

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

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



Eliška Šťovíčková

Faktory ovlivňující hypoxii ve virově indukovaných nádorech

Factors influencing of hypoxia in virus-associated tumours

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Jana Šmahelová

Praha, 2020

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce RNDr. Janě Šmahelové za její velkou ochotu, trpělivost a za všechny cenné rady a odborné vedení v průběhu celé práce.

Děkuji také svému manželovi a rodičům za podporu po čas sepisování práce a během studia.

Prohlášení

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

V Praze, 5.6.2020

Eliška Šťovíčková

Abstrakt

Kyslík hraje zásadní roli v buněčném metabolismu a je nezbytnou součástí mnoha reakcí probíhajících v organismu. Za fyziologických i patologických podmínek může docházet ke změnám hladiny kyslíku v tkáních i orgánech. Hlavními regulátory odpovědi na tyto změny jsou transkripční faktory indukované nedostatkem kyslíku neboli hypoxií, které ovlivňují expresi mnoha genů. Hypoxie je také častým jevem nádorech, protože rychle se dělící nádorové buňky mají vyšší energetické nároky. Typický je přechod buněčného metabolismu z dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace na aerobní glykolýzu.

Některé viry, mezi které patří i lidské papilomaviry, mohou nádorově transformovat hostitelské buňky. Při infekci dochází k vzájemným interakcím virových a buněčných proteinů a tím k ovlivnění chování buňky. Z tohoto pohledu byly v řadě studií zkoumány i papilomavirové onkoproteiny E6 a E7, které mohou mimo jiné měnit aktivitu transkripčních faktorů indukovaných hypoxií. Tyto interakce mohou mít řadu konsekvencí pro chování nádoru, například intenzivnější tvorbu cév, uniknutí imunitnímu systému nebo podle některých modelů dokonce tvorbu dormantních stádií. Ve výsledku tyto procesy ovlivňují prognózu nádorového onemocnění a mohou způsobit rezistenci k některým způsobům léčby. Jejich poznání může mít význam ve vývoji nových cílených nádorových terapií.

Klíčová slova

hypoxie, nádorové prostředí, lidský papilomavirus, HIF, E6, E7

Abstract

Oxygen plays an essential role in cellular metabolism and it is an important part of many reactions taking place in the organism. Under physiological and pathological conditions, changes of oxygen levels in tissues and organs can occur. The main regulators of the response to these changes are hypoxia-induced transcription factors, which affect the expression of many genes. Hypoxia is also a common phenomenon in tumors because of higher energy requirements of rapidly dividing tumor cells. A metabolic switch from the respiratory chain and oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis is characteristic.

Some viruses, including human papillomaviruses, can induce carcinogenesis. During infection, viral and cellular proteins interact with each other and thus influence the cell's behavior. From this point of view, papillomavirus oncoproteins E6 and E7 have been examined in a number of studies, which may, besides other things, alter the activity of hypoxia-induced transcription factors. These interactions may have a number of consequences for tumor behavior, such as more intense vascular formation, escape from the immune system, or, in some models, even the formation of dormant stages. As a result, these processes affect the prognosis of cancer and may cause resistance to some treatments. Their recognition may be important in the development of new targeted cancer therapies.

Key words

hypoxia, tumor microenvironment, human papillomavirus, HIF, E6, E7

Seznam použitých zkratek

zkratka	význam	český překlad
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	jaderný translokátor Ah receptoru
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	kináza spojená se syndromem ataxia telangiectasia a příbuzná proteinu Rad3
bp	base pairs	páry bazí
CAIX	carbon anhydrase IX	karbonová anhydráza IX
CBP	CREB-binding protein	protein vázající CREB
CSB	Cockayne syndrom group B	Cockayneův syndrom B
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EBNA	Epstein Baar nuclear antigen	jaderný antigen viru Epsteinova a Baarové
EBV	Epstein Barr virus	virus Epsteinova a Barrové
eIF2a	eukaryotic translation initiation factor 2A	eukaryotický translační iniciační faktor 2A
EPO	erythropoietin	erythropoetin
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase	kináza regulovaná extracelulárním signálem
FIH	factor inhibiting hypoxia-inducible factor	faktor inhibující HIF
GLUT	glucose transporter	přenašeč glukózy
HBV	hepatitis B virus	virus hepatitidy B
HCMV	human cytomegalovirus	lidský cytomegalovirus
HCV	hepatitis C virus	virus hepatitidy C
HDAC	histone deacetylase	deacetyláza histonů
HIF	hypoxia-inducible factor	faktor indukovaný hypoxií
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidského imunodeficitu
HPV	human papilloma virus	lidský papilomavirus
HR HPV	high risk HPV	vysoce rizikové HPV
HRE	hypoxia response element	úsek DNA pro vazbu HIF
HTLV	human T-cell lymphotropic virus	lidský T-lymfotropní virus
ChREBP	carbohydrate-responsive element-binding protein	protein reagující na uhlovodíky
ICD	intracellular domain	nitrobuněčná doména
IGF	insulin-like growth factor	růstový faktor podobný inzulinu
IκBα	NF-κB inhibitor alpha	NF-κB inhibitor alfa
KSHV	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus	lidský herpesvirus 8 způsobující Kaposiho sarkom

LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	virus lymfocytární choriomeningitidy
LCR	long control region	dlouhá kontrolní oblast
LMP1	latent membrane protein 1	latentní membránový protein 1
LR HPV	low risk HPV	nízce rizikové HPV
LTR	long terminal repeat	dlouhá koncová repetice
MAPK	mitogen activated protein kinases	proteinkinázy aktivované mitogenem
MCPyV	Merkel cell polyomavirus	polyomavirus Merkelových buněk
MCT	monocarboxyl transporter	přenašeč monokarboxylu
MDM2	mouse double minute 2	MDM2 ubikvitinová ligáza E3
miRNA	micro RNA	mikro RNA
NF-κB	nuclear factor-kappa-B	jaderný faktor kappa B
NOS	nitric oxide synthase	syntáza oxidu dusného
ODD	oxygen-dependent degradation domain	degradační doména závislá na kyslíku
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase	kináza endoplazmatického retikula podobná PKR
PHD	prolyl hydroxylase	hydroxyláza prolylu
PKR	protein kinase R	proteinkináza R
PNUTS	protein phosphatase 1 nuclear-targeting subunit	podjednotka cílící proteinovou fosfatázu 1 do jádra
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
REDD1	regulated in development and DNA damage response	protein regulovaný ve vývoji a při odpovědi na poškození DNA
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrozy
TRAF	TNF receptor associated factor	protein asociovaný s TNF receptorem
TSC2	tuberous sclerosis complex 2	tuberin
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
VHL	Von Hippel-Lindau protein	protein Von Hippela-Lindaua
Vpr	viral protein R	virový protein R

Obsah

Prohlášení	iv
Abstrakt	v
Klíčová slova	v
Abstract	vi
Key words	vi
Seznam použitých zkratk.....	vii
Obsah.....	ix
1 Úvod.....	1
2 Hladina kyslíku a její vliv na metabolismus	2
2.1 Hypoxie a hlavní faktory a signální dráhy s ní spojené.....	2
2.1.1 Hypoxií indukované faktory	3
2.1.2 Funkce hypoxií indukovaných faktorů v buňce.....	6
2.1.3 HIF a p53	8
2.1.4 Hypoxické regulace nezávislé na HIF	9
2.2 Hypoxie v nádorech.....	10
2.2.1 Warburgův efekt	10
3 Hypoxie a viry	13
3.1 Virové infekce a hladina kyslíku	13
3.2 Viry indukující nádory.....	16
3.2.1 Nádory indukované lidskými papilomaviry.....	17
3.2.2 Lidské papilomaviry a hypoxie.....	18
4 Závěr.....	25
5 Seznam literatury a zdrojů.....	26

1 Úvod

Kyslík je látka nezbytná pro řadu procesů probíhajících v buňkách aerobních organismů, a proto jeho hladina v tkáních a její změny výrazně ovlivňují buněčný metabolismus. Na změny hladiny kyslíku reagují buňky bezprostředně pomocí hypoxií indukovaných transkripčních faktorů (HIF, z angl. hypoxia inducible factor), které ovlivňují expresi celé řady genů. Za objev těchto transkripčních faktorů a způsobů, jak se buňky přizpůsobují změnám hladiny kyslíku, byla v roce 2019 udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství. Tyto změny v metabolismu buněk, ale i na systémové úrovni, jsou důležité mimo jiné i během embryonálního vývoje, ale ovlivňují také průběh onemocnění a výsledky léčby. Nejvýznamnějším z těchto transkripčních faktorů je HIF-1, heterodimer, skládající se z regulační podjednotky HIF-1 α a z neustále přítomné podjednotky HIF-1 β .

