CaSki. Pouze u 2 vzorků koncentrace vyhovovala potřebnému rozmezí 5 – 20 ng/μl (**ORL 187 – 10,4 ng/μl, *ORL 126 – 5,01 ng/μl). LR – žebříček (bp) Low Range MassRuller Fermentas (Fermentas, USA).

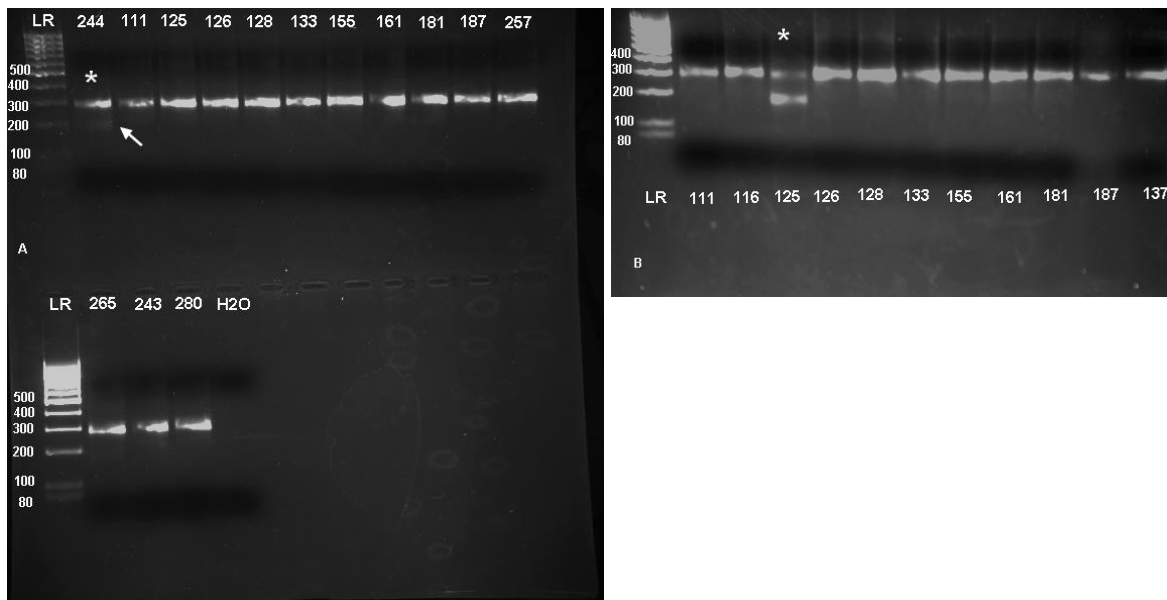


V dalších pokusech jsem upravovala podmínky a složení reakce tak, aby bylo dosaženo potřebné koncentrace produktů pro klinické vzorky. Pozitivní výsledky přineslo zvýšení koncentrace primerů z 0,12μM na 0,3μM, použití 1 μl neředěné konvertované DNA (ORL vzorky 116, 133, 161, 181, 244, 257, 265, 280) či 3 μl neředěné DNA (ORL 111, 125, 128, 137, 155, 160, 243) a zvýšení množství cyklů PCR ze 40 na 49. Podmínky pro oblast E2BS234 jsem optimalizovala na klinickém vzorku ORL 187. Zjistila jsem, že pro tento vzorek je optimální použití 3 μl konvertované DNA za stejných podmínek jako pro oblast E2BS1. Tyto podmínky se ukázaly jako vyhovující i pro oblasti E2BS234 u dalších vzorků. Vzorek ORL 104 jsem vyřadila z další analýzy, neboť se mi přes veškerou snahu o optimalizaci nepodařilo amplifikovat jeho E2 vazebné oblasti.

Při optimalizaci reakčních podmínek 2. PCR jsem přihlížela k doporučením uvedeným v příloženém manuálu pro GS Junior (454 Sequencing, Roche, USA). Prvotní zkouška vzorku ORL 244 BS234 ukázala, že oproti doporučení je nutné přidat zvláště 0,2 μl MgCl₂ ionty, neboť při analýze elektroforézou jsem detekovala slabý nespecifický produkt. Pro oblast BS1 jsem nejprve provedla PCR ve dvou provedeních s ORL vzorky

116 a 137, v prvním případě bez přidání $MgCl_2$ iontů, v druhém případě s $MgCl_2$ ionty. Nedetekovala jsem rozdíl v množství produktů u těchto dvou složení reakcí, proto jsem se rozhodla navrhnout složení reakcí bez hořčičných iontů. V případě ORL vzorku 244 BS1 se opět objevil slabý nespecifický produkt, PCR byla zopakována s přidavkem 0,2 μl $MgCl_2$ (obrázek č. 17 A).

Při analýze produktu amplifikace vzorku ORL 125 BS234 jsem detekovala dva proužky rozdílné velikosti. Vrchní proužek správné velikosti (pod 300 bp) a spodní o nižší velikosti (pod 200 bp). Optimalizace nevedla k vytvoření jediného produktu správné velikosti. Horní proužek správné velikosti jsem proto vyřezala z gelu a dále pročistila a použila s ostatními vzorky (obrázek č. 17 B).



Obr. č. 17 A: Agarózový gel s PCR produkty druhé PCR (s MIDy) pro oblast E2BS1, hvězdičkou je označen produkt ORL 244 se slabým nespecifickým produktem označeným šipkou. **B:** Agarózový gel s PCR produkty druhé PCR (s MIDy) pro oblast E2BS234, hvězdičkou je označen vzorek ORL 125 s nespecifickým produktem. LR – žebříček (bp) MassRuller Low Range (Fermentas, USA).

5.3.3. Stupeň metylace ve vzorcích s integrovanou a extrachromozomální formou viru

Veškeré ORL vzorky jsem ekvimolárně smíchala na konečnou koncentraci 10^5 každého amplikonu. Takto naředěnou směs amplikonů jsem použila pro emulzní PCR. Výsledkem emPCR bylo získání přibližně 2 000 000 kuliček obohacených o DNA amplikony. Pro NGS na přístroji GS Junior jsem použila 500 000 kuliček odebráním 330 μ l objemu zkumavky s kuličkami. Získané sekvence po NGS jsem analyzovala v programu Amplicon Variant Analyzer (454 sequencing, Roche, USA), kde každá sekvence byla přiřazena správnému vzorku a správné oblasti. Tyto sekvence jsem převedla do formátu .fasta a dále analyzovala v online programu QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp/>). Pro každou oblast každého vzorku jsem po sekvenaci získala přibližně 2 000 sekvencí. Po analýze v QUMA byly některé sekvence programem vyřazeny z analýzy, neboť nespĺňovaly zadané parametry. Nejnižší dovolené procento konverze bylo nastaveno na 95 % a nejnižší dovolené procento identity na 90 %. Sekvenací oblasti E2BS1 jsem získala informace o hladině metylace 3 CpG dinukleotidů nacházejících se v této oblasti. Pro vzorek ORL 187 oblasti E2BS1 a vzorky ORL 125 a ORL 243 oblasti E2BS234 byl pro analýzu použit malý počet sekvencí v porovnání s ostatními vzorky ORL (tabulka č. 16 a 17). Výstup analýzy vzorků ORL 187 a 125 daných oblastí jsem nepoužila pro srovnání stupně metylace v závislosti na virovém statusu. Data vzorku ORL 243 jsem použila do další analýzy, počet sekvencí považuji, po konzultaci s uživateli přístroje GS Junior, za dostatečný.

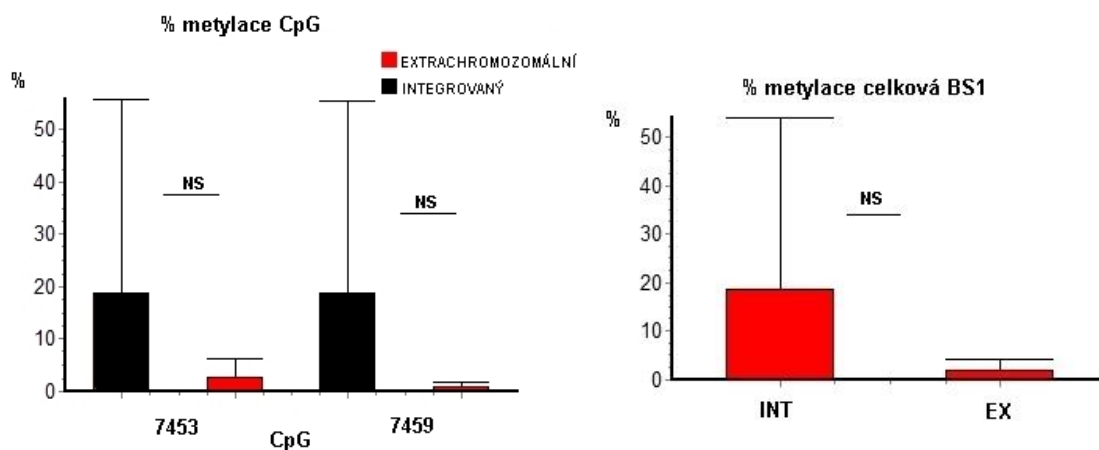
Sekvenací oblasti E2BS234 jsem získala hodnoty metylace 5 CpG nacházejících se přímo v oblasti E2BS234 a 1 CpG nacházejících se mimo tuto oblast. Tento CpG jsem nezařadila do celkové analýzy.

Pro určení stupně metylace v jednotlivých oblastech ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou viru jsem nejdříve vypočetla průměrné hodnoty metylace a medián pro jednotlivé oblasti a poté jsem určila, zda jednotlivé hodnoty metylace mají normální rozdělení. Procenta metylovaných CpG jednotlivých vazebných míst podle výsledků Shapiro-Wilkova testu neodpovídají normálnímu rozdělení, proto jsem použila neparametrický Mann-Whitney U test. Průměrné hodnoty a medián pro jednotlivé CpG jsou uvedeny v tabulce č. 16 a č. 17, grafické znázornění stupně metylace E2BS1 je uvedeno v grafu č. 1 (A – B) a stupně metylace E2BS234 v grafu č. 2, a č. 3 (A – D).

Pro žádný CpG oblasti E2BS1 se dle výsledků Mann-Whitney U testu stupeň metylace na hladině významnosti $\alpha = 5\%$ u integrované a extrachromozomální formy viru neliší (CpG 7453 ($p = 0,68$), CpG 7459 ($p = 0,30$), graf č. 1A). Stejně tomu je u CpG oblasti E2BS234 (CpG 7860 ($p = 0,95$), CpG 35 ($p = 0,40$), CpG 41 ($p = 0,10$), CpG 50 ($p = 0,60$), CpG 56 ($p = 0,20$), graf č. 2). Při analýze celkového stupně metylace (průměr hodnot obou CpG) oblasti E2BS1 jsem nezjistila signifikantní rozdíl ($p = 0,24$, $\alpha = 5\%$, graf č. 1B), ale rozdíl v celkovém stupni metylace oblasti E2BS234 u nádorů s integrovanou a extrachromozomální formou viru je signifikantní ($p = 0,02$; $\alpha = 5\%$, graf č. 3A), stejně jako stupeň metylace E2BS3 (CpG 35 a 41, $p = 0,05$; $\alpha = 5\%$, graf č. 3B). Pro ostatní oblasti byl rozdíl statisticky nevýznamný (E2 BS2 $p = 0,95$, $\alpha = 5\%$; E2BS4 $p = 0,20$, $\alpha = 5\%$; graf č. 3C a 3D).

Tabulka č. 16: Výsledné hodnoty analýzy v programu Quma pro oblast E2BS1. Znázornění pozic CpG dinukleotidů vzhledem k referenční sekvenci HPV 16. Červeně označen vzorek, u kterého bylo vzhledem k nastavení parametru programu možné analyzovat nízký počet sekvencí. MS – počet metylovaných sekvencí, S – celkový počet sekvencí, % M – procento metylovaných sekvencí. Vzorčky jsou pro názornost rozděleny podle virového statusu. Modře podsvíceny CpG (7432) nenáleží E2BS1.