Snížená hladina kyslíku neboli hypoxie, je běžným jevem v nádorovém mikroprostředí. Spolu s kyselostí a dalšími faktory hraje zásadní roli v chování nádorových buněk, například v tendenci nádoru tvořit metastázy. Nádory jsou typické rychlým dělením buněk, mají tedy velkou spotřebu energie, a navíc se během růstu často netvoří dostatek nových cév a buňky nejsou dostatečně zásobovány kyslíkem. Nádory však mají schopnost z nepříznivého hypoxického prostředí uniknout nebo se mu jinak přizpůsobit prostřednictvím aktivace řady signálních drah a enzymů a zároveň mohou samy podporovat expresi proteinů indukovaných hypoxií i v normoxii aby zvýšily tvorbu nových cév, nebo lépe naplnily energetické nároky rychle se dělících nádorových buněk. Proto jsou hypoxií indukované faktory a další s hypoxií související proteiny zajímavé z hlediska možnosti cílení léčby karcinomů.

Některé viry mají schopnost nádorově transformovat hostitelské buňky. Mezi tyto viry patří zejména lidské papilomaviry, způsobující rakovinu děložního čípku, nádory v oblasti hlavy a krku a další. Lidské papilomaviry prostřednictvím svých onkoproteinů E6 a E7 ovlivňují aktivitu transkripčních faktorů indukovaných hypoxií i dalších proteinů, což jim umožňuje modulovat prostředí hostitelské buňky a měnit její metabolismus.

Cílem této bakalářské práce je popsat interakce virových a hostitelských proteinů v hypoxii, se zaměřením na prostředí nádorů asociovaných s lidskými papilomaviry. Výzkum interakcí virových proteinů s proteiny hostitelské nádorově transformované buňky je důležitý pro poznání možných příčin selhání léčby a také umožňuje vývoj nových nádorových terapií.

2 Hladina kyslíku a její vliv na metabolismus

Kyslík je látka nezbytná pro řadu životně důležitých procesů probíhajících u aerobních organismů – tedy organismů vyžadujících ke svému životu kyslík. Mezi ně patří mikroorganismy, rostliny i vyšší živočichové včetně člověka. Opakem jsou organismy anaerobní, které kyslík nepotřebují, a může jim i škodit, např. někteří prvoci. Dále existují i organismy fakultativně anaerobní, které jsou schopné se přizpůsobit prostředí s kyslíkem i bez něj, jako například kvasinky.

Kyslík je využíván především při respiraci, slouží jako finální akceptor elektronů během oxidativní fosforylace probíhající na vnitřní mitochondriální membráně. Více než 90 % celkové spotřeby kyslíku využije enzym cytochrom oxidáza (Nathan and Singer, 1999). Během oxidativní fosforylace se tvoří adenosintrifosfát (ATP), makroergní látka, univerzální zásobárna energie. Je nezbytná mimo jiné pro svalovou kontrakci, udržení protonových gradientů na membránách buněk a syntézu proteinů, glukózy, moči, RNA a dalších sloučenin.

Dále je kyslík součástí řady organických sloučenin, jako jsou aminokyseliny, tuky a další. Ty mají důležité strukturální i regulační funkce. Jsou známy desítky reakcí, kterých se kyslík přímo účastní. Kyslík tvoří v buňce také reaktivní formy (ROS, z angl. reactive oxygen species), které hrají roli například při likvidaci bakteriálních patogenů, ale zároveň jsou pro buňku vysoce toxické a mohou způsobit vážné a nežádoucí poškození DNA, RNA a proteinů.

Lze tedy vyvodit, že hladina kyslíku hraje klíčovou roli ve fungování organismu. Proto si buňky vyvinuly mechanismy, jak se jí do určité míry přizpůsobit.

2.1 Hypoxie a hlavní faktory a signální dráhy s ní spojené

Obsah kyslíku v atmosférickém vzduchu (nad hladinou moře) je 21 %, parciální tlak 160 mmHg. V lidském těle vzniká gradient, parciální tlak kyslíku v tkáních se pohybuje mezi 110 mmHg (plicní sklípky) a 4,5 mmHg (kostní dřevina) (Carreau *et al.*, 2011). Takovýto gradient má význam v řadě procesů, podílí se například na zachování totipotence krvetvorných buněk (Keith and Simon, 2007) nebo na rozdílné distribuci enzymů do jednotlivých oblastí v orgánech, například v játrech (Torre, Perret and Colnot, 2010). Situaci, kdy jsou hodnoty O_2 v tkáních v normálu a buňky mají dostatek kyslíku, nazýváme normoxií. Naopak úplná nepřítomnost kyslíku se nazývá anoxie.

Při nedostatku kyslíku v těle nebo v jednotlivých tkáních dochází k navození hypoxického stavu. Hypoxie vzniká z různých příčin. Za fyziologických podmínek k ní může docházet ve svalech při fyzickém výkonu, nebo například v prostředí vysokých nadmořských výšek. Její příčinou mohou být i patologické stavy, jako například poruchy funkce srdce a plic, anémie a různá onemocnění oběhového systému. Může způsobit trvalé poškození tkání, zároveň ale hraje klíčovou roli v embryogenezi (Chen, Fujinaga and Giaccia, 1999; Semenza, 2000)

Buňky na hypoxii odpovídají řadou evolučně konzervovaných mechanismů prostřednictvím enzymů jako jsou O_2 -dependentní dioxygenázy, které regulují transkripční faktory HIF a zároveň mohou regulovat buněčnou odpověď na změny hladiny kyslíku i nezávisle na HIF.

Prostřednictvím transkripčních faktorů HIF mohou buňky zvýšit sekreci erythropoetinu (EPO), který stimuluje tvorbu červených krvinek (Semenza and Wang, 1992), zvýšit produkci růstových faktorů a dalších cytokinů podporujících angiogenezi, tedy tvorbu nových krevních kapilár, aby se zvýšil přísun kyslíku do tkání (Semenza, 2007), pozměnit metabolismus, přejít na anaerobní respiraci, nebo například měnit svou motilitu (Nakazawa, Keith and Simon, 2016).

Tyto regulace hrají důležitou roli ve vývoji a fyziologickém udržování hladiny kyslíku v tkáních a orgánech i během různých onemocnění a v nádorech.

2.1.1 Hypoxii indukované faktory

V centru regulace buněčné odpovědi na hypoxii stojí transkripční faktor HIF. Do lidské HIF genové rodiny patří geny kódující proteiny α a β podjednotek, ze kterých se tvoří funkční heterodimery. Postupně byly objevovány podjednotky HIF-1 α (Wang and Semenza, 1995), HIF-2 α (Tian, McKnight and Russell, 1997) a HIF-3 α (Gu *et al.*, 1998). Podjednotky HIF-1 β , HIF-2 β a HIF-3 β byly již známy jako produkty genů *ARNT 1-3* (z angl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Hoffman *et al.*, 1991; Reyes, Reisz-Porszasz and Hankinson, 1992). Přehled podjednotek HIF, názvů genů a jimi kódovaných proteinů je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Podjednotky lidských HIF, názvy jejich genů a jimi kódované proteiny. (Online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 13.4.2020)

podjednotka HIF	gen	poloha na chromozomu	protein
1 α	<i>HIF1A</i>	14q23.2	α podjednotka HIF-1
1 β	<i>ARNT</i>	1q21.3	jaderný translokátor Ah receptoru
2 α	<i>EPAS1</i>	2p21	α podjednotka HIF-2
2 β	<i>ARNT2</i>	15q25.1	jaderný translokátor Ah receptoru 2
3 α	<i>HIF3A</i>	19q13.32	α podjednotka HIF-3

Nejlépe prozkoumaným je HIF-1, který hraje klíčovou roli v buněčné i systémové fyziologii a embryonálním vývoji (Wang and Semenza, 1995; Semenza, 1998). Skládá se z podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β , obě mají strukturu helix-loop-helix, tedy dvou helixů spojených smyčkou (Obrázek 1) (Wang *et al.*, 1995).

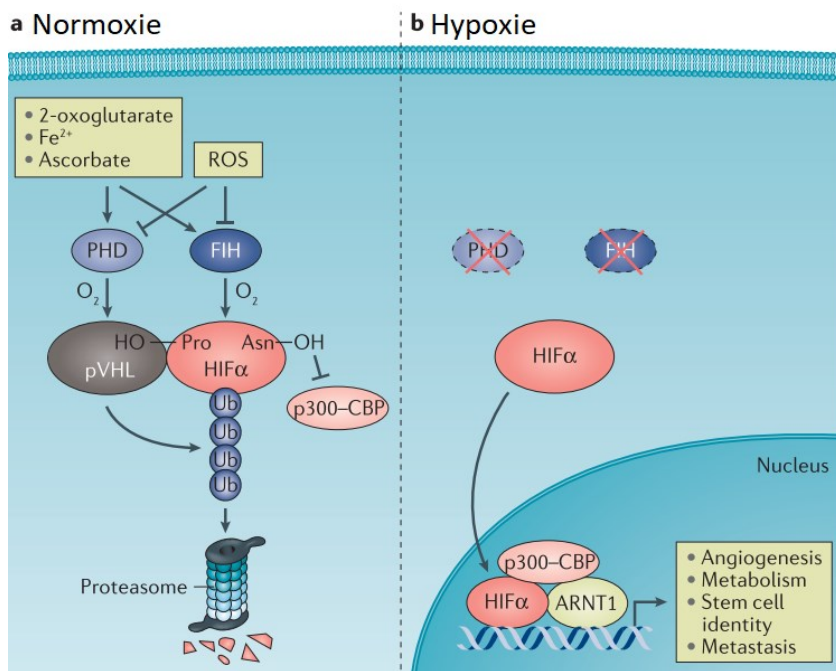


Obrázek 1 – 3D struktura HIF-1 vázajícího se k DNA, modře HIF-1 α , červeně HIF-1 β , oranžově dvošroubovice DNA, převzato a upraveno podle (Martin *et al.*, 2017).

Podjednotka HIF-1 β je v buňkách přítomna stále. Regulační funkci závislou na hladině kyslíku má podjednotka HIF-1 α . Při normální hladině kyslíku je degradována, a hromadí se až při hypoxii (Salceda and Caro, 1997). Během normoxie je HIF-1 α podjednotka hydroxylována – na 2 prolylové zbytky je připojena hydroxylová skupina -OH za využití kyslíku. Tyto zbytky Pro-402 a Pro-564 nacházející se v degradační doméně HIF-1 α (ODD, z angl. oxygen-dependent degradation domain,) jsou hydroxylovány prolylhydroxylázami PHD (z angl. prolyl hydroxylase domain) vyžadujícími jako kofaktor mimo jiné i kyslík (Bárdos and Ashcroft, 2005). Hydroxylované prolylové zbytky jsou rozeznávány nádorovým supresorovým proteinem Von Hippela-Lindaua (VHL), který je součástí komplexu ubikvitinové ligázy E3 (Maxwell *et al.*, 1999). Tento komplex označí HIF-1 α ubikvitinylací k degradaci v proteazomu (Jaakkola *et al.*, 2001).

Dalším posttranslačním mechanismem regulace transkripční aktivity HIF na je na kyslíku závislá hydroxylace asparaginylového zbytku HIF-1 α na beta-uhlíku Asn-803 v C-koncové transaktivační doméně. Tento zbytek je hydroxylován hydroxylázou FIH (z angl. factor inhibiting HIF), čímž se inhibuje navázání kofaktorů p300-CBP (z angl. CREB-binding protein) (McNeill *et al.*, 2002). Kofaktory p300-CBP fungují jako koaktivátory HIF, a pokud je jejich vazebné místo na HIF-1 α zablokováno hydroxylací hydroxylázou FIH, tak HIF není transkripčně aktivní.

Vzhledem k tomu, že hydroxylázy ke svému fungování vyžadují kyslík, v hypoxických podmínkách přestávají fungovat. Podjednotka HIF-1 α tedy není v hypoxii výše zmíněným mechanismem označována k degradaci, hromadí se v buňce a vstupuje do jádra, kde dimerizuje s HIF-1 β a funguje jako transkripční faktor (Bárdos and Ashcroft, 2005). Regulaci HIF v normoxii a hypoxii shrnuje Obrázek 2.



Obrázek 2 – Regulace HIF-1 α , převzato a upraveno podle (Nakazawa, Keith and Simon, 2016)

Jsou známy i další mechanismy regulace aktivity HIF. Například může být transkripční aktivita HIF-1 zvýšena posttranslačně fosforylací podjednotky HIF-1 α kinázami signální dráhy MAPK (z angl. mitogen activated protein kinases) p42 a p44 (Richard *et al.*, 1999). Tyto kinázy po stimulaci mitogeny fosforylují HIF-1 α , což ukazuje na spolupráci růstových a hypoxických faktorů. Aktivovat dráhu MAPK může i vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF z angl. vascular endothelial growth factor) (Doanes *et al.*, 1999), který patří mezi geny ovlivněné HIF, jak bude popsáno níže. Signální kaskáda MAPK také zvyšuje aktivitu jednoho z hlavních koaktivátorů HIF-1, p300-CBP, a tím zvyšuje bazální i hypoxickou transkripční aktivitu HIF-1 (Sang *et al.*, 2003).

2.1.2 Funkce hypoxií indukovaných faktorů v buňce

Transkripční faktory HIF jsou hlavními regulátory buněčné odpovědi na měnící se hladinu kyslíku.

V jádře se HIF-1 váže na konsenzus sekvenci 5'-RCGTG-3' v promotorech řady genů a zvyšuje jejich expresi. Tato vazebná místa pro HIF-1, neboli HRE (z angl. hypoxia response element) a byla objevena v řadě promotorů genů glykolytických enzymů jako jsou aldoláza a enoláza (Semenza *et al.*, 1996), dioxygenázy, nebo demethylázy histonů (Xia *et al.*, 2009). Během buněčné odpovědi na hypoxii hrají důležitou roli také přenašeče laktátu, zvláště

MCT4 (z angl. monocarboxylate transporter 4), který je také regulován HIF-1 (Ullah, Davies and Halestrap, 2006). V hypoxii probíhá v buňce anaerobní glykolýza, vzniká tedy laktát. Tyto přenašeče umožňují transport laktátu ven z buňky, čímž zabraňují překyselení.

Dále se HIF váže na HRE v promotorech genů ovlivňujících zásobení tkání kyslíkem. Mezi ně patří například gen pro VEGF, klíčový mediátor v angiogenezi (Forsythe *et al.*, 1996). HIF-1 způsobí navázáním na promotor zvýšenou expresi a následnou tvorbu nových cév. Dalším mechanismem, kterým HIF-1 může ovlivnit zásobení tkání kyslíkem, je vazba na HRE v enhanceru genu pro erythropoetin (EPO), čímž aktivuje jeho transkripci (Semenza and Wang, 1992). EPO je hormon stimulující tvorbu červených krvinek, které jsou přenašeči kyslíku v krvi. Faktor HIF-1 také ovlivňuje produkci syntáz oxidu dusnatého (NOS) (Palmer *et al.*, 1998). Takto zvýšená produkce NOS vede k syntéze NO, který hraje roli v buněčné signalizaci a ovlivňuje mimo jiné i angiogenezi. HIF se také podílí na udržení totipotence krvetvorných kmenových buněk (Srikanth *et al.*, 2016) a ovlivňuje metabolismus železa prostřednictvím přenašeče železa, transferrinu (Tacchini *et al.*, 1999).