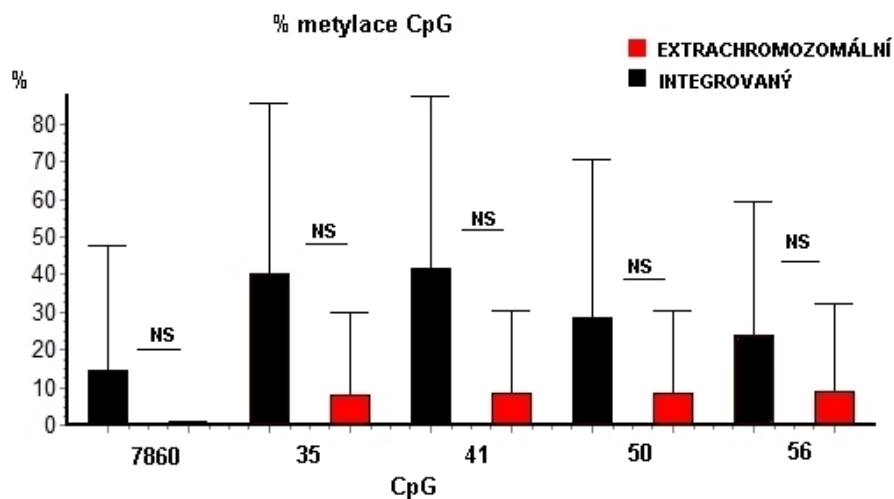
| poz. nuk. | | 7432 | | 7453 | | 7459 | |
|--------------------|---------|------------|---------|------------|---------|-------------|---------|
| vzorek | | MS (S) | % M (%) | MS/S | % M (%) | MS/S | % M (%) |
| Integrovaný | ORL 111 | 24 (2296) | 1,00 | 13 (2296) | 0,60 | 12 (2296) | 0,50 |
| | ORL 125 | 41 (3183) | 1,70 | 17 (3183) | 0,40 | 10 (3183) | 0,30 |
| | ORL 128 | 24 (3117) | 0,80 | 37 (3118) | 1,20 | 34 (3117) | 1,10 |
| | ORL 133 | 582 (2718) | 21,40 | 668 (2719) | 24,60 | 642(2719) | 23,60 |
| | ORL 160 | 5(2402) | 0,20 | 2397(2400) | 99,90 | 2400 (2402) | 99,90 |
| | ORL 243 | 19 (2512) | 0,80 | 26 (2512) | 1,00 | 21 (2512) | 0,80 |
| | ORL 244 | 73 (2248) | 3,20 | 94 (2248) | 4,20 | 92 (2249) | 4,10 |
| | Medián | 1,00 | | 1,20 | | 1,10 | |
| Průměr | 4,16 | | 18,80 | | 18,60 | | |
| Extrachromozomální | ORL 116 | 103 (1229) | 8,40 | 123 (1229) | 10,00 | 102 (1229) | 1,00 |
| | ORL 155 | 9 (2505) | 0,40 | 10 (2505) | 0,40 | 9 (2505) | 0,40 |
| | ORL 161 | 26(2545) | 1,00 | 15 (2545) | 0,60 | 11(2545) | 0,40 |
| | ORL 181 | 49 (1337) | 3,70 | 52 (1336) | 3,90 | 32 (1337) | 2,40 |
| | ORL 137 | 78 (3270) | 2,40 | 150 (3270) | 4,60 | 56 (3270) | 1,70 |
| | ORL 257 | 26 (2049) | 1,30 | 14 (2049) | 0,70 | 13 (2049) | 0,60 |
| | ORL 265 | 12 (2241) | 0,50 | 25 (2242) | 1,10 | 7 (2242) | 0,30 |
| | ORL 280 | 21 (2490) | 0,80 | 28 (2490) | 1,10 | 22 (2490) | 0,90 |
| | Medián | 1,20 | | 1,10 | | 0,75 | |
| | Průměr | 2,30 | | 2,80 | | 1,00 | |
| Mix | ORL 126 | 45(2659) | 1,70 | 36(2660) | 1,40 | 30(2660) | 1,10 |
| | ORL 187 | 1 (1) | 100,00 | 1 (1) | 100,00 | 1 (1) | 100,00 |



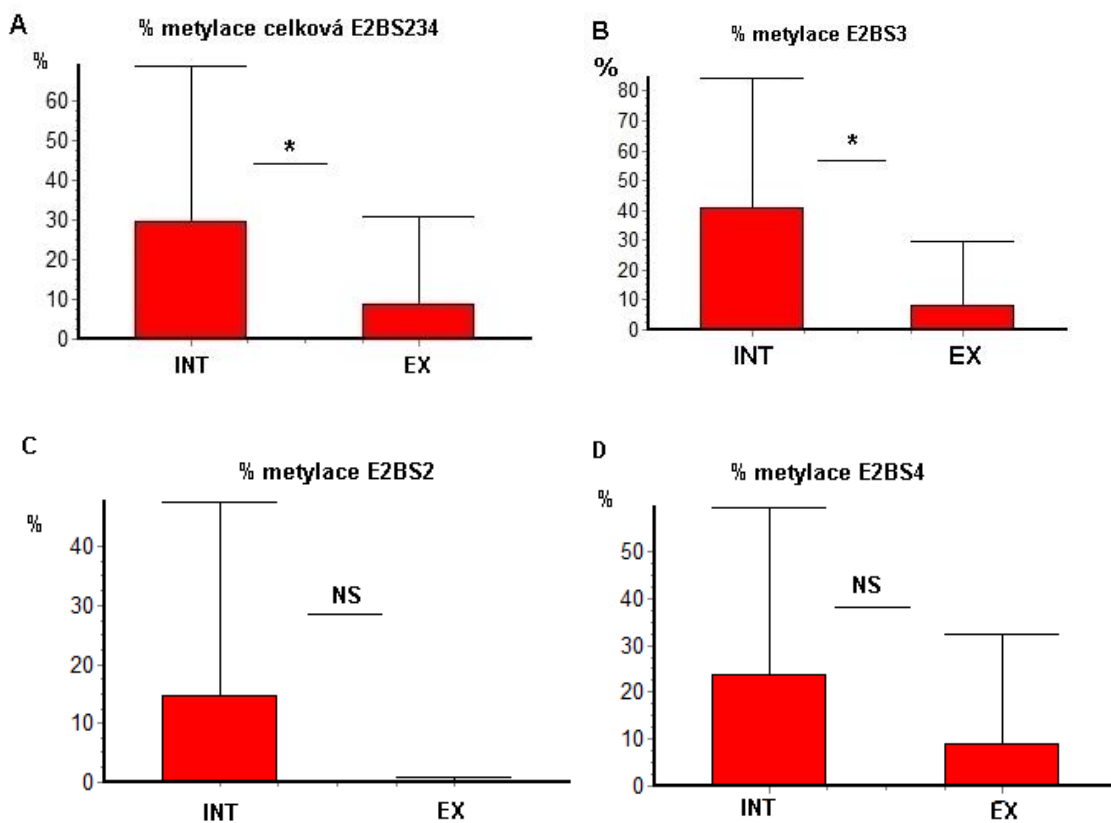
Graf č. 1A: Grafické srovnání stupně metylace (%) jednotlivých CpG v oblasti E2BS1 vzorků s extrachromozomální (EX) a integrovanou (INT) formou viru, $p = 0,68$ pro CpG 7453, $p = 0,30$ pro CpG 7459; B: znázornění celkového stupně metylace (%), průměr hodnot obou CpG oblasti E2BS1 u vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru $p = 0,24$.

Tabulka č. 17: Výsledné hodnoty analýzy v programu Quma pro oblast E2BS234. Tabulka znázorňuje pozice CpG dinukleotidů vzhledem k referenční sekvenci HPV 16. Červeně je označen vzorek, u kterého bylo vzhledem k nastavení parametru programu možné analyzovat nízký počet sekvencí. MS – počet metylovaných sekvencí, S – celkový počet sekvencí, % M – procento metylovaných sekvencí. Vzorky jsou pro názornost rozděleny podle virového statusu. Modře je označen CpG (nukleotid 31), který nenáleží do oblasti E2BS234.

| | poz. nuk. | 7860 | | 29 | | 35 | | 41 | | 50 | | 56 | |
|--------------------|-----------|------------|--------|-------------|--------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | | Vzorek | MS (S) | % M (%) | MS (S) | % M (%) | MS/S | % M (%) | MS/S | % M (%) | MS/S | % M (%) | MS/S |
| Integrovaný | ORL 111 | 1 (2591) | 0,00 | 2589 (2601) | 27,93 | 2582 (2599) | 99,30 | 2583 (2595) | 99,50 | 2586 (2600) | 99,60 | 2590 (2601) | 83 |
| | ORL 125 | 1 (98) | 1,00 | 1(101) | 1,00 | 1(101) | 1,00 | 1(101) | 1,00 | 1 (101) | 1,00 | 1(101) | 1,00 |
| | ORL 128 | 1 (2333) | 0,00 | 5(2346) | 0,20 | 5(2346) | 0,20 | 74(2346) | 3,20 | 6 (2344) | 0,30 | 13 (2344) | 0,60 |
| | ORL 133 | 159 (2658) | 6,00 | 1527(2676) | 57,10 | 1505(2682) | 56,10 | 1650(2682) | 61,50 | 1596 (2682) | 59,50 | 1426 (2682) | 53,20 |
| | ORL 160 | 1 (1951) | 0,10 | 6(1959) | 0,30 | 1(1959) | 0,10 | 2(1959) | 0,10 | 6 (1959) | 0,30 | 1 (1959) | 0,10 |
| | ORL 243 | 219 (268) | 81,70 | 44(272) | 16,20 | 1(272) | 0,40 | 2(272) | 0,70 | 1 (272) | 0,40 | 1 (272) | 0,40 |
| | ORL 244 | 1 (2672) | 0,00 | 569(2678) | 21,20 | 2246(2691) | 83,50 | 2274(2691) | 84,50 | 312 (2690) | 11,60 | 131 (2691) | 4,90 |
| | Medián | | 0,05 | | 18,70 | | 28,25 | | 32,35 | | 6,00 | | 2,75 |
| | Průměr | | 14,63 | | 20,50 | | 41,50 | | 41,58 | | 28,62 | | 23,70 |
| Extrachromozomální | ORL 116 | 22 (1263) | 1,70 | 786 (1275) | 61,60 | 791 (1275) | 62,00 | 805(1274) | 63,20 | 797 (1274) | 62,60 | 850 (1275) | 66,70 |
| | ORL 155 | 1 (2400) | 0,00 | 1(2416) | 0,00 | 3(2416) | 0,10 | 6(2415) | 0,20 | 1 (2416) | 0,00 | 2 (2416) | 0,10 |
| | ORL 161 | 1 (2282) | 0,00 | 17(2293) | 0,70 | 9(2295) | 0,40 | 6(2295) | 0,30 | 10 (2295) | 0,40 | 4 (2295) | 0,20 |
| | ORL 181 | 7 (1595) | 0,40 | 79(1603) | 4,90 | 14(1602) | 0,90 | 1(1603) | 0,10 | 34 (1603) | 2,10 | 27 (1603) | 1,70 |
| | ORL 137 | 1(2404) | 0,00 | 5(2416) | 0,20 | 14(2416) | 0,60 | 16(2415) | 0,70 | 14 (2416) | 0,60 | 1 (2416) | 0,00 |
| | ORL 257 | 1 (1934) | 0,10 | 5 (1947) | 0,30 | 2 (1947) | 0,10 | 2 (1947) | 0,10 | 4 (1947) | 0,20 | 5 (1947) | 0,30 |
| | ORL 265 | 2 (1775) | 0,10 | 1 (1789) | 0,10 | 1 (1789) | 0,10 | 4 (1789) | 0,20 | 17 (1789) | 1,00 | 1 (1789) | 0,00 |
| | ORL 280 | 2 (3249) | 0,10 | 26 (3253) | 0,80 | 20 (3254) | 0,60 | 23 (3253) | 0,70 | 22 (3254) | 0,70 | 106 (3254) | 3,30 |
| | Medián | | 0,10 | | 0,50 | | 0,50 | | 0,25 | | 0,65 | | 0,25 |
| | Průměr | | 0,30 | | 8,60 | | 8,10 | | 8,19 | | 8,45 | | 9,04 |
| Mix | ORL 126 | 1 (2937) | 0,00 | 88(2952) | 3,00 | 33(2953) | 1,10 | 25(2951) | 0,80 | 43 (2953) | 1,50 | 9 (2953) | 0,30 |
| | ORL 187 | 222(1276) | 17,40 | 1174(1301) | 90,20 | 1181(1302) | 90,70 | 1185(1302) | 91,00 | 1179(1302) | 90,60 | 1185 (1302) | 91,00 |



Graf č. 2: Grafické srovnání stupně metylace (%) jednotlivých CpG v oblasti E2BS234 vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru. CpG 7860 $p = 0,95$; CpG 35 $p = 0,40$; CpG 41 $p = 0,10$; CpG 50 $p = 0,60$; CpG 56 $p = 0,20$.