Dále se HIF navzájem ovlivňuje s řadou regulačních a signálních drah, jako například dráhy MAPK a IGF (z angl. insulin-like growth factor) (Treins *et al.*, 2006), nebo Notch (Qiang *et al.*, 2012). Signální dráha MAPK má, jak již bylo uvedeno výše, schopnost regulace aktivity HIF-1. Dále ovlivňuje expresi řady dalších genů, buněčnou proliferaci, diferenciaci nebo apoptózu. Kináza MAP je aktivována kaskádou dalších kináz po stimulaci například přes receptor růstového faktoru na membráně. Jedním z růstových faktorů aktivujících MAPK dráhu je VEGF (Doanes *et al.*, 1999), jehož produkci ovlivňuje HIF. Mezi enzymy kaskády MAPK patří Ras, Raf, MEK a ERK. IGF jsou růstové faktory ovlivňující buněčné dělení nebo apoptózu, a to jak za fyziologických podmínek, tak i v nádorech. Faktory IGF mají schopnost aktivovat HIF-1 α na úrovni exprese proteinu, jak bylo pozorováno v různých buněčných typech (Zelzer *et al.*, 1998). IGF má také schopnost aktivovat členy MAPK dráhy, jako je ERK (Sutton *et al.*, 2007) nebo Ras. Tyto interakce byly zkoumány například v gliomech, kde byla popsána zpětnovazebná smyčka IGF a HIF, a to, že IGF ovlivňuje expresi HIF-1 α právě prostřednictvím Ras (Sinha *et al.*, 2011). Dále byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými IGF, kdy IGF I zvyšoval expresi HIF, ale IGF II nikoliv (Sartori-Cintra *et al.*, 2012). Dráha Notch má velký význam při vývoji neuronů, angiogenezi, embryonálním vývoji, buněčné komunikaci a v řadě dalších procesů. Některých těchto regulací se účastní HIF. HIF-1 α v hypoxii interaguje s Notch na membráně přes jeho nitrobuněčnou doménu (ICD, z angl. intracellular domain) a stabilizuje ho. Zároveň ale FIH, který reguluje HIF,

reguluje i Notch. Má totiž k ICD vyšší afinitu než HIF, hydroxyluje Notch a tlumí jeho aktivitu (Zheng *et al.*, 2008). Takto může spolupráce HIF a Notch ovlivňovat například udržení nediferenciovaných buněk (Gustafsson *et al.*, 2005).

Hypoxie má také vliv na další transkripční faktory, jako je například NF- κ B (z angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) jehož aktivitu hypoxie zvyšuje prostřednictvím fosforylace tyrosinu na inhibitoru NF- κ B, I κ B α (z angl. NF- κ B inhibitor alpha) (Koong, Chen and Giaccia, 1994), nebo C-Myc, který je prostřednictvím HIF-1 α odvázan z promotoru. Navíc HIF tlumí expresi některých genů ovlivněných Myc (Koshiji *et al.*, 2004). Prostřednictvím interakce s transkripčním faktorem Myc může HIF zastavit buněčné dělení.

Transkripční faktory HIF tedy hrají klíčovou roli během přizpůsobení se buňky na nedostatečnou hladinu kyslíku. Zprvce redukuje spotřebu kyslíku buňkou pozastavením oxidativní fosforylace a přechodem na glykolýzu, zvýšením cévního tonu nebo menší tvorbou mitochondrií. Zadruhé zlepšují zásobení tkání kyslíkem podporou tvorby červených krvinek a nových cév. A v neposlední řadě hrají roli v procesech regenerace, jako je hojení ran, v ochraně před radiací nebo při udržení totipotence kmenových buněk.

2.1.3 HIF a p53

Prostřednictvím mediátoru p53 může HIF-1 také ovlivňovat například růst buňky a apoptózu (Carmeliet *et al.*, 1998). Protein p53 je nádorový supresorový protein, který reaguje na poškození DNA a další stresové faktory a může vyvolat apoptózu (Efeyan and Serrano, 2007). Za normálních podmínek je p53 degradován v proteazomu po označení ubikvitinylací ligázami E3. Mezi tyto p53 specifické ubikvitinylové ligázy patří MDM2 (mouse double minute 2). Fosforylace zvyšuje transkripční aktivitu HIF i p53.

Regulace hladiny i aktivity p53 v hypoxii je složitý proces, kterého se účastní řada proteinů. Bylo vypracováno více modelů této regulace, jeden z nich je popsán níže. Hladiny HIF a p53 jsou závislé na míře hypoxie. Ovlivňují se vzájemně především kompeticí o p300, který oba aktivuje. Při střední hypoxii p300 acetyluje HIF-1 α (Wang *et al.*, 2019). Ten prostřednictvím proteinu PNUTS (z angl. protein phosphatase 1 nuclear-targeting subunit), která fosforyluje p53 v oblasti jeho serinu 15, způsobuje částečnou posttranskripční stabilizaci p53. Stále ale při střední hypoxii převažuje aktivita HIF-1 α nad aktivitou p53. Protein PNUTS směřuje

proteinfosfatázu 1 do jádra, a je tedy důležitou součástí fyziologických regulačních drah. PNUTS má v promotoru HRE a HIF tedy zvyšuje jeho hladinu (Lee *et al.*, 2007). Při silné hypoxii až anoxii se zpočátku hromadí HIF-1 α a tedy i PNUTS a p53. Protein p53 ale řídí na kyslíku nezávislou MDM2 dependentní degradaci HIF-1 α , která se projeví právě v anoxii při zvyšující se hladině p53. Následně spolu s HIF-1 α ubývá i PNUTS, ale p53 má stále vysokou hladinu, protože je v anoxii navíc stabilizován fosforylací kinázou ATR (z angl. ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). P53 začne také převládat v kompetici o p300, a tím se dále stabilizuje. Při silné hypoxii a anoxii je tedy vyšší hladina p53 a jeho další hromadění navozuje apoptózu (Wang *et al.*, 2019).

Dalším mechanismem vzájemné regulace HIF-1 α a p53 je ovlivnění na transkripční úrovni. HIF-1 se váže na 5 různých HRE v promotoru p53 a tím zvyšuje jeho transkripci. Zároveň p53 v hypoxii pozitivně reguluje HIF-1, svou vazbou ho stabilizuje, jak bylo pozorováno na buněčných kulturách z různých typů karcinomů (Madan *et al.*, 2019). Komplex p53 s HIF-1 se poté může vázat na geny obsahující HRE jako je například VEGF, a zvyšovat jejich transkripci.

Důležitou roli v regulaci funkce p53 i dalších proteinů souvisejících s hypoxií hraje také protein CSB (z angl. Cockayne syndrom group B), který ovlivňuje distribuci p300 mezi HIF-1 a p53 tím, že s p53 kompetuje o p300 (Filippi *et al.*, 2008; Frontini and Proietti-De-Santis, 2009).

2.1.4 Hypoxické regulace nezávislé na HIF

V hypoxii může být transkripce genů ovlivněna i nezávisle na HIF, například změnami v methylaci histonů, které mění kondenzaci chromatinu (Batie *et al.*, 2019). Tato regulace se děje prostřednictvím dioxygenáz, v tomto případě demethyláz histonů obsahujících Jumonji-C doménu, které reagují na hladinu kyslíku podobně jako PHD regulující HIF-1.

Příkladem hypoxických regulací nezávislých na HIF je také úbytek keratinu 1 a 10 v kůži, což vede k netradiční diferenciaci keratinocytů, a může mít vliv například při reakci na infekci nebo UV záření (Park *et al.*, 2016). Nezávislé na HIF je také ovlivnění pohyblivosti nádorových buněk v ledvinách prostřednictvím thrombospondinu 1 (Bienes-Martínez *et al.*, 2012).