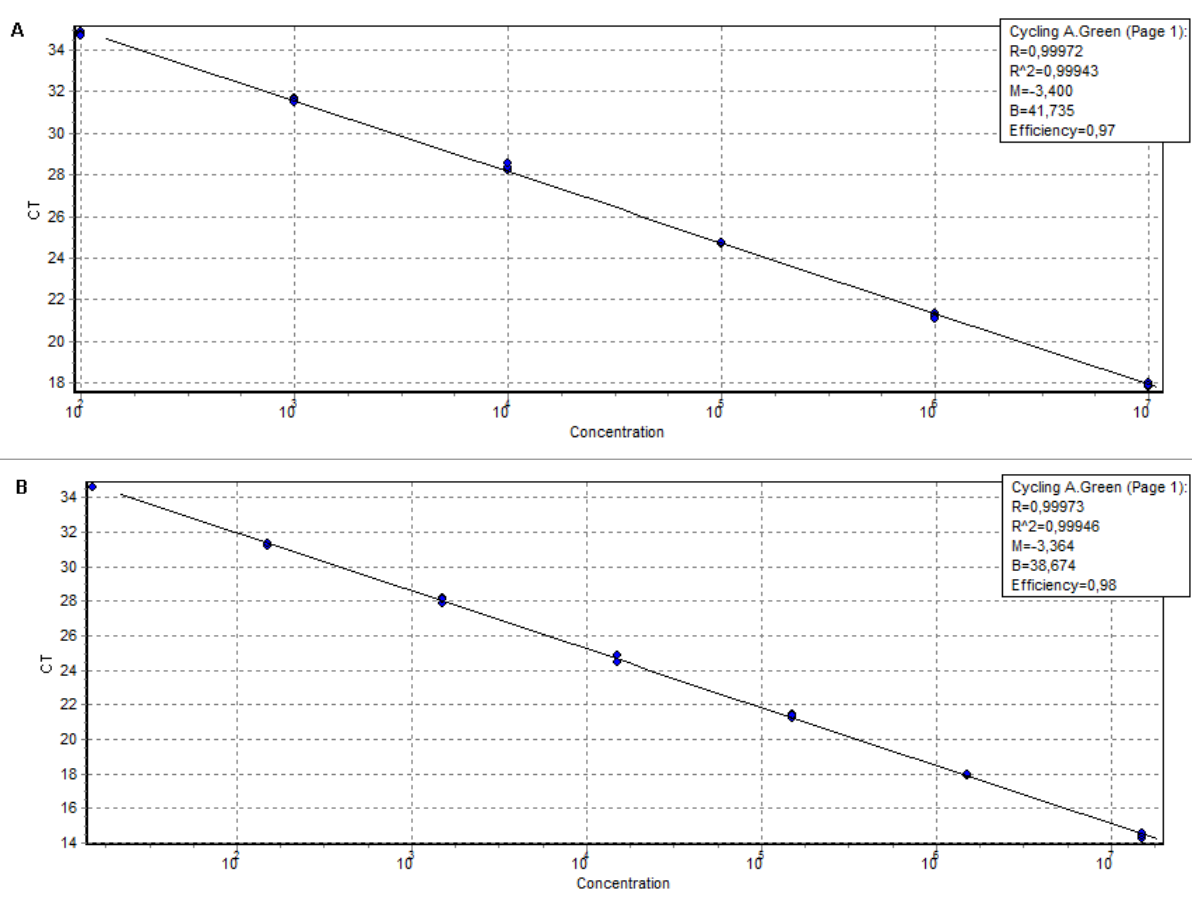


Graf č. 3: Znázornění stupně metylace (%) u vzorků s extrachromozomální (EX) a integrovanou (INT) formou viru A: celkové oblasti E2BS234 (průměr hodnot všech CpG), $p=0,02$; B: CpG oblasti E2BS3, $p=0,05$; C: CpG oblasti E2BS2, $p = 0,95$; D: CpG oblasti E2BS4, $p = 0,20$.

5.4. Kvantifikace virové nálože v nádorech

5.4.1. Příprava standardních křivek

Na přístroji NanoDrop 2000 jsem změřila koncentraci obou standardů použitých pro stanovení virové nálože. Průměrná koncentrace DNA HPV 16 dvou měření byla spočtena na 135,6 ng/μl. Průměrná koncentrace klonu *RNázy P* dvou měření byla spočtena na 1104,5 ng/μl. Ze změřených koncentrací jsem odvodila počet kopií, podle převodníku dostupného na webových stránkách společnosti Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>) a připravila jsem desítková ředění DNA standardu pro HPV 16 a standardu pro *RNázu P* od koncentrace 10^7 kopií/μl po 10^1 kopií/μl. Namíchaná ředění jsem použila pro přípravu standardních křivek pro kvantitativní PCR (graf č. 4A a B).



Graf č. 4A: Standardní křivka *E6* HPV 16. Osa x značí koncentraci (kopie genu/ μ l), osa y hodnotu Ct (cyklus); **4B: standardní křivka *RnÁzy P*.** Osa x značí koncentraci (kopie genu/ μ l), osa y hodnotu Ct (cyklus).

5.4.2. Určení virové nálože ve vzorcích ORL

Standardní křivku *RNÁzy P* jsem použila pro výpočet počtu buněk ve vzorcích ORL. *RNÁza P* se v diploidní buňce nachází ve dvou kopiích, proto byly získané hodnoty vyděleny dvěma. Vydělením koncentrace *E6* genu počtem buněk jsem získala hodnoty virové nálože (tabulka č. 18).

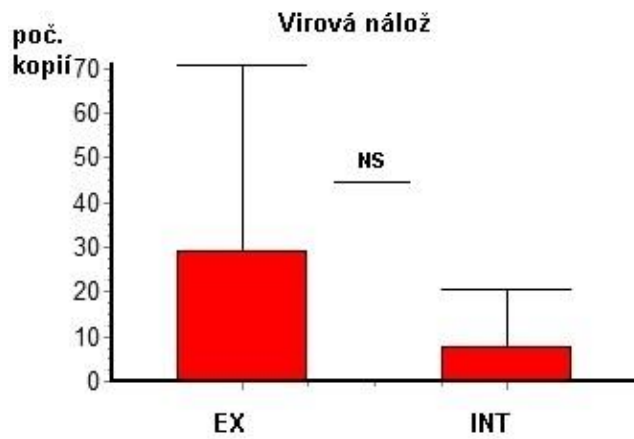
Pro určení, zda se liší virová nálož ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou viru, jsem použila program R. Nejdříve jsem pomocí Shapiro-Wilkova testu normality zjistila, že hodnoty virové nálože nevykazují normální rozdělení, proto jsem pro porovnání hodnot virové nálože použila neparametrický Mann-Whitney U test. Virová nálož se ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou DNA neliší ($p = 0,21$). Průměrné hodnoty virové nálože a mediány ukazuje tabulka č. 19. Protože soubor vzorků obsahuje 2 vzorky s mixovanou formou virové DNA, tyto dva vzorky jsem do analýzy nezahrnula. Graf č. 5 znázorňuje virovou nálož ve skupinách vzorků s rozdílným statutem, graf č. 6 znázorňuje závislost procenta nádorových buněk a virové nálože (lineární regrese).

Tabulka č. 18: Počet buněk ve vzorcích s užitím standardní křivky *RNázy P* a virová nálož vypočtená z množství kopií genu *E6* v 1 buňce. *C RNáza P* – počet kopií genu v haploidním genomu, *C HPV 16 E6* – počet kopií genu *E6* v měřeném vzorku, *K+* - pozitivní kontrola.

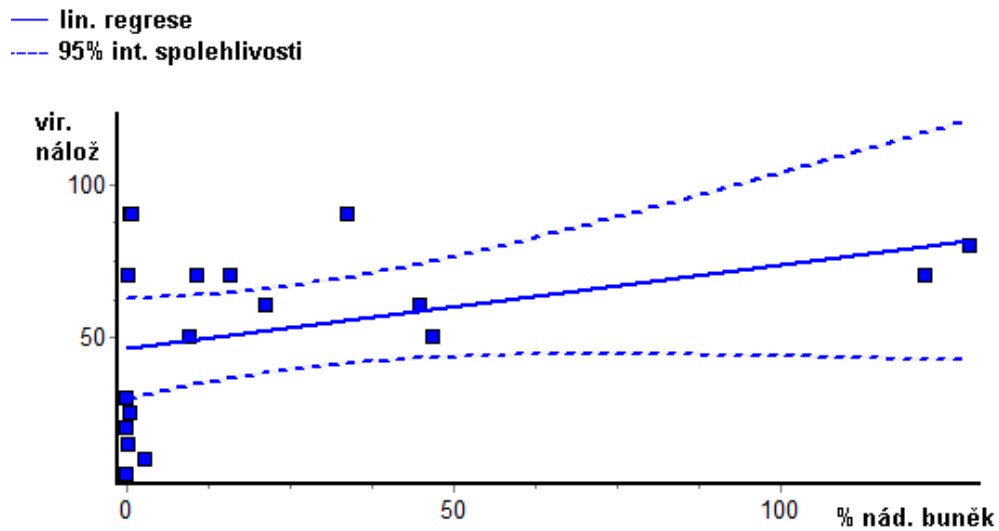
| Vzorek ORL | <i>C RNáza P</i> | počet buněk | <i>C HPV 16 E6</i> | Virová nálož |
|------------|------------------|-------------|--------------------|-----------------------|
| 104 | 115 654 | 57 827 | 136 | 2,36×10 ⁻³ |
| 111 | 253 942 | 126 971 | 81 917 | 0,65 |
| 116 | 340 199 | 170 099,50 | 1 833 949 | 10,78 |
| 125 | 669 040 | 334 520 | 21 751 | 0,07 |
| 126 | 1 432 677 | 716 338,50 | 87 136 | 0,12 |
| 128 | 558 608 | 279 304 | 53 143 | 0,19 |
| 133 | 316 952 | 158 476 | 2 501 478 | 15,78 |
| 155 | 601 442 | 300 721 | 128 443 | 0,43 |
| 160 | 643 851 | 321 925,50 | 53 528 | 0,17 |
| 161 | 1 159 391 | 579 695,50 | 12 302 977 | 21,22 |
| 181 | 555 663 | 277 831,50 | 2 645 415 | 9,52 |
| 187 | 526 330 | 2 631 650 | 32 147 966 | 122,16 |
| 137 | 106 483 | 53 241,50 | 47 828 | 0,90 |
| 257 | 47 870 | 23 935 | 3 086 478 | 128,95 |
| 265 | 325 515 | 162 757,50 | 7 323 488 | 45,00 |
| 243 | 238 609 | 119 304,50 | 342 972 | 2,87 |
| 244 | 162 973 | 81 486,50 | 2 751 181 | 33,76 |
| 280 | 619 681 | 309 840,50 | 14 500 314 | 46,80 |
| St 1 500 | 1 500 | 750 | 1 500 | 2,00 |
| K+ SiHa | 342 986 | 171 493 | 325 158 | 1,90 |
| K+ CaSki | 56 264 | 28 132 | 31 833 638 | 1 131,58 |

Tabulka č. 19: Srovnání virové nálože ve vzorcích s extrachromozomální a integrovanou formou viru.

| Extrachromozomální | | | Integrované | | |
|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|
| vzorek | % nádorových buněk | nálož viru (kopie/buňka) | vzorek | % nádorových buněk | nálož viru (kopie/buňka) |
| ORL 104 | 5-7 % | 2,36 × 10 ⁻³ | ORL 111 | >90 % | 0,65 |
| ORL 116 | >70 % | 10,78 | ORL 125 | >30 % | 0,07 |
| ORL 155 | 25 % | 0,43 | ORL 128 | 15-20 % | 0,19 |
| ORL 161 | >60 % | 21,22 | ORL 133 | >70 % | 15,78 |
| ORL 181 | >50 % | 9,52 | ORL 160 | >70 % | 0,17 |
| ORL 137 | 90 % | 0,90 | ORL 243 | 10-15 % | 2,87 |
| ORL 257 | 80 % | 128,95 | ORL 244 | 90 % | 33,76 |
| ORL 265 | 60 % | 45,00 | průměr | | 7,64 |
| ORL 280 | 50 % | 46,80 | medián | | 0,65 |
| průměr | | 29,29 | Mixované | | |
| medián | | 10,78 | ORL 187 | >70 % | 122,16 |
| | | | ORL 126 | 20 % | 0,12 |
| | | | průměr | | 61,14 |
| | | | medián | | 61,14 |



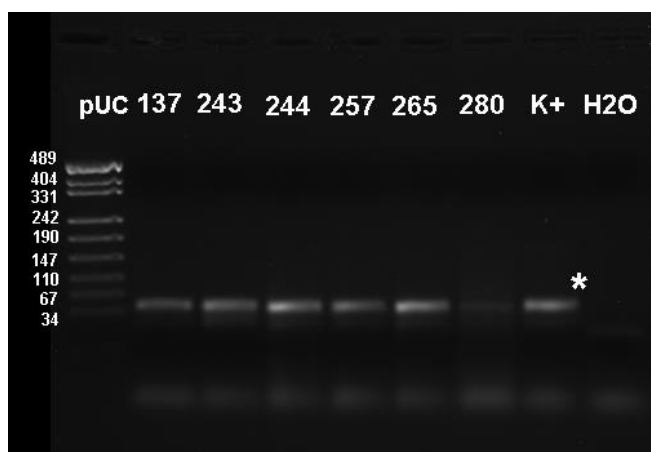
Graf č. 5: Srovnání virové nálože ve vzorcích s extrachromozómalní (ex) a integrovanou (int) formou viru, $p = 0,21$).



Graf č. 6: Graf závislosti % nádorových buněk a virové nálože.

5.4.3. Detekce exprese *E6* a *E7* genu

U vzorků ORL 137, 257,265, 243, 244 a 280 jsem ověřila, že dochází k expresi *E7* genu. Provedla jsem PCR s cDNA vzorků jako templátem a primery detekujícími *E7* gen. cDNA ORL vzorků 137 a 243 jsem připravila dle popisu v kapitole 5.5.1., cDNA ostatních vzorků připravila Mgr. Vojtěchová. Výsledky detekce *E7* genu jsou znázorněny na obrázku č. 18 a celkové výsledky detekce exprese *E6* a *E7* genu v tabulce č. 20.



Obrázek č. 18: Detekce exprese genu *E7*. pUC – žebříček (bp) pUC18/MSPI, K+ DNA CaSki. Velikost očekávaného produktu o velikosti asi 69 bp pro přehlednost znázorněna hvězdičkou pouze u K+. Detekci exprese genu *E6* provedla a u všech vzorků potvrdila Mgr. Vojtěchová.

Tabulka č. 20: Shrnutí detekce exprese *E6* a *E7* genu. Vzorky označené * analyzovala Mgr. Vojtěchová.

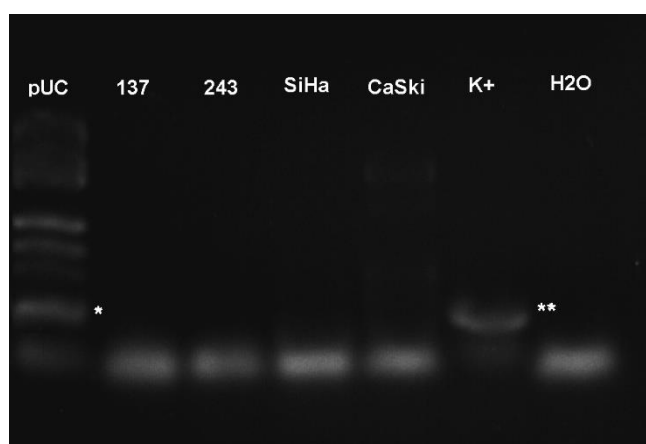
| Vzorek ORL | Detekce <i>E6</i> | Detekce <i>E7</i> |
|------------|-------------------|-------------------|
| 104 | +* | +* |
| 111 | +* | +* |
| 116 | +* | +* |
| 125 | +* | +* |
| 126 | +* | +* |
| 128 | +* | +* |
| 133 | +* | +* |
| 137 | +* | + |
| 155 | +* | +* |
| 160 | +* | +* |
| 161 | +* | +* |
| 181 | +* | +* |
| 187 | +* | +* |
| 243 | +* | + |
| 244 | +* | + |
| 257 | +* | + |
| 265 | +* | + |
| 280 | +* | + |

5.5. Stanovení hladiny exprese *E6* a *E7* ve vzorcích

5.5.1. Příprava cDNA

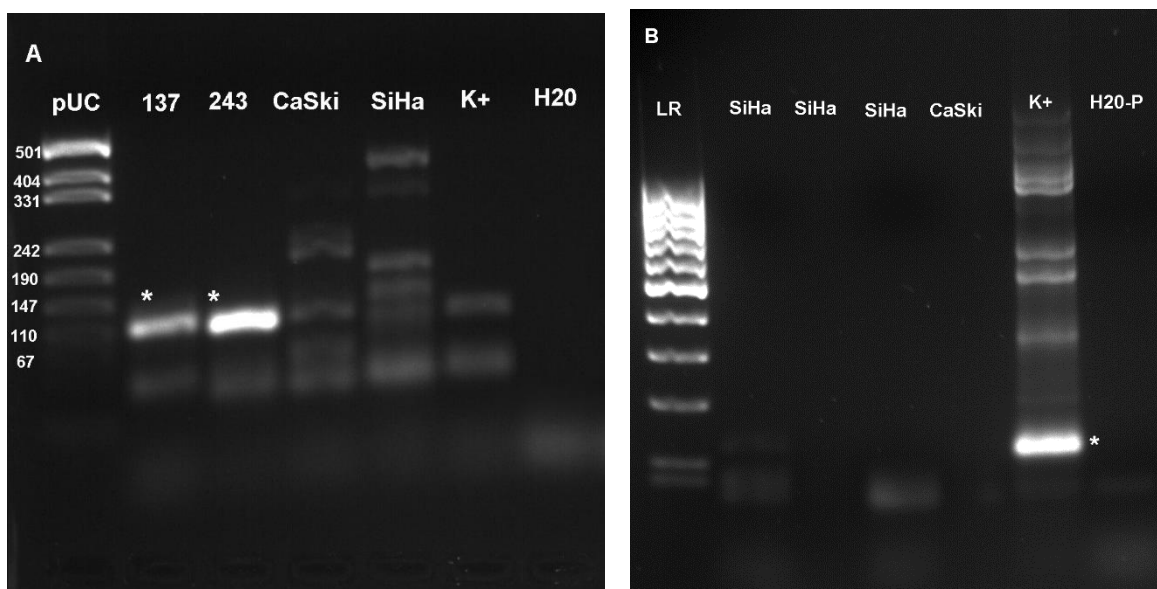
Připravila jsem cDNA vzorků ORL 137 a 243. Nejdříve jsem odstranila zbytkovou DNA ve vzorcích RNA působením DNázy. Úspěšnost odstranění zbytkové DNA jsem ověřila PCR s primery amplifikujícími reportérový gen *β-globin*.

DNázování jsem provedla i u linie CaSki a SiHa, ale kontrolní PCR po DNázování byla pozitivní, což značí přítomnost zbytkové DNA. Proto jsem snížila množství vstupní RNA a prodloužila inkubaci RNA s DNázou. Kontrolní PCR po DNázování byla v pořádku, nedošlo k amplifikaci zbytkové DNA (obrázek č. 19). Reakce pro kontrolu cDNA po reverzní transkripci však byla také negativní.



Obr. č. 19: Výsledek *β-globinové* reakce po DNázování. Negativní výsledek potvrzuje úspěšnost reakce. Jako žebříček (bp) - pUC – pUC18/MSPI, jako pozitivní kontrola (K+) DNA buněčné linie SiHa. * proužek žebříčku odpovídající velikosti 110bp, ** produkt K+ o velikosti 110 bp.

Reverzní transkripci RNA jsem získala cDNA ORL vzorků 137 a 243. Kontrolou úspěšné reverzní transkripce je opět PCR s primery pro *β-globin*, v případě vzorků 137 a 243 byla pozitivní, což značí přítomnost cDNA v reakci (obrázek č. 20A). Reakce s buněčnou linií CaSki a SiHa nepřinesla dostatečné množství cDNA pro další reakce (obrázek č. 20B). Z toho důvodu bude nutné připravit novou RNA z těchto kontrolních buněčných linií a pokus opakovat.

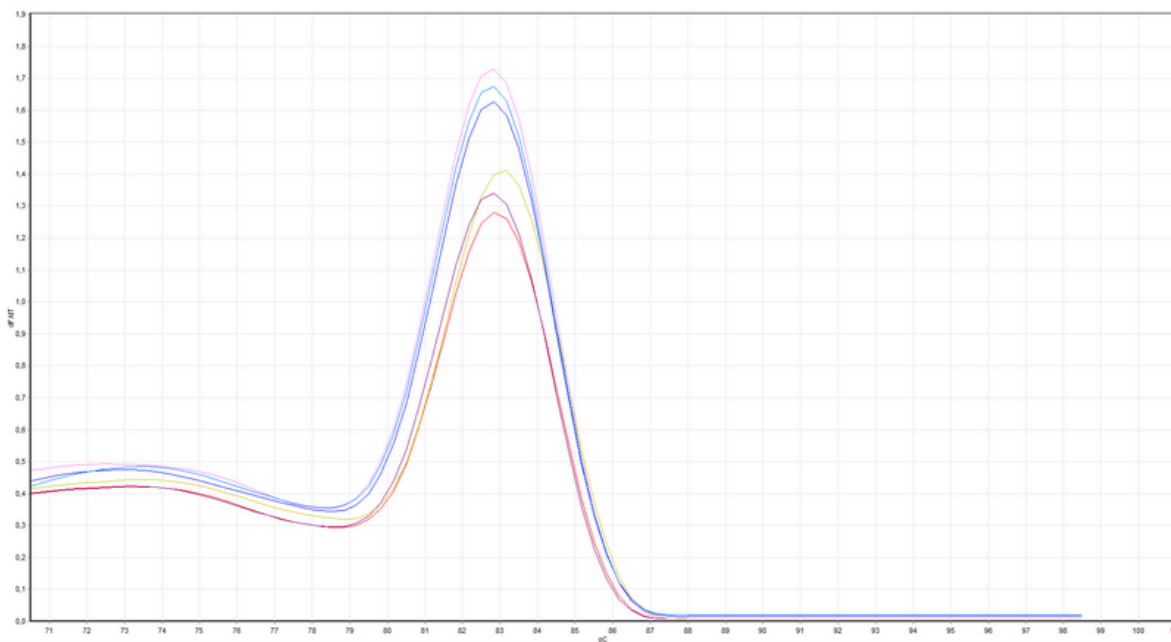


Obr. č. 20A: Potvrzení správného průběhu reverzní transkripce vzorků ORL 137 a 243, buněčná linie CaSki a SiHa vykazovala nespecifické produkty. pUC – žebříček (bp) pUC18/MSPI, K+ pozitivní kontrola (DNA linie SiHa), * označen žádaný produkt o velikosti 110 bp. **B: znázornění nízkého výtěžku** reverzní transkripce linie CaSki a SiHa. Jako žebříček (bp) byl použit MassRuller Low Range (Fermentas, USA) - LR, K+ - pozitivní kontrola (DNA SiHa), očekávaná velikost produktů označena *.

5.5.2. Optimalizace kvantitativní PCR

Pro určení hladiny exprese virových genů *E6* a *E7* bylo nutné optimalizovat reakce s barvivem SYBR®Green I. Provedla jsem tzv. melting analýzu (graf č. 7). Hladký průběh křivky ukazuje, že koncentrace a barvivo SYBR®Green I byly vhodně zvoleny, a že se během reakce netvoří nespecifické produkty. Tuto reakci jsem provedla s DNA jako templátem a primery pokrývajícími oblast *E6* genu. Tento templát a primery jsem záměrně použila proto, neboť jsem v předešlých pokusech potvrdila (viz sekce 5.4), že tyto primery správně amplifikují danou oblast.

Pro RT-qPCR budu připravovat dostatečné množství kvalitní cDNA buněčné linie SiHa pro vytvoření desítkového ředění a připravovat standardní křivku, abych mohla následně určit hladinu exprese *E6* a *E7* genů ve vzorcích.



Graf č. 7: Výsledek melting analýzy při použití barviva SYBR®Green I.