Hypoxická fosforylace translačního iniciačního faktoru eIF2 α (z angl. eukaryotic initiation factor 2) kinázou PERK také nevyžaduje HIF (Koumenis *et al.*, 2002). K aktivaci PERK dochází v reakci na stres endoplazmatického retikula (ER). To je situace, kdy se v endoplazmatickém retikulu hromadí nesložené proteiny, a může nastat mimo jiné při hypoxii. Kináza PERK se nachází v lumen ER a v reakci na ER stres se autofosforyluje. Následně PERK fosforyluje eIF2 α , čímž snižuje jeho aktivitu a tlumí syntézu různých proteinů souvisejících například s udržením hladiny glukózy. Útlumem syntézy proteinů na úrovni translace i syntézy mRNA buňka šetří energii, což zvyšuje šanci na přežití v hypoxii. Fosforylace je reverzibilní, při normoxii je tedy syntéza proteinů obnovena. Hladina eIF2 α se během této regulace nemění, pouze úroveň její fosforylace. Tento mechanismus je přítomný také v embryu a umožňuje přežití v prostředí s nízkým obsahem kyslíku, nebo může ovlivňovat růst nádoru.

2.2 Hypoxie v nádorech

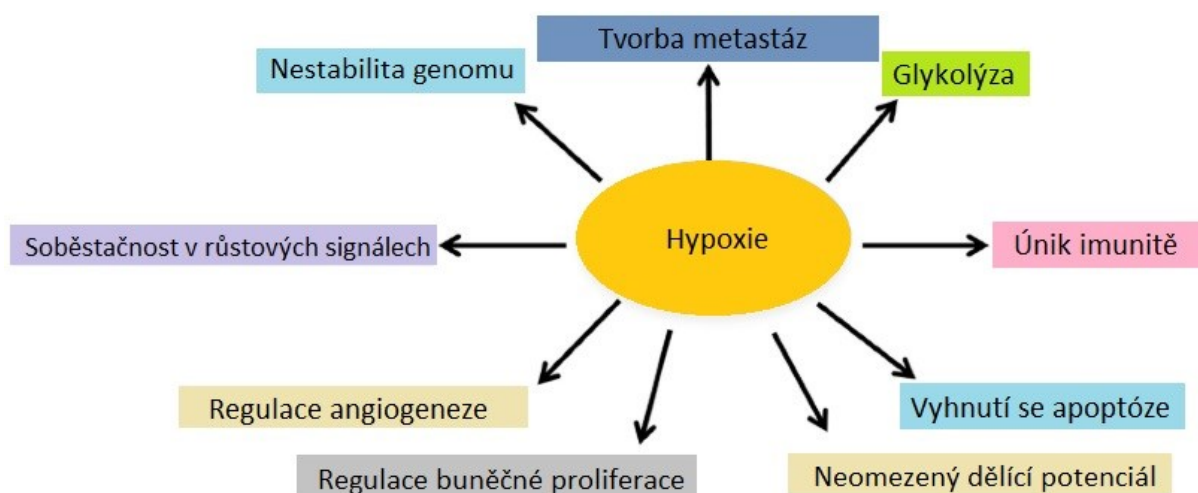
Hypoxie se v nádorech vyskytuje běžně. Pro ilustraci lze uvést například porovnání běžné prsní tkáně, kde je tlak kyslíku 65 mmHg, a nádoru prsu, kde tlak kyslíku byl často nižší než 2,5 mmHg (Vaupel *et al.*, 1991). V nádorech může hypoxie vzniknout z mnoha příčin. Obvyklé je nedostatečné prokrvení nádoru způsobené jeho rychlým růstem, během kterého se netvoří dostatek nových cév. To také způsobuje problémy při podávání léků a celkově zhoršuje prognózu, stejně jako anémie (Nordsmark *et al.*, 2005). Hypoxii může také zhoršovat kouření (Hoff, Grau and Overgaard, 2012). Signální dráhy ovlivněné HIF mohou být v buňkách aktivovány i nezávisle na hypoxii některými viry, což bude probráno v následujících kapitolách.

Nádorové buňky tyto mechanismy mohou využívat například když následkem svého růstu nemohou být dostatečně zásobovány kyslíkem pomocí již existujících cév (Qiu and Simon, 2015). Možné důsledky hypoxie v nádorech shrnuje Obrázek 3.

2.2.1 Warburgův efekt

Jeden z mechanismů, typický pro nádorové buňky, je Warburgův efekt neboli aerobní glykolýza (Heiden, Cantley and Thompson, 2009). Je to jev, kdy buňky přejdou na glykolýzu i v prostředí s dostatkem kyslíku. Probíhá tedy fermentace glukózy na laktát, přestože je

dostatek kyslíku pro oxidativní fosforylaci, a tvoří se méně ATP. Glukóza může být ale použita jako zdroj uhlíku pro syntézu nukleotidů, které jsou potřeba pro růst a dělení buňky, což je pro nádorové buňky výhodné. K navození změn metabolismu jako je Warburgův efekt mohou přispět i virové onkogeny, například onkogen E6 lidského papilomaviru (HPV, z angl. human papilloma virus) 16, nebo virová microRNA (miRNA) v případě lidského herpesviru 8 způsobujícího Kaposiho sarkom (KSHV, z angl. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus), jak bude probráno dále (Guo *et al.*, 2014; Yogeve *et al.*, 2014).



Obrázek 3 – Role hypoxie v nádorech, převzato a upraveno podle (Al Tameemi *et al.*, 2019).

Nedostatek kyslíku může mít za následek zastavení buněčného cyklu, případně navození diferenciace nebo apoptózy - závislé i nezávislé na p53, což vede k zastavení růstu nádoru (Koch, Kruuv and Frey, 1973; Graeber *et al.*, 1994; Itoigawa *et al.*, 2010).

Hypoxie může ale vyvolat změny proteomu, které sníží sklon k diferenciaci, zastavení růstu nebo apoptóze a vedou k překonání nedostatku kyslíku, živin a k úniku z nepříznivého prostředí, expanzi nádoru. Tyto změny jsou kontrolovány převážně HIF-1.

Nádorové buňky mohou měnit svůj metabolismus, přejít na anaerobní glykolýzu. S těmito změnami souvisí mimo jiné exprese transportérů glukózy, obsahujících ve svých promotorech HRE, GLUT 1 a GLUT 3 (z angl. glucose transporter) pod vlivem HIF (Airley *et al.*, 2001). Tyto transportéry usnadňují transport glukózy mezi buňkami, a tak pomáhají rychle se dělícím nádorovým buňkám zajistit dostatečný přísun energie. Dalším významným faktorem ovlivňujícím buněčný metabolismus je karbonová anhydráza IX (CAIX, z angl. carbon anhydrase IX) (Pastorekova and Gillies, 2019). Je to povrchový glykoprotein, jehož exprese je

indukována mimo jiné hypoxií. Podílí se na udržení acidobazické rovnováhy prostřednictvím reverzibilní hydratace oxidu uhličitého. Dále může také ovlivňovat export protonů a laktátu z buňky nebo adhezivitu buněk. U člověka existuje 15 isoform karboanhydráz, z nichž tři mají výrazné spojení s nádory – CAIV, CAIX a CAXII. Z toho je nejvýznamnější právě CAIX, v jejímž promotoru se nachází HRE a je tedy regulována HIF. Míra exprese CAIX byla spojena se zvýšeným růstem nádoru, zvýšenou invazivitou a tvorbou metastáz a také s resistencí k určitým typům léčby (Sadlecki *et al.*, 2014). CAIX je tedy spolu s GLUT1 a HIF významným markerem hypoxie v nádorech.

Dále si mohou nádorové buňky zajistit zvýšený přísun kyslíku tvorbou nových cév a erythrocytů prostřednictvím EPO, angiogeninu a růstových faktorů jako je VEGF (Hartmann *et al.*, 1999; Acs *et al.*, 2003). Nádorové buňky v hypoxii také mohou z nepříznivého prostředí uniknout, měnit frekvenci dělení a tvořit metastázy prostřednictvím exprese proteinů, mezi které patří integriny, umožňující migraci nádoru, katepsiny, a další enzymy s potenciálem zvýšit invazivitu nádoru (Cuvier, Jang and Hill, 1997; Hasan *et al.*, 1998).

V hypoxických nádorech probíhá intenzivní selekce buněk obsahujících výše uvedené proteiny umožňující nejen přežití v hypoxii, ale také zvyšující agresivitu nádoru. Na počátku hypoxie odumře část buněk, ale ty mající schopnost přežít v hypoxii mohou tvořit metastázy a rozšiřovat hypoxické části nádoru (Kim *et al.*, 1997; Kinoshita *et al.*, 2001). Hypoxické nádory se ukázaly být invazivnější, měly větší potenciál tvořit metastázy (Young, Marshall and Hill, 1988; Brizel *et al.*, 1996; Höckel *et al.*, 1996). Byla prokázána větší nestabilita genomu v hypoxii, což může vést k častějším mutacím a většímu potenciálnímu nebezpečí nádoru (Russo *et al.*, 1995).

Hypoxie je pro nádory typická, hypoxické faktory jsou proto častým cílem léčby. Zároveň ale může být příčinou rezistence nádorů k určitým způsobům léčby (Stadler *et al.*, 1999; Nordmark *et al.*, 2005; Samanta *et al.*, 2014).

3 Hypoxie a viry

Viry mají různé nároky na kyslík. Některé vyžadují vyšší hladiny kyslíku, například virus chřipky infikující prokysličené epitelu. Jiným virům se naopak nejlépe daří v hypoxickém prostředí. Některé viry jsou schopné přeprogramovat buněčný metabolismus tak, aby podpořily vlastní reprodukci a šíření. Na příkladu adenoviru 8 nebo lidského cytomegaloviru bylo pozorováno, že tyto viry podporovaly v buňce glykolýzu pro usnadnění vlastní replikace (Thai *et al.*, 2014; Yu, Maguire and Alwine, 2014).

Hypoxické prostředí hraje při virových infekcích významnou roli, protože může také ovlivňovat průběh infekce. Lytický cyklus, tedy uvolňování virionů z buňky lyzí a napadání dalších buněk, indukuje hypoxie u herpesvirů, které jsou mimo jiné původci nádorů (Davis *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2006). HIF může také podněcovat imunitní odpověď proti viru, například prostřednictvím zvýšení produkce interferonu beta (Hwang *et al.*, 2006).

Hypoxie snižuje nebo zvyšuje expresi virových proteinů prostřednictvím na HIF závislých i nezávislých mechanismů během transkripce, translace, nebo posttranslačně. Hypoxie zvyšuje hladinu proteinů viru lymfocytární choriomeningitidy (LCMV, z angl. lymphocytic choriomeningitis virus), který může způsobovat onemocnění centrální nervové soustavy nebo potraty, na úrovni transkripce (Tomaskova *et al.*, 2011). Zároveň bylo ale pozorováno, že hypoxie snižovala expresi některých adenovirových proteinů, což by mohlo být překážkou při onkolytické terapii využívající právě adenoviry (Pipiya *et al.*, 2005).

3.1 Virové infekce a hladina kyslíku

Viry a proteiny hostitelských buněk ovlivněné hypoxií spolu mohou interagovat různými způsoby. Jednou možností je degradace nebo blokáce PHD vedoucí ke stabilizaci HIF nebo stabilizace HIF přes narušení vazby pVHL na HIF-1 α . Dále mohou viry reagovat s NO a ROS nebo aktivovat nitrobuněčné kinázy, a tak aktivovat HIF během transkripce, translace i posttranslačně.

Variantu stabilizace HIF prostřednictvím blokáce PHD, enzymu, který běžně při hypoxii napomáhá degradaci HIF-1 α v proteazomu, využívá virus Epstein a Barrové (EBV, z angl. Epstein Barr virus), lidský herpesvirus 4, který může způsobovat Burkittův lymfom a nasofaryngeální nádory. Virus EBV kóduje proteiny EBNA 3 a EBNA 5 (z angl. Epstein Baar nuclear antigen), které tvoří v jádře hostitelské buňky komplex s PHD 1, resp. 2, a tím snižují

hydroxylaci HIF-1 α , která za běžných podmínek vede k degradaci HIF-1 α (Darekar *et al.*, 2012).

Jiný mechanismus využívá virus hepatitidy B (HBV, z angl. hepatitis B virus). Na HIF-1 α se přímo váže X protein (HBx) kódovaný HBV. Přestože se neváže na stejné místo jako pVHL, tak snižuje jeho interakci s HIF-1 α a tudíž HIF-1 α stabilizuje (Moon *et al.*, 2004). Takto HBV zajistí dostatečné prokrvení nádoru.

Zvýšená hladina HIF se vyskytuje také v případě infekce virem lidského imunodeficitu (HIV, z angl. human immunodeficiency virus). Při pokusech na buněčných kulturách autoři pozorovali, že virus HIV zvyšuje mitochondriální produkci ROS, konkrétně peroxidu vodíku, prostřednictvím HIV kódovaného proteinu Vpr (z angl. viral protein R) (Deshmane *et al.*, 2009). Produkce ROS vedla k hromadění podjednotky HIF-1 α , a tedy ke stabilizaci HIF-1. Zároveň protein Vpr v závislosti na HIF-1 α aktivoval promotor HIV přes jeho dlouhou koncovou repetici (LTR z angl. long terminal repeat) a podporoval tak jeho transkripci. Tyto výsledky ukazují na možnou existenci pozitivní zpětné vazby mezi HIF-1 α a proteiny kódovanými virem HIV.

Viry mohou také stabilizovat HIF pomocí aktivace nitrobuněčných kináz. Hladinu HIF-1 α i HIF-2 α na transkripční úrovni ovlivňuje KSHV. Expresí latentních genů KSHV zvyšuje hladinu HIF prostřednictvím kináz z rodiny Src a tím aktivuje například VEGF (Carroll *et al.*, 2006). Dále KSHV ovlivňuje metabolismus hostitelské buňky prostřednictvím exprese virové miRNA a stabilizace HIF-1 (Yogev *et al.*, 2014). MiRNA viru KSHV snižuje expresi genu kódujícího prolylovou hydroxylázu PHD2, *EGLN*, a také genu pro mitochondriální protein tepelného šoku, *HSPA9*, který podporuje tvorbu nových mitochondrií. Takto může KSHV stabilizovat HIF-1 a přeprogramovat buněčný metabolismus směrem k anaerobní glykolýze nebo snížit počet mitochondrií, což zvyšuje šanci na přežití infikované buňky a poskytuje jí růstovou výhodu. Virus takto také přispívá k udržení latentní infekce, která nepřímo souvisí s tvorbou nádoru.

Podobně zvyšuje hladinu HIF i lidský cytomegalovirus (HCMV, z angl. human cytomegalovirus). Stimuluje transkripci HIF-1 α za pomoci proteinkinázy B, neboli Akt (McFarlane *et al.*, 2011). Virus HCMV má navíc i jiné způsoby, jak ovlivnit buněčný metabolismus. Může ovlivnit metabolismus glukózy zvýšením exprese transportérů glukózy GLUT 4 a 2 prostřednictvím lidského transkripčního faktoru ChREBP (z angl. carbohydrate-responsive element-binding protein) (Yu, Maguire and Alwine, 2014).

Také EBV si přizpůsobuje buněčný metabolismus aktivací kináz, spolu s výše zmíněným mechanismem blokace PHD. Onkoprotein LMP1 (z angl. latent membrane protein 1), produkovaný EBV během latentní infekce, zvyšuje množství ROS v buňce. Spolu s LMP1 ovlivňuje produkci HIF-1 α i aktivace MAPK p42/p44 (Wakisaka *et al.*, 2004). EBV ale tímto mechanismem neovlivňuje množství ani stabilitu mRNA pro HIF-1 α . Indukuje syntézu proteinu HIF-1 α , regulace tedy probíhá na translační úrovni.

Virová regulace HIF pomocí kináz může probíhat i posttranslačně. Virus hepatitidy E (HEV, z angl. hepatitis E virus) produkuje protein ORF3 (z angl. open reading frame 3). Ten prostřednictvím kinázy PI3K (z angl. phosphatidylinositol 3 kinase), která dále aktivuje proteinkinázu B, neboli Akt, posttranslačně stabilizuje HIF-1 α . Zároveň ORF3 zprostředkovává fosforylaci kinázy ERK, která je součástí dráhy MAPK a fosforyluje protein p300, čímž ve výsledku také aktivuje HIF-1 α (Moin *et al.*, 2009). I další viry hepatitidy, virus hepatitidy C (HCV, z angl. hepatitis C virus) a HBV, využívají MAPK dráhu k post-translační aktivaci HIF-1 α (Yoo *et al.*, 2003; Nasimuzzaman *et al.*, 2007).