6. Diskuze

Již v roce 1935 Rous a Beard pozorovali, že bradavice králíka vyvolané virem králíčího papilomaviru mohou prodělat proces neoplastické transformace (Rous & Beard, 1935). U lidí byla asociace papilomaviru s maligní transformací poprvé zjištěna u pacientů se vzácným kožním onemocněním *Epidermodysplasia verruciformis* a v roce 1983 byl virus poprvé izolován z karcinomu děložního čípku (Durst *et al.*, 1983). Příčina karcinogeneze HPV byla zprvu přikládána pouze přítomnosti virových onkoproteinů. Pozdější výzkum ukázal, že virová DNA se ve vzorcích často nachází v integrované formě, přičemž k integraci dochází především v oblastech kódujících E2 protein, který je důležitým regulátorem exprese virových onkoproteinů a jeho inaktivace vede ke zvýšené expresi těchto proteinů. Právě zvýšená exprese E6/E7 onkoproteinů je považována za důležitý faktor v procesu nádorové transformace. Alternativní mechanismy vedoucí k transformaci v nádorech s integrovanou formou viru byly recentně navržené na základě výsledků komplexních metagenomických studií. Stále však není objasněný mechanismus nádorové transformace u HPV asociovaných malignit s extrachromozomální formou viru.

Protože řada studií ukázala zvýšené množství produktů virových onkoproteinů i v nádorech s extrachromozomální formou viru, je možné, že existují alternativní cesty inaktivace exprese E2 proteinu. Recentní studie ukazují, že epigenetické modifikace virové DNA, a to především DNA metylace, mohou ovlivnit vazbu E2 proteinu do oblasti promotoru (E2BS) virových onkoproteinů, a tím změnit hladinu jejich exprese. Chaiwongkot a kol. (2013) ukázali, že existuje kvantitativní rozdíl v metylaci E2BS u nádorů cervixu s extrachromozomální a integrovanou formou viru. Další studie zkoumaly alternativní mechanismy inaktivace exprese E2 proteinu, ale většina studií byla prováděna na nádorech hrdla děložního a téměř žádná nestudovala komplexně možné mechanismy ovlivňující expresi E6 a E7 proteinů. V této studii jsem se tedy snažila u nádorů hlavy a krku s různou formou virového genomu definovat stupeň metylace E2 vazebných míst, přítomnost případných mutací, expresi E6 a E7 proteinů a virovou nálož, jako alternativní mechanismy vedoucí ke karcinogenezi, zejména pro virus s extrachromozomální formou genomu.

V naší studii jsem použila velmi citlivou metodu detekce virových integrant zvanou APOT assay. Na takto charakterizovaných klinických materiálech jsem dále komplexně analyzovala alternativní mechanismy vedoucí k inaktivaci represivní funkce E2 proteinu. Vedle detekce mutací v LCR ve vazebných místech pro E2 protein jsem zjišťovala

kvantitativně hladinu metylace těchto míst, ověřovala jsem expresi virových onkogenů a virovou nálož.

Sekvence 682 bp dlouhé oblasti LCR neidentifikovala mutace oblasti E2BS v žádném z 18 analyzovaných vzorků, což je v rozporu s myšlenkou, že by mutace v těchto místech mohla bránit vazbě proteinu E2 a podpořit tím expresi virových onkoproteinů. Výsledky analýzy stupně metylace přinesly rozporuplné výsledky. Rozdíl ve stupni metylace jednotlivých CpG u vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru nebyl pro žádný z nich statisticky významný, avšak při srovnání průměrné hodnoty procent metylace všech CpG oblasti E2BS234 u vzorků s integrovanou formou byla metylace této oblasti signifikantně vyšší než u vzorků s extrachromozomální formou viru ($p = 0,02$). Při analýze jednotlivých oblastí E2BS jsem detekovala statisticky významný rozdíl pro E2BS3 ($p = 0,05$) Pro ostatní oblasti byl rozdíl statisticky nevýznamný. Zvýšená hladina metylace pro virus s DNA ve formě extrachromozomální byla u cervikálních karcinomů navrhována jako možné vysvětlení karcinogeneze viru s právě touto formou genomu (Chaiwongkot *et al.*, 2013). Výsledky naší studie však tuto hypotézu nepodporují. U všech vzorků bez ohledu na status virového genomu však byly transkribované virové onkoproteiny. U viru s extrachromozomální formou genomu tedy nebyly detekovány ani mutace v E2 vazebných místech, ani jsme neprokázali vliv metylace na karcinogenezi, nicméně obsahují vyšší virovou nálož oproti vzorkům integrovaným, i když výsledky nejsou signifikantní. Mechanismus karcinogeneze zejména u nádorů s extrachromozomální formou viru tak zůstává neobjasněn. Nesignifikance výsledků může ale být způsobena malým počtem vzorků ve studii. V dalších pokusech budeme měřit hladinu exprese virových genů *E6* a *E7*, k čemuž nás vedou výsledky studií ukazujících, že zvýšená virová nálož pozitivně koreluje s hladinou exprese těchto genů (Hafkamp *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010; Weinberger *et al.*, 2006). Zvýšená virová nálož by mohla částečně objasnit další mechanismus karcinogeneze HPV.

U vzorků, kde nebyl před touto studií určený status virového genomu, jsem provedla analýzu velmi citlivou metodou APOT. Metoda APOT, na rozdíl od často používané metody detekce poměru genu *E2* a *E6*, je citlivější a navíc umožňuje přesně identifikovat pozici případné integrace, strukturu virových transkriptů a přítomnost mixovaných forem (Vojtechova *et al.*, 2016). Určení virového statusu jsem provedla na základě analýzy gelové elektroforézy produktů druhé PCR a sekvenace ampliconů metody APOT. Autoři některých studií dále provádí hybridizaci produktů druhé PCR s *E4* a *E7* specifickou próbou (Klaes *et al.*, 1999). Pro přesnou identifikaci integračních míst je

však třeba provést sekvenaci produktů druhé PCR. Vzorky jsem však též, pro případ, že bych po sekvenaci nezískala průkazné výsledky, převedla alkalickým transferem na nylonovou membránu pro možnou hybridizaci s próbami specifickými k *E4* a *E7*. U zbývajících vzorků metodu APOT provedla Mgr. Vojtěchová. Z 18 vzorků zahrnutých v naší studii 9 (50 %) obsahovalo extrachromozomální, 7 (39 %) integrovanou formu viru a 2 (11 %) vzorky obsahovaly formu mixovanou. Předchozí studie Rotnáglové a kol. (2011) detekovala integrovanou formu u 64 % vzorků. Podobně studie Hafkampové a kol. (2003) detekovala integraci ve 21 % HNSCC, jiná studie prováděná na tonsilárních karcinomech našla integrovanou formu v 41 % a mixovanou v 52,9 % vzorků a extrachromozomální formu viru pouze v 5,9 % vzorků (Kim *et al.*, 2007). Přítomnost viru s mixovanou formou genomu byla publikována i ve studii Olthofa a kol. (2015). U všech 7 vzorků s integrovanou virovou DNA byla integrace detekována v místě nukleotidu 880, což odpovídá integračnímu typu A (Klaes *et al.*, 1999). U vzorku ORL 243 došlo k integraci v místě proteinu TP63, což je buněčný transkripční faktor příbuzný p53 a je transkripčním aktivátorem proteinů účastnících se indukce apoptózy (Yang *et al.*, 1998). Integrace v oblasti tohoto genu byla také detekována v práci Vojtěchové a kol. (2016) a v dalších pracích (Kalantari *et al.*, 2001; Wentzensen *et al.*, 2002). Toto místo je dle Olthofa a kol. (2014) častým místem integrace, nacházející se ve fragilní oblasti chromozomu. Častější integraci ve fragilních místech popisuje také Wentzensen a kol. (2002). U vzorku ORL 244 došlo k integraci v oblasti genu *CDC37*, jehož produkt působí jako ko-chaperon („spolu-průvodce“ správné konformace proteinu), tvoří komplex s cyklin dependentními kinázami a účastní se drah signální transdukce (Gerber *et al.*, 1995). Protein *CDC37* není v jiných studiích spojen s nádory indukovanými HPV, byl ale ve zvýšené míře nalezen ve vzorcích karcinomu prostaty (Stepanova *et al.*, 2000).

Výsledky sekvenace LCR HPV detekovaly mutace v různých oblastech LCR HPV, avšak žádné v oblasti E2BS. Podobné výsledky publikovat i Cheung a kol. (2013) a Chaiwongkot a kol. (2013), obě studie však analyzovaly vzorky cervikálních karcinomů. U nádorů hrdla děložního naopak Kahla a kol. (2014) detekovali mutaci E2BS, kdy nukleotidová změna cytosinu na adenin v pozici 3684 vedla ke změně kódované aminokyseliny z threoninu na lysin a byla spojena s vyšší expresí virových onkoproteinů. Autoři této studie hypotetizují, že tato mutace znemožňuje vazbu regulačního proteinu E2. V naší studii jsme neprokázali přítomnost mutací, které by mohly ovlivnit vazbu proteinu E2 do E2BS. Sekvence vzorku ORL 104 obsahovala 11 mutací. Sekvenace tohoto vzorku

byla problematická, nepodařilo se sekvenovat posledních 16 nukleotidů. S použitím zpětného primeru není počáteční sekvence čitelná a sekvenace s vnitřním primerem se do tohoto místa nepročetla. U 14 z 18 vzorků jsem detekovala záměnu guaninu na adenin v pozici nukleotidu 7518 virové DNA. V tomto místě dochází k vazbě faktoru YY1. Tento protein se váže do oblasti promotoru p97 a vede k represi transkripce z tohoto promotoru. Lace a kol. (2009) ukázal, že mutace ve vazebných místech pro YY1 mohou zamezit vazbě tohoto faktoru, tím může probíhat transkripce z p97, což vede k nárůstu množství virových onkoproteinů. Frekvence mutací u vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru je obdobná, 77,8 % pro extrachromozomální a 71 % pro integrované. Další mutace LCR jsem identifikovala v místech vazby proteinu Tef a NF1, které se nachází v těsné blízkosti promotoru p97, oblasti tzv. „enhanceru“ (zesilovače transkripce). Tyto dva faktory působí synergicky a mutace v jejich vazebných oblastech zabraňuje jejich funkcím aktivátoru transkripce (Chong *et al.*, 1991). Tyto mutace by spíše měly mít negativní vliv na množství virových onkoproteinů. Mutace v těchto vazebných oblastech byly detekovány pouze u dvou ORL vzorků.

V samém počátku mojí práce jsme zamýšleli detekovat kvalitativně přítomnost metylace v E2BS. Vzhledem k tomu, že se ve studii Chaiwongkota a kol. (2013) ukázalo, že spíše než prostá přítomnost metylace je významná její hladina, změnili jsme původně plánovaný přístup sekvenace E2BS pomocí Sangerovy metody a provedení kvalitativní analýzy metylace na kvantitativní analýzu NGS. Pro nás dostupnou platformou umožňující kvantitativní analýzu metylovaných sekvencí bylo 454 pyrosekvenování na přístroji GS Junior. Tento přístroj je schopen analyzovat velké množství oddělených sekvenačních reakcí a zároveň je kvantifikovat. Pro určení stupně metylace jsem provedla bisulfidické ošetření virové DNA, následná amplifikace oblasti E2BS vyžaduje primery navržené pro konvertovanou DNA. Nejdříve jsem využila sekvence primerů publikované ve studii Chaiwongkot a kol. (2013), pracovala jsem s polymerázou AmpliTaq Gold. Použití této polymerázy vedlo i přes snahu o optimalizaci k nespecifickým produktům. Proto jsem použila DNA polymerázu doporučenou pro amplifikaci konvertované DNA, a to HotStart ZymoTaq. Amplifikační reakce oblasti E2BS234 vedla k produkci amplikonů správné velikosti, což jsem potvrdila elektroforeticky i sekvenací, ale k amplifikaci oblasti E2BS1 nedošlo. Sekvenací produktů E2BS1 získaných amplifikací s využitím polymerázy AmpliTaq Gold jsem zjistila, že výsledné sekvence neodpovídají referenční sekvenci, a dále jsem nebyla schopna nalézt sekvenci primerů na referenční sekvenci. Přesné určení sekvence produktu amplifikace konvertované DNA či primerů je obtížné, neboť volně