Studovány byly také interakce proteinů kódovaných HPV s proteiny hostitelských buněk v hypoxických podmínkách. Tyto interakce jsou uskutečňované především prostřednictvím virových onkoproteinů E6 a E7 a je jim věnována jedna z následujících kapitol.

3.2 Viry indukující nádory

Jak již bylo zmíněno výše, viry při infekci buňky reagují s četnými buněčnými proteiny a významným způsobem ovlivňují chování buňky. Některé viry jsou schopny navodit imortalizaci a nádorovou transformaci hostitelských buněk. Takové viry se nazývají nádorové. Mohou buď kódovat vlastní virový onkogen anebo buňky transformují nepřímo, například když včleněním se do genomu ovlivní protoonkogen. Prvním popsáním virem s prokázanou indukcí nádorového bujení byl v roce 1964 EBV způsobující Burkittův lymfom a nasofaryngeální nádory (Moore and Chang, 2010). V roce 2008 bylo celosvětově zaznamenáno 12,7 milionů nových případů rakoviny, z toho bylo 16,1 %, tedy asi 2 miliony, způsobených viry. Z čísel vyplývá, že přibližně 1 z 5 úmrtí na rakovinu bylo způsobeno viry (De Martel *et al.*, 2012) . Mezi známé viry indukující nádory patří EBV, HBV, lidský T-lymfotropní virus (HTLV, z angl. human T-cell lymphotropic virus), HPV, HCV, KSHV a polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV, z angl. Merkel cell polyomavirus) (Tabulka 2).

Tabulka 2 – Lidské viry způsobující nádory a odhad počtu celosvětových nových případů za rok. Podle (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019).

Virus	Rok objevení	Typ cílových buňek	Typ nádoru	Počet nových případů za rok (celosvětově)
EBV	1964	B-lymfocyty, T-lymfocyty, endoteliální buňky	lymfomy, nádory nosohltanu, nádory trávicího traktu, leukémie	127000
HBV	1967	hepatocyty	hepatocelulární karcinom	410000
HTLV	1980	T-lymfocyty	lymfomy a leukémie	3000
HPV	1983	keratinocyty	nádory anogenitální oblasti, hlavy a krku	636000
HCV	1989	hepatocyty	hepatocelulární karcinom	170000
KSHV	1994	B-lymfocyty, endoteliální buňky	lymfomy, Kaposiho sarkom	50700
MCPyV	2008	Merkelovy buňky	nádor z Merkelových buněk	2000

Nejvyšší nárůst počtu virově indukovaných nádorů ročně mají na svědomí HPV. V následujících kapitolách se práce bude věnovat nádorům způsobeným HPV a jejich interakcím s hostitelem v hypoxických podmínkách.

3.2.1 Nádory indukované lidskými papilomaviry

Nejčastějším nádorem indukovaným HPV je karcinom děložního čípku, který je celosvětově třetím nejčastějším nádorem u žen. V roce 2008 bylo diagnostikováno 530 000 nových případů a 275 000 žen na něj zemřelo (Arbyn *et al.*, 2011). HPV způsobují i další nádory anogenitální oblasti mužů a žen, nádory vulvy, vaginy, řiti a penisu. Dále jsou HPV asociovány s částí nádorů hlavy a krku zejména v oblasti orofaryngu (Gillison, 2000).

Papilomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Kapsida má průměr přibližně 55 nm a jejich genom o velikosti téměř 8000 bp (z angl. base pair) tvoří dvojšroubovice DNA. Virový genom je rozdělen na časnou (geny E1, 2, 4, 5, 6 a 7) a pozdní oblast (geny L1 a 2). Pro regulaci virové replikace a transkripce je důležitá dlouhá nekódující oblast (LCR, z angl. long control region) nacházející se mezi L1 a E6 ORF. LCR obsahuje transkripční a replikační regulační elementy a počátek replikace. Časně geny se účastní replikace genomové DNA viru, regulace virové transkripce a buněčné transformace. Pozdní geny kódují proteiny kapsidy a řídí její skládání.

HPV pro svojí propagaci využívají buněčný aparát. Virové proteiny interagují s celou řadou buněčných transkripčních faktorů nebo enzymů a tím významně ovlivňují např. buněčné dělení, diferenciaci či vstup buněk do apoptózy, z čehož také vyplývá jejich rozdílný onkogenní potenciál. Podle své schopnosti vyvolávat nádorovou transformaci se HPV dělí na vysoce rizikové (HR, z angl. high risk), to jsou zejména HPV 16, 18, 39, 45, 51 a další způsobující zhoubné nádory, a nízké rizikové (LR, z angl. low risk), jako například HPV 6, 11, 40 a 42, které většinou způsobují benigní bujení jako anogenitální bradavice či papilomatozu hrtanu (Haedicke and Iftner, 2013).

Karcinogenní efekt HR HPV mají na svědomí hlavně virové onkoproteiny E6 a E7, které se výrazně podílejí na interakcích s hostitelskou buňkou. Virový onkoprotein E6 může označit p53 k degradaci v proteazomu, a tak potlačit jeho účinky (Scheffner *et al.*, 1990) a ovlivnit dráhy, které vedou k apoptóze nebo ovlivňují růst buněk a angiogenezi (Zimmermann *et al.*, 1999). Onkoprotein E6 také váže p300/CBP, čímž může tlumit transkripční aktivitu tumor

supresorového proteinu p53. Na druhou stranu bylo pozorováno, že onkoprotein E7 z HPV 16 stabilizuje p53 na posttranskripční úrovni (Demers, Halbert and Galloway, 1994). Dle později provedené studie (Eichten *et al.*, 2002) se ale hladina proteinů regulovaných p53 neměnila, tudíž p53 nebyl aktivován jako transkripční faktor. Protein p53 zde nebyl ani méně náchylný k degradaci. Onkoprotein E7 svou vazbou destabilizuje tumor supresorový protein pRb (z angl. retinoblastoma protein), a také další geny z rodiny Rb, p107 a p130. Proteiny Rb regulují G₁-S kontrolní bod buněčného cyklu a svou aktivitou tlumí buněčné dělení, a tedy i nádorové bujení. Pod vlivem E7 je pRb degradován proteazomem, a virem transformované buňky takto překonají kontrolní bod (Slebos *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 2001; Zhang, Chen and Roman, 2006). Vazba E7 na pRb také způsobí disociaci transkripčních faktorů z rodiny E2F, regulátorů buněčného cyklu, od pRb. Po uvolnění z pRb se mohou vázat na promotory cílových genů, například cyklin-dependentních kináz, a aktivovat tak zvýšenou proliferaci a karcinogenezi.

3.2.2 Lidské papilomaviry a hypoxie

Lidské papilomaviry mají schopnost působit na buněčný metabolismus nebo angiogenezi prostřednictvím ovlivnění exprese hostitelských proteinů.

Ve studii provedené *in vitro* na buněčných liniích odvozených z nádorů hlavy a krku byla pozorována vyšší hladina HIF-1 α u nádorů pozitivních na HPV než u nádorů negativních na HPV, a to v hypoxii i v normoxii (Knuth *et al.*, 2017). Vyšší stabilita HIF-1 α byla způsobena jeho sníženou hydroxylací hydroxylázou PHD2, u nádorů pozitivních na HPV byla funkce PHD2 omezena. Díky rozdílné hladině HIF se buňky taktéž lišily v přizpůsobení se hypoxii. U nádorových buněk negativních na HPV byla v hypoxii pozorována snížená migrace a proliferace, kdežto u buněk pozitivních na HPV nikoliv. Zvýšená exprese HIF-1 vedla k zesílení angiogeneze prostřednictvím VEGF, a tedy lepšímu prokrvení nádoru.

Na druhou stranu na buněčných liniích z nádorů hlavy a krku vnesených podkožně do boku myši bylo pozorováno méně hypoxických oblastí v nádorech pozitivních na HPV 16 než u nádorů negativních na HPV (Hanns *et al.*, 2015). Buňky nádorů pozitivních na HPV byly také citlivější na hypoxii, přežily kratší dobu než HPV negativní. Tato zjištění potvrdila i analýza vzorků od pacientů s nádory orofaryngu, kde byla pozorována nižší exprese genů ovlivněných hypoxií jako jsou HIF-1 α , PHD1, 2 a 3, GLUT1 a 3, a VEGF-A v nádorech pozitivních na HPV než v nádorech negativních na HPV. I v této studii ale byla v nádorech pozitivních na

HPV intenzivnější angiogeneze. Rozdíly ve výsledcích mohly být způsobeny například použitím omezeného počtu vzorků nebo porovnáváním rozdílných typů nádorů indukovaných HPV. Tyto poznatky nasvědčují tomu, že nádory pozitivní na HPV se jinak přizpůsobují hypoxii než nádory negativní na HPV a mohou indukovat neoangiogenezi protože mívají často vyšší expresi transkripčního faktoru HIF-1.

3.2.2.1 Onkoproteiny HPV a hypoxie

Ve srovnávacích pokusech na buněčných liniích odvozených z keratinocytů lidské předkožky, do kterých byla transfekcí vpravena DNA HPV, bylo pozorováno, že HR HPV 31 a 16 i LR HPV 11 jsou v hypoxii schopné 2,5x zvýšit expresi proteinu HIF-1 α , a to již v raných stádiích nádorů nebo benigního bujení v případě LR HPV (Nakamura *et al.*, 2009). Autoři zde vytváří model regulace prostřednictvím virových proteinů E6 a E7, v provedených pokusech aktivitu HIF-1 zvyšovaly oba tyto proteiny nezávisle na sobě. Z toho vyplývá, že tato regulace není zcela závislá na p53, protože každý z proteinů E6 a E7 jeho hladinu ovlivňuje jinak (viz. kap 3.2.1). Výsledky indikují, že tato regulace probíhá posttranslačně prostřednictvím zvýšení stability proteinu HIF-1 α čímž se zvýší celková aktivita HIF-1. Na základě dříve provedených studií jiných autorů týkajících se možných způsobů regulace transkripčního faktoru HIF-1 α (Abraham, 2003; Bárdos, Chau and Ashcroft, 2004) Nakamura a spol. testovali i hypotézy, že regulace probíhá na úrovni mRNA nebo prostřednictvím dráhy mTOR, ale ani jedna z těchto variant nebyla prokázána. V návaznosti na zvýšenou aktivitu HIF-1 autoři dále zkoumali, zda se mění i hladina genů regulovaných tímto transkripčním faktorem. Z genů, jejichž expresi HIF běžně zvyšuje, byla pozorována zvýšená hladina VEGF podporujícího angiogenezi, a také CAIX regulující pH. Na druhou stranu, hladina transportéru glukózy GLUT 1 zůstala neměnná, a interleukinu 8 (IL-8), který se mimo jiné podílí na imunitní odpovědi proti virům, bylo pozorováno v buňkách pozitivních na HPV výrazně méně. Autoři vyslovují několik hypotéz, proč byla pozorována zvýšená exprese jenom některých genů regulovaných HIF-1. Buďto mají HPV nějaký mechanismus, jak specificky ovlivnit spektrum genů ovlivňovaných HIF-1, nebo zde regulace těchto genů probíhá nezávisle na HIF-1. V případě GLUT 1 je také možné, že se hladina zvedla pouze mírně, a nebyla detekována.

V další studii autoři (Liu *et al.*, 2016) pozorovali, že proteiny E6 i E7 z HPV 16 v buněčných liniích z nádorů plic aktivují signální dráhu ERK1/2. Ta je součástí dráhy MAPK a podílí se na hromadění HIF-1 α prostřednictvím onkoproteinu E6 a také na expresi mRNA pro VEGF a IL-8 a sekreci těchto proteinů. Zvýšení angiogeneze nebo zvýšení hladiny HIF-1 α proteinem E7 zde nebylo pozorováno. Na zvýšené angiogenezi se kromě ERK1/2 podílí také signální

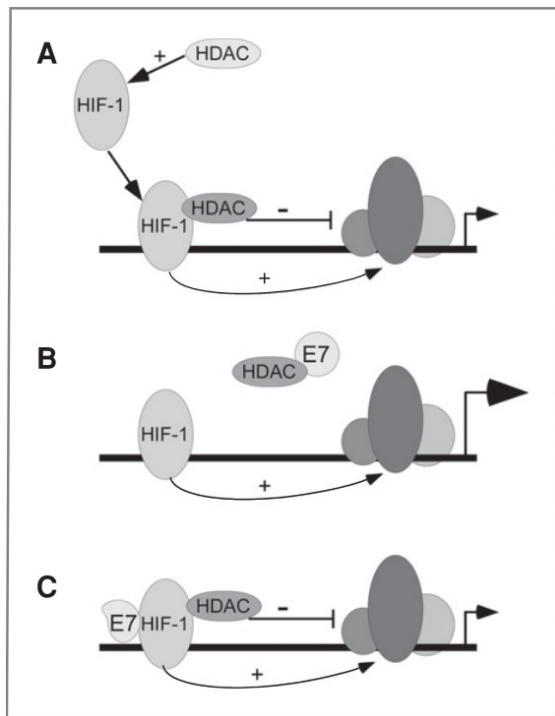
dráha PI3K/Akt, což bylo pozorováno na buněčných kulturách z nádoru děložního čípku pozitivních na HPV 16 (Tang *et al.*, 2007).

Souvislost exprese virových onkoproteinů E6 a E7 se zvýšenou aktivitou HIF-1 potvrzuje i další studie (Fan *et al.*, 2016). Autoři na buněčných liniích z nádorů plic po transfekci HPV 16 pozorovali ve spojení s expresí E6 a E7 zvýšenou expresi proteinu HIF-1 α , a také vyšší expresi mRNA i proteinu transportéru glukózy GLUT 1. Byly provedeny i pokusy při kterých byly inhibovány onkoproteiny E6 a E7, které potvrdily předchozí výsledky. Rovněž byla pozorována signifikantní souvislost zvýšené exprese proteinu HIF-1 α s expresí GLUT 1. V rámci stejné studie bylo zkoumáno 150 pacientů s onemocněním plic. Na vzorcích pocházejících od těchto pacientů byla zaznamenána vyšší exprese proteinů HPV 16 a HIF-1 α i GLUT 1 ve vzorcích od pacientů se zhoubnými nádory oproti vzorkům s benigním onemocněním. Na základě těchto výsledků autoři studie uvádějí hypotézu, která je ve shodě s dalšími uvedenými výzkumy (Nakamura *et al.*, 2009), že regulace HIF-1 α probíhá prostřednictvím onkoproteinů E6 a E7 buďto během translace, nebo posttranslačně.

Také ve studii provedené na vzorcích od 62 pacientů s nádory hlavy a krku indukovanými HPV 16 byla pozorována zvýšená hladina proteinu HIF-1 α (Rodolico *et al.*, 2011). Tentokrát se autoři zaměřili na souvislost infekce virem HPV 16, hladiny virového onkoproteinu E7 a exprese proteinu HIF-1 α . Dle očekávání byl protein E7 exprimován ve všech vzorcích pozitivních na HPV 16 a jeho hladina pozitivně korelovala s množstvím HIF-1 α . Z toho tedy v této studii vyplývá, že protein E7 je nezbytný pro schopnost HPV nádorově transformovat hostitelské buňky, a zároveň má schopnost zvyšovat množství proteinu HIF-1 α . I zde autoři pozorovali zvýšenou expresi HIF-1 α již v raných stádiích nádorů. Na rozdíl od některých jiných studií je zde ale uvedeno, že jsou tyto regulace nezávislé na hladině kyslíku – hladina HIF-1 α byla stejná ve všech buňkách, nesouvisela s jejich vzdáleností od cév nebo s množstvím nekrotických úseků nádoru.

Během výzkumu *in vitro* na buněčných liniích z keratinocytů lidské předkožky pozitivních na HPV autoři shledali, že protein