dostupné programy pro vyhledávání srovnávání sekvencí (např. NCBI BLAST) operují pouze s divokými nekonvertovanými genomy. Pro srovnání získaných amplikonů je nutné konvertovat celý virový genom a až poté sekvence porovnávat. Je třeba vzít též v úvahu, že konverze virové DNA nemusí být 100 %. Námí využívaný soubor reagensů pro konverzi - EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, USA) udává 99,5% konverzi, avšak příliš velké množství vstupní DNA může snížit účinnost konverze. Navrhla jsem tedy nové primery pro amplifikaci oblasti E2BS1, jejichž funkčnost jsem ověřila sekvencí. Reakce pro přípravu knihoven pro NGS sekvenování vyžadují definovanou koncentraci amplikonů první PCR. Pro optimalizační PCR jsem využila buněčnou linii CaSki, neboť analyzované ORL vzorky pochází z velmi cenného klinického materiálu, kterého je k dispozici pouze omezené množství. Buněčná linie CaSki je odvozena z cervikálního karcinomu, obsahuje asi 600 kopií virového genomu v 1 buňce a vykazuje vysoký stupeň metylace (Badal *et al.*, 2003). Při snaze o amplifikaci vzorků ORL jsem zjistila, že poznatky získané optimalizací buněčné linie CaSki nemohou být aplikovány pro amplifikaci klinických vzorků. Mnou používaná buněčná linie CaSki obsahuje až 1 100 kopií virové DNA, ORL vzorky, odvozené od karcinomů tonsil obsahují různá množství kopií virové DNA (rozmezí $2,36 \times 10^3$ – 128,95 kopií/buňka), navíc se liší % nádorových buněk v jednotlivých vzorcích ORL (5-90 %). Tím mohou být vysvětleny rozdílné výsledky amplifikace prováděné za stejných podmínek. Z metylační studie musel být vyřazen vzorek ORL 104, neboť se nezdařila amplifikace E2BS. Výsledky analýzy mutací LCR ORL 104 ukázaly, že vzorek obsahuje 2 mutace v místě primerů pro oblast E2BS234 (mutace v pozici 7482 a 7486), tato mutace pravděpodobně zabraňuje nasedání primerů a znemožňuje amplifikaci s takto navrženými primery. Pyrosekvenováním amplikonů jednotlivých E2BS jsem pro každou oblast ORL vzorků získala přes 2 000 čtení. Vysoký počet čtení může být způsoben relativně krátkou sekvencí amplikonů, která se i s adaptorovými sekvencemi pro NGS pohybovala okolo 250 bp. Analýza metylace delších amplikonů může způsobovat problémy, neboť velké množství thyminů v sekvenci ztěžuje průběh sekvenace a následnou analýzu přístrojem. Toto je jeden z důvodů, proč se nyní od pyrosekvenování upouští a přednost se dává např. platformě firmy Illumina - MiSeq, která dává možnost sekvenovat větší počet genů (oblastí) během jediné sekvenovací reakce. Na druhou stranu, i recentní studie Bryanta a kol. (2014b) využívá metody pyrosekvenování pro svou metylační analýzu. Při analýze sekvencí v programu GS Amplicon Variant Analyzer dochází k odfiltrování sekvencí, které nesplňují zadaná kritéria. Vyloučené sekvence vykazovaly stupeň konverze v rozmezí 80- 93,3%. Nízký

stupeň konverze může být způsoben manuální chybou při přípravě vzorků či samotné bisulfidické konverzi nebo při emulzní PCR došlo k preferenční amplifikaci fragmentů s nízkým stupněm konverze. V dalším případě byla důvodem vyloučení sekvencí z analýzy jejich nízká podobnost. V případě vzorku ORL 125 oblasti E2BS234 může být nízký počet sekvencí vysvětlen odlišným postupem přípravy DNA knihovny. Analýzou průběhu druhé PCR jsem zjistila, že se tvoří dva typy produktů, což nezměnila ani optimalizace této reakce. Produkt správné velikosti jsem vyizolovala z gelu, a dále zpracovala jako ostatní výsledky. Je možné, že došlo k částečné amplifikaci nespécifického produktu, výsledné sekvence proto nebyly programem QUMA zahrnuty do analýzy.

Výsledky metylačních analýz publikovaných studií nejsou jednoznačné. Ve studii Chaiwongkote a kol. (2013) byla zjištěna vyšší hladina metylace u nádorů cervikálních karcinomů s extrachromozomální formou viru podobně jako ve studii Cheunga a kol. (2013), což je v rozporu s našimi výsledky pro celkovou oblast E2BS234. Oproti tomu studie Bryanta a kol. (2014a) ukazuje stejný stupeň metylace ve vzorcích s integrovanou a extrachromozomální formou viru. Výsledky analýzy E2BS karcinomů hlavy a krku ukazují zvýšený stupeň metylace u vzorků s integrovanou formou viru avšak intaktní sekvencí *E2* a nízký stupeň metylace u vzorků s přerušenu *E2* sekvencí (Reuschenbach *et al.*, 2015). V uvedené práci analyzovali zvláště jednotlivá E2BS, oblasti E2BS3 a 4 vykazovaly vysokou hladinu metylace a oblast E2BS1 nízký stupeň metylace, který pro různý virový statut nebyl signifikantně rozdílný. Vysoká metylace vzorků s integrovanou formou viru a intaktní *E2* oblastí E2BS3 a 4 byla navíc spojena s nízkou hladinou exprese tohoto proteinu. Naše studie taktéž nedetekovala signifikantní rozdíl v stupni metylace oblasti E2BS1a detekovala zvýšený stupeň metylace u vzorků s integrovanou formou viru, avšak signifikantní jsou pouze pro oblast E2BS3. U některých vzorků ORL naší studie byla provedena analýza sekvencí *E2* genu, tzv. *E2* mapování, u žádného vzorku nebyla detekována intaktní sekvence *E2* genu (Vojtechova *et al.*, 2016). V jiné studii nádorů orofaryngu Zhang a kol. (2015) také detekoval vysokou hladinu metylace oblastí E2BS, navíc včetně vyšší metylace i oblasti E2BS1, nicméně metylace oblasti E2BS2 byla v této studii velmi nízká. V této studii ale vzorky nejsou rozděleny podle virového statusu. Zhang detekoval hypometylaci E2BS2 i u buněčné linie CaSki a linie odvozené od karcinomu jazyka. Celkový stupeň metylace p97 srovnával s virovou náloží, avšak nedetekoval signifikantní výsledky.

Ve vzorcích s integrovanou formou viru se zdá, že hladina metylace souvisí s počtem integrovaných kopií. Vysoký stupeň metylace je spojen s mnohočetnou integrací,

kdežto nízký stupeň s integrací 1 – 2 kopií virového genomu. Vysoký stupeň metylace může odrážet schopnost viru umlčovat transkripci nadbytečných kopií genomu (Chaiwongkot *et al.*, 2013). V souboru vzorků, které jsem analyzovala, byly vzorky s integrovaným genomem a s vyšším stupněm metylace. Tyto vzorky byly v předešlé studii analyzované i metodou Southern blot, která umožňuje stanovit případnou přítomnost integrovaných tandemových opakování. Z 9 integrovaných a mixovaných vzorků, které jsem analyzovala a měly vyšší procento metylovaných CpG, byly 3 analyzovány Southern blotem ve studii Vojtěchové a kol. (2016) a u 2 byla skutečně identifikována integrace v tandemových opakováních. Naše výsledky tedy podporují hypotézu, že vysoká metylace může souviset s umlčováním části kopií virového genomu.

Na hladinu onkoproteinů má dle studií vliv virová nálož. Do analýzy virové nálože jsem mimo ORL vzorků zařadila i buněčnou linii CaSki a SiHa. Uvádí se, že buněčná linie CaSki obsahuje asi 600 kopií genomu HPV 16 (Badal *et al.*, 2003), což je přibližně 2× méně než je výsledek mého měření (1 131 kopií). Vyšší než udávaný počet kopií může být způsobem stářím buněčné linie a počtem pasážování. Na druhou stranu, počet kopií genomu HPV 16 v buňkách linie SiHa (1 – 2 kopie/buňka) odpovídá výsledkům jiných studií. Průměrné hodnoty virové nálože i medián vzorků s extrachromozomální a integrovanou formou viru se v naší studii liší, avšak podle Mann-Whitney U testu rozdíl na 5% hladině významnosti není signifikantní. Protože se ORL vzorky lišily i počtem nádorových buněk, ověřovala jsem, zda tato hodnota ovlivňuje výslednou virovou nálož. Zjistila jsem ale, že množství virové nálože nekoreluje s procentem nádorových buněk ve vzorcích. Vztah virové nálože a hladiny E6 a E7 proteinů bude ještě předmětem dalšího zkoumání.

Výsledky jiných studií analyzujících vztah virové nálože a statusu virového genomu se příliš neshodují. Vyšší hodnoty virové nálože byly u vzorků s extrachromozomální formou viru zjištěny v několika studiích (Das *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2013), zatímco Cheung a kol. (2013) a Olthof a kol. (2015) tento rozdíl nepozorovali. Případná zvýšená virová nálož v nádorech hlavy a krku má dle některých studií vliv na hladinu exprese virových onkoproteinů (Jung *et al.*, 2010; Weinberger *et al.*, 2006), ale Olthof a kol. (2015) tuto souvislost neprokázal. Jiná práce ve vzorcích s vysokou virovou náloží detekovala jak zvýšenou, tak sníženou transkripční aktivitu viru (Holzinger *et al.*, 2012). Recentní analýza vzorků cervikálních karcinomů ukazuje zvýšenou hladinu E6 a E7 mRNA u vzorků s vysokou virovou náloží (Baron *et al.*, 2015). Možná korelace virové nálože a hladiny exprese virových onkoproteinů tedy není zatím jednoznačně potvrzena.

Zvýšená virová nálož a tomu odpovídající zvýšené množství E6 a E7 transkriptů by mohlo být alternativním mechanismem karcinogeneze viru s extrachromozomální formou genomu. Pokračováním mé práce bude ještě kvantifikace transkriptů E6 a E7 a hledání případné korelace s virovou náloží. Pokud neprokážeme zvýšenou hladinu transkriptů E6 a E7 budou naše data spíše podporovat výsledky studie Hafnera a kol. (2008), který naznačuje, že spíše než zvýšená hladina transkriptů virových onkogenů, je pro transformační proces nutná jejich kontinuální detekovatelná transkripce.

7. Souhrn

Ve své studii jsem určila velice citlivou metodou status virového genomu v buňkách, shodně s dalšími studii nebyla virová DNA integrovaná ve všech vzorcích. Analýza mutací LCR potvrdila přítomnost mutace v místě vazebného místa YY1 vedoucí potenciálně ke zvýšené transkripci E6 a E7, ale mutace ve vazebných místech pro E2 protein nalezené nebyly. Také metylační analýza nenalezla rozdíly v hladině metylace v závislosti na statusu virového genomu. Virové onkoproteiny byly ale transkribované ve všech vzorcích bez ohledu na formu virového genomu. Virová nálož byla nesignifikantně vyšší u nádorů s extrachromozomální formou viru, ale nekorelovala s počtem nádorových buněk ve vzorku. K dokončení komplexní analýzy ještě zbývá kvantifikace E6 a E7 mRNA. Na základě současných výsledků můžeme pouze hypotetizovat, že důležitá je kontinuální transkripce *E6* a *E7* spíše než zvýšená hladina transkriptů virových onkogenů, a že epigenetické modifikace genomu hostitelské buňky mohou hrát významnou roli při nádorové transformaci u HPV pozitivních vzorků s extrachromozomální formou viru.

8. Seznam literatury

- Abramson, A. L., Brandsma, J., Steinberg, B. & Winkler, B. (1985). Verrucous carcinoma of the larynx. Possible human papillomavirus etiology. *Arch Otolaryngol* **111**, 709-715.
- 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 Res* **24**, 185-199.
- Anantharaman, D., Muller, D. C., Lagiou, P., Ahrens, W., Holcatova, I., Merletti, F., Kjaerheim, K., Polesel, J., Simonato, L., Canova, C., Castellsague, X., Macfarlane, T. V., Znaor, A., Thomson, P., Robinson, M., Conway, D. I., Healy, C. M., Tjonneland, A., Westin, U., Ekstrom, J., Chang-Claude, J., Kaaks, R., Overvad, K., Drogan, D., Hallmans, G., Laurell, G., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Agudo, A., Larranaga, N., Travis, R. C., Palli, D., Barricarte, A., Trichopoulou, A., George, S., Trichopoulos, D., Quiros, J. R., Grioni, S., Sacerdote, C., Navarro, C., Sanchez, M. J., Tumino, R., Severi, G., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Panico, S., Weiderpass, E., Lund, E., Gram, I. T., Riboli, E., Pawlita, M., Waterboer, T., Kreimer, A. R., Johansson, M. & Brennan, P. (2016). Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol*.
- Badal, V., Chuang, L. S., Tan, E. H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., Li, B. F. & Bernard, H. U. (2003). CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* **77**, 6227-6234.
- Balz, V., Scheckenbach, K., Gotte, K., Bockmuhl, U., Petersen, I. & Bier, H. (2003). Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* **63**, 1188-1191.
- Baron, C., Henry, M., Tamalet, C., Villeret, J., Richet, H. & Carcopino, X. (2015). Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *J Med Virol* **87**, 1389-1396.
- Beachler, D. C., Guo, Y., Xiao, W., Burk, R. D., Minkoff, H., Strickler, H. D., Cranston, R. D., Wiley, D. J., Jacobson, L. P., Weber, K. M., Margolick, J. B., Sugar, E. A., Reddy, S., Gillison, M. L. & D'Souza, G. (2015). High Oral Human Papillomavirus Type 16 Load Predicts Long-term Persistence in Individuals With or at Risk for HIV Infection. *J Infect Dis* **212**, 1588-1591.
- Beachler, D. C., Weber, K. M., Margolick, J. B., Strickler, H. D., Cranston, R. D., Burk, R. D., Wiley, D. J., Minkoff, H., Reddy, S., Stammer, E. E., Gillison, M. L. & D'Souza, G. (2012). Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **21**, 122-133.
- Berthiller, J., Straif, K., Agudo, A., Ahrens, W., Bezerra Dos Santos, A., Boccia, S., Cadoni, G., Canova, C., Castellsague, X., Chen, C., Conway, D., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Franceschi, S., Fukuyama, E. E., Hayes, R. B., Healy, C., Herrero, R., Holcatova, I., Kelsey, K., Kjaerheim, K., Koifman, S., Lagiou, P., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lissowska, J., Macfarlane, T., Mates, D., McClean, M., Menezes, A., Merletti, F., Morgenstern, H., Muscat, J., Olshan, A. F., Purdue, M., Ramroth, H., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Serraino, D., Shangina, O., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Thomson, P., Vaughan, T. L., Vilensky, M., Wei, Q., Winn, D. M., Wunsch-Filho, V., Zhang, Z. F., Znaor, A., Ferro, G., Brennan, P., Boffetta, P., Hashibe, M. & Lee, Y. A. (2015). Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *Int J Epidemiol*.

- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. & 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. & 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.
- Brandsma, J. L., Sun, Y., Lizardi, P. M., Tuck, D. P., Zelterman, D., Haines, G. K., 3rd, Martel, M., Harigopal, M., Schofield, K. & Neapolitano, M. (2009).** Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* **389**, 100-107.
- Bryant, D., Onions, T., Raybould, R., Jones, S., Tristram, A., Hibbitts, S., Fiander, A. & Powell, N. (2014a).** Increased methylation of Human Papillomavirus type 16 DNA correlates with viral integration in Vulval Intraepithelial Neoplasia. *J Clin Virol* **61**, 393-399.
- Bryant, D., Tristram, A., Liloglou, T., Hibbitts, S., Fiander, A. & Powell, N. (2014b).** Quantitative measurement of Human Papillomavirus type 16 L1/L2 DNA methylation correlates with cervical disease grade. *J Clin Virol* **59**, 24-29.
- Bzhalava, D., Eklund, C. & Dillner, J. (2015).** International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* **476**, 341-344.
- Castellsague, X., Alemany, L., Quer, M., Holec, G., Quiros, B., Tous, S., Clavero, O., Alos, L., Biegner, T., Szafarowski, T., Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Claros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., Benevolo, M., Kasamatsu, E., Mehanna, H., Ndiaye, C., Guimera, N., Lloveras, B., Leon, X., Ruiz-Cabezas, J. C., Alvarado-Cabrero, I., Kang, C. S., Oh, J. K., Garcia-Rojo, M., Iljazovic, E., Ajayi, O. F., Duarte, F., Nessa, A., Tinoco, L., Duran-Padilla, M. A., Pirog, E. C., Viarheichyk, H., Morales, H., Costes, V., Felix, A., Germar, M. J., Mena, M., Ruacan, A., Jain, A., Mehrotra, R., Goodman, M. T., Lombardi, L. E., Ferrera, A., Malami, S., Albanesi, E. I., Dabed, P., Molina, C., Lopez-Revilla, R., Mandys, V., Gonzalez, M. E., Velasco, J., Bravo, I. G., Quint, W., Pawlita, M., Munoz, N., Sanjose, S. & Xavier Bosch, F. (2016).** HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* **108**.
- 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. *Int J Cancer* **132**, 2087-2094.
- Chalertpet, K., Pakdechaidan, W., Patel, V., Mutirangura, A. & Yanatatsaneejit, P. (2015).** Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. *Cancer Sci* **106**, 1333-1340.
- Cheung, J. L., Cheung, T. H., Yu, M. Y. & Chan, P. K. (2013).** Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol* **131**, 374-379.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. & Bernard, H. U. (1991).** The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* **65**, 5933-5943.
- Cohen, M. A., Basha, S. R., Reichenbach, D. K., Robertson, E. & Sewell, D. A. (2008).** Increased viral load correlates with improved survival in HPV-16-associated tonsil carcinoma patients. *Acta Otolaryngol* **128**, 583-589.
- Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., 3rd, 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. *Embo j* **6**, 3745-3753.
- Danos, O., Katinka, M. & Yaniv, M. (1982).** Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *Embo j* **1**, 231-236.

- Das, P., Thomas, A., Kannan, S., Deodhar, K., Shrivastava, S. K., Mahantshetty, U. & Mulherkar, R. (2015). Human papillomavirus (HPV) genome status & cervical cancer outcome--A retrospective study. *Indian J Med Res* **142**, 525-532.
- De Marco, L., Gillio-Tos, A., Bonello, L., Ghisetti, V., Ronco, G. & Merletti, F. (2007). Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol* **38**, 7-13.
- de Villiers, E. M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**, 2-10.
- Deng, Z., Hasegawa, M., Kiyuna, A., Matayoshi, S., Uehara, T., Agena, S., Yamashita, Y., Ogawa, K., Maeda, H. & Suzuki, M. (2013). Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **35**, 800-808.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R. J. & Gallimore, P. H. (1986). Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *Embo j* **5**, 355-362.
- Dowhanick, J. J., McBride, A. A. & Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**, 7791-7799.
- Du, J., Nordfors, C., Nasman, A., Sobkowiak, M., Romanitan, M., Dalianis, T. & Ramqvist, T. (2012). Human papillomavirus (HPV) 16 E6 variants in tonsillar cancer in comparison to those in cervical cancer in Stockholm, Sweden. *PLoS One* **7**, e36239.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3812-3815.
- Gaykalova, D. A., Mambo, E., Choudhary, A., Houghton, J., Buddavarapu, K., Sanford, T., Darden, W., Adai, A., Hadd, A., Latham, G., Danilova, L. V., Bishop, J., Li, R. J., Westra, W. H., Hennessey, P., Koch, W. M., Ochs, M. F., Califano, J. A. & Sun, W. (2014). Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e93102.
- Gerber, M. R., Farrell, A., Deshaies, R. J., Herskowitz, I. & Morgan, D. O. (1995). Cdc37 is required for association of the protein kinase Cdc28 with G1 and mitotic cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4651-4655.
- Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F. & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* **33**, 3235-3242.
- Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S. & Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **100**, 407-420.
- Gravitt, P. E., Peyton, C., Wheeler, C., Apple, R., Higuchi, R. & Shah, K. V. (2003). Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* **112**, 23-33.
- Grisar, K., Dok, R., Schoenaers, J., Dormaar, T., Hauben, E., Jorissen, M., Nuyts, S. & Politis, C. (2016). Differences in human papillomavirus-positive and -negative head and neck cancers in Belgium: an 8-year retrospective, comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **121**, 456-460.
- Gross, G., Ikenberg, H., Gissmann, L. & Hagedorn, M. (1985). Papillomavirus infection of the anogenital region: correlation between histology, clinical picture, and virus type. Proposal of a new nomenclature. *J Invest Dermatol* **85**, 147-152.
- Gupta, B., Johnson, N. W. & Kumar, N. (2016). Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* **91**, 13-23.
- Hafkamp, H. C., Manni, J. J., Haesevoets, A., Voogd, A. C., Schepers, M., Bot, F. J., Hopman, A. H., Ramaekers, F. C. & Speel, E. J. (2008). Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* **122**, 2656-2664.

- Hafkamp, H. C., Speel, E. J., Haesevoets, A., Bot, F. J., Dinjens, W. N., Ramaekers, F. C., Hopman, A. H. & Manni, J. J. (2003). A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* **107**, 394-400.
- Hafner, N., Driesch, C., Gajda, M., Jansen, L., Kirchmayr, R., Runnebaum, I. B. & Durst, M. (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene* **27**, 1610-1617.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z. F., Berthiller, J. & Boffetta, P. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* **99**, 777-789.
- Holzinger, D., Schmitt, M., Dyckhoff, G., Benner, A., Pawlita, M. & Bosch, F. X. (2012). Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res* **72**, 4993-5003.
- Hrbacek, J., Urban, M., Hamsikova, E., Tachezy, R., Eis, V., Brabec, M. & Heracek, J. (2011). Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer* **11**, 53.
- Huang, C. G., Lee, L. A., Tsao, K. C., Liao, C. T., Yang, L. Y., Kang, C. J., Chang, K. P., Huang, S. F., Chen, I. H., Yang, S. L., Lee, L. Y., Hsueh, C., Chen, T. C., Lin, C. Y., Fan, K. H., Chang, T. C., Wang, H. M., Ng, S. H. & Yen, T. C. (2014). Human papillomavirus 16/18 E7 viral loads predict distant metastasis in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Virol* **61**, 230-236.
- Hughes, F. J. & Romanos, M. A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* **21**, 5817-5823.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**, 2989-2997.
- Jung, A. C., Briolat, J., Millon, R., de Reynies, A., Rickman, D., Thomas, E., Abecassis, J., Clavel, C. & Wasylyk, B. (2010). Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **126**, 1882-1894.
- Kahla, S., Kochbati, L., Hammami, S., Chanoufi, M. B., Maalej, M. & Oueslati, R. (2014). Sequence variation in the E2-binding domain of HPV16 and biological function evaluation in Tunisian cervical cancers. *Biomed Res Int* **2014**, 639321.
- Kalantari, M., Blennow, E., Hagmar, B. & Johansson, B. (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* **10**, 46-54.
- Kammer, C., Tommasino, M., Syrjanen, S., Delius, H., Hebling, U., Warthorst, U., Pfister, H. & Zehbe, I. (2002). Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer* **86**, 269-273.
- Kim, K., Garner-Hamrick, P. A., Fisher, C., Lee, D. & Lambert, P. F. (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* **77**, 12450-12459.
- Kim, S. H., Koo, B. S., Kang, S., Park, K., Kim, H., Lee, K. R., Lee, M. J., Kim, J. M., Choi, E. C. & Cho, N. H. (2007). HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer* **120**, 1418-1425.

- Kimple, R. J., Smith, M. A., Blitzer, G. C., Torres, A. D., Martin, J. A., Yang, R. Z., Peet, C. R., Lorenz, L. D., Nickel, K. P., Klingelutz, A. J., Lambert, P. F. & Harari, P. M. (2013).** Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* **73**, 4791-4800.
- Klaes, R., Woerner, S. M., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz, B., Melsheimer, P. & von Knebel Doeberitz, M. (1999).** Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* **59**, 6132-6136.
- Klimov, E., Vinokourova, S., Mojsjak, E., Rakhmanaliev, E., Kobseva, V., Laimins, L., Kisseljov, F. & Sulimova, G. (2002).** Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. *BMC Cancer* **2**, 24.
- Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., Rotnaglova, E., Ludvikova, V. & Tachezy, R. (2013).** Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer* **133**, 1832-1839.
- Kostareli, E., Holzinger, D., Bogatyrova, O., Hielscher, T., Wichmann, G., Keck, M., Lahrmann, B., Grabe, N., Flechtenmacher, C., Schmidt, C. R., Seiwert, T., Dyckhoff, G., Dietz, A., Hofler, D., Pawlita, M., Benner, A., Bosch, F. X., Plinkert, P., Plass, C., Weichenhan, D. & Hess, J. (2013).** HPV-related methylation signature predicts survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *J Clin Invest* **123**, 2488-2501.
- Kremsdorf, D., Jablonska, S., Favre, M. & Orth, G. (1983).** Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *J Virol* **48**, 340-351.
- Kulski, J. K., Demeter, T., Mutavdzic, S., Sterrett, G. F., Mitchell, K. M. & Pixley, E. C. (1990).** Survey of histologic specimens of human cancer for human papillomavirus types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* **94**, 566-570.
- Lace, M. J., Isacson, C., Anson, J. R., Lorincz, A. T., Wilczynski, S. P., Haugen, T. H. & Turek, L. P. (2009a).** Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture. *J Virol* **83**, 7457-7466.
- Lace, M. J., Yamakawa, Y., Ushikai, M., Anson, J. R., Haugen, T. H. & Turek, L. P. (2009b).** Cellular factor YY1 downregulates the human papillomavirus 16 E6/E7 promoter, P97, in vivo and in vitro from a negative element overlapping the transcription-initiation site. *J Gen Virol* **90**, 2402-2412.
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F. & Matlashewski, G. (1992).** The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* **7**, 19-25.
- Leung, T. W., Liu, S. S., Leung, R. C., Chu, M. M., Cheung, A. N. & Ngan, H. Y. (2015).** HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *J Med Virol* **87**, 1022-1033.
- Lillsunde Larsson, G., Helenius, G., Sorbe, B. & Karlsson, M. G. (2014).** Viral load, integration and methylation of E2BS3 and 4 in human papilloma virus (HPV) 16-positive vaginal and vulvar carcinomas. *PLoS One* **9**, e112839.
- Lukesova, E., Boucek, J., Rotnaglova, E., Salakova, M., Koslabova, E., Grega, M., Eckschlager, T., Rihova, B., Prochazka, B., Klozar, J. & Tachezy, R. (2014).** High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Biomed Res Int* **2014**, 303929.
- Mardis, E. R. (2008).** Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**, 387-402.
- Matsukura, T., Kanda, T., Furuno, A., Yoshikawa, H., Kawana, T. & Yoshiike, K. (1986).** Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol* **58**, 979-982.

- Mellin, H., Dahlgren, L., Munck-Wikland, E., Lindholm, J., Rabbani, H., Kalantari, M. & Dalianis, T. (2002). Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* **102**, 152-158.
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550-560.
- Olthof, N. C., Huebbers, C. U., Kolligs, J., Henfling, M., Ramaekers, F. C., Cornet, I., van Lent-Albrechts, J. A., Stegmann, A. P., Silling, S., Wieland, U., Carey, T. E., Walline, H. M., Gollin, S. M., Hoffmann, T. K., de Winter, J., Kremer, B., Klussmann, J. P. & Speel, E. J. (2015). Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int J Cancer* **136**, E207-218.
- Olthof, N. C., Speel, E. J., Kolligs, J., Haesevoets, A., Henfling, M., Ramaekers, F. C., Preuss, S. F., Drebber, U., Wieland, U., Silling, S., Lam, W. L., Vucic, E. A., Kremer, B., Klussmann, J. P. & Huebbers, C. U. (2014). Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One* **9**, e88718.
- Parfenov, M., Peadarallu, C. S., Gehlenborg, N., Freeman, S. S., Danilova, L., Bristow, C. A., Lee, S., Hadjipanayis, A. G., Ivanova, E. V., Wilkerson, M. D., Protopopov, A., Yang, L., Seth, S., Song, X., Tang, J., Ren, X., Zhang, J., Pantazi, A., Santoso, N., Xu, A. W., Mahadeshwar, H., Wheeler, D. A., Haddad, R. I., Jung, J., Ojesina, A. I., Issaeva, N., Yarbrough, W. G., Hayes, D. N., Grandis, J. R., El-Naggar, A. K., Meyerson, M., Park, P. J., Chin, L., Seidman, J. G., Hammerman, P. S. & Kucherlapati, R. (2014). Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15544-15549.
- Park, I. S., Chang, X., Loyo, M., Wu, G., Chuang, A., Kim, M. S., Chae, Y. K., Lyford-Pike, S., Westra, W. H., Saunders, J. R., Sidransky, D. & Pai, S. I. (2011). Characterization of the methylation patterns in human papillomavirus type 16 viral DNA in head and neck cancers. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 207-217.
- Partlova, S., Boucek, J., Kloudova, K., Lukesova, E., Zabrodsky, M., Grega, M., Fucikova, J., Truxova, I., Tachezy, R., Spisek, R. & Fialova, A. (2015). Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* **4**, e965570.
- Pater, M. M. & Pater, A. (1985). Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* **145**, 313-318.
- Phelps, W. C. & Howley, P. M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol* **61**, 1630-1638.
- Pientong, C., Wongwarissara, P., Ekalaksananan, T., Swangphon, P., Kleebkaow, P., Kongyingoes, B., Siriaunkgul, S., Tungsinmunkong, K. & Suthipintawong, C. (2013). Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Viol J* **10**, 30.
- Prata, T. T., Bonin, C. M., Ferreira, A. M., Padovani, C. T., Fernandes, C. E., Machado, A. P. & Tozetti, I. A. (2015). Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. *Immunology* **146**, 113-121.
- Reuschenbach, M., Huebbers, C. U., Prigge, E. S., Bermejo, J. L., Kalteis, M. S., Preuss, S. F., Seuthe, I. M., Kolligs, J., Speel, E. J., Olthof, N., Kremer, B., Wagner, S., Klussmann, J. P., Vinokurova, S. & von Knebel Doeberitz, M. (2015). Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. *Cancer* **121**, 1966-1976.
- Rodriguez, H., Levican, J., Munoz, J. P., Carrillo, D., Acevedo, M. L., Gaggero, A., Leon, O., Gheit, T., Espinoza-Navarro, O., Castillo, J., Gallegos, I., Tommasino, M. & Aguayo, F. (2015). Viral infections in prostate carcinomas in Chilean patients. *Infect Agent Cancer* **10**, 27.

- Romanczuk, H. & Howley, P. M. (1992).** Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3159-3163.
- Rotnaglova, E., Tachezy, R., Salakova, M., Prochazka, B., Kosl'abova, E., Vesela, E., Ludvikova, V., Hamsikova, E. & Klozar, J. (2011).** HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer* **129**, 101-110.
- Rous, P. & Beard, J. W. (1935).** THE PROGRESSION TO CARCINOMA OF VIRUS-INDUCED RABBIT PAPILOMAS (SHOPE). *J Exp Med* **62**, 523-548.
- Ruttkey-Nedecky, B., Jimenez Jimenez, A. M., Nejdli, L., Chudobova, D., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V. & Kizek, R. (2013).** Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol* **43**, 1754-1762.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Salakova, M., Koslabova, E., Vojtechova, Z., Tachezy, R. & Sroller, V. (2016).** Detection of human polyomaviruses MCPyV, HPyV6, and HPyV7 in malignant and non-malignant tonsillar tissues. *J Med Virol* **88**, 695-702.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. (1993).** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- Schlecht, N. F., Ben-Dayan, M., Anayannis, N., Lleras, R. A., Thomas, C., Wang, Y., Smith, R. V., Burk, R. D., Harris, T. M., Childs, G., Ow, T. J., Prystowsky, M. B. & Belbin, T. J. (2015).** Epigenetic changes in the CDKN2A locus are associated with differential expression of P16INK4A and P14ARF in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* **4**, 342-353.
- Schutze, D. M., Krijgsman, O., Snijders, P. J., Ylstra, B., Weischenfeldt, J., Mardin, B. R., Stutz, A. M., Korbelt, J. O., de Winter, J. P., Meijer, C. J., Quint, W. G., Bosch, L., Wilting, S. M. & Steenbergen, R. D. (2016).** Immortalization capacity of HPV types is inversely related to chromosomal instability. *Oncotarget*.
- Snijders, P. J., Meijer, C. J., van den Brule, A. J., Schrijnemakers, H. F., Snow, G. B. & Walboomers, J. M. (1992).** Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA. *J Gen Virol* **73 (Pt 8)**, 2059-2066.
- Spanos, W. C., Nowicki, P., Lee, D. W., Hoover, A., Hostager, B., Gupta, A., Anderson, M. E. & Lee, J. H. (2009).** Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **135**, 1137-1146.
- Stepanova, L., Finegold, M., DeMayo, F., Schmidt, E. V. & Harper, J. W. (2000).** The oncoprotein kinase chaperone CDC37 functions as an oncogene in mice and collaborates with both c-myc and cyclin D1 in transformation of multiple tissues. *Mol Cell Biol* **20**, 4462-4473.
- Sun, Z., Zhang, R., Liu, Z., Liu, C., Li, X., Zhou, W., Yang, L., Ruan, Q. & Zhang, X. (2015).** Development of a fluorescence-based multiplex genotyping method for simultaneous determination of human papillomavirus infections and viral loads. *BMC Cancer* **15**, 860.
- Tachezy, R., Hrbacek, J., Heracek, J., Salakova, M., Smahelova, J., Ludvikova, V., Svec, A., Urban, M. & Hamsikova, E. (2012).** HPV persistence and its oncogenic role in prostate tumors. *J Med Virol* **84**, 1636-1645.
- Tachezy, R., Smahelova, J., Kaspirkova, J. & Salakova, M. (2013).** Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One* **8**, e79156.

- Tan, S. H., Gloss, B. & Bernard, H. U. (1992).** During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* **20**, 251-256.
- Thomas, M. C. & 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.
- Toporcov, T. N., Znaor, A., Zhang, Z. F., Yu, G. P., Winn, D. M., Wei, Q., Vilensky, M., Vaughan, T., Thomson, P., Talamini, R., Szeszenia-Dabrowska, N., Sturgis, E. M., Smith, E., Shangina, O., Schwartz, S. M., Schantz, S., Rudnai, P., Richiardi, L., Ramroth, H., Purdue, M. P., Olshan, A. F., Eluf-Neto, J., Muscat, J., Moyses, R. A., Morgenstern, H., Menezes, A., McClean, M., Matsuo, K., Mates, D., Macfarlane, T. V., Lissowska, J., Levi, F., Lazarus, P., La Vecchia, C., Lagiou, P., Koifman, S., Kjaerheim, K., Kelsey, K., Holcatova, I., Herrero, R., Healy, C., Hayes, R. B., Franceschi, S., Fernandez, L., Fabianova, E., Daudt, A. W., Curioni, O. A., Maso, L. D., Curado, M. P., Conway, D. I., Chen, C., Castellsague, X., Canova, C., Cadoni, G., Brennan, P., Boccia, S., Antunes, J. L., Ahrens, W., Agudo, A., Boffetta, P., Hashibe, M., Lee, Y. C. & Filho, V. W. (2015).** Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol* **44**, 169-185.
- van Duin, M., Snijders, P. J., Schrijnemakers, H. F., Voorhorst, F. J., Rozendaal, L., Nobbenhuis, M. A., van den Brule, A. J., Verheijen, R. H., Helmerhorst, T. J. & Meijer, C. J. (2002).** Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* **98**, 590-595.
- Vinokurova, S. & von Knebel Doeberitz, M. (2011).** Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* **6**, e24451.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Durst, M., Schneider, A. & von Knebel Doeberitz, M. (2008).** Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* **68**, 307-313.
- Vojtechova, Z., Sabol, I., Salakova, M., Turek, L., Grega, M., Smahelova, J., Vencalek, O., Lukesova, E., Klozar, J. & Tachezy, R. (2016).** Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *Int J Cancer* **138**, 386-395.
- Watanabe, S., Kanda, T. & Yoshiike, K. (1989).** Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J Virol* **63**, 965-969.
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R. L., Rimm, D. L. & Psyrri, A. (2006).** Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* **24**, 736-747.
- Wentzensen, N., Ridder, R., Klaes, R., Vinokurova, S., Schaefer, U. & Doeberitz, M. (2002).** Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* **21**, 419-426.
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C. & Bosch, F. X. (2002).** Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* **21**, 1510-1517.
- Wilczynski, S. P., Lin, B. T., Xie, Y. & Paz, I. B. (1998).** Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **152**, 145-156.
- Wilson, G. A., Lechner, M., Koflerle, A., Caren, H., Butcher, L. M., Feber, A., Fenton, T., Jay, A., Boshoff, C. & Beck, S. (2013).** Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* **8**, 953-961.

- Xi, L. F., Demers, W., Kiviat, N. B., Kuypers, J., Beckmann, A. M. & Galloway, D. A. (1993).** Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Infect Dis* **168**, 610-617.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., Andrews, N. C., Caput, D. & McKeon, F. (1998).** p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**, 305-316.
- Zhang, C., Deng, Z., Pan, X., Uehara, T., Suzuki, M. & Xie, M. (2015).** Effects of Methylation Status of CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck Cancer Cells. *PLoS One* **10**, e0141245.
- zur Hausen, H. (1976).** Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**, 794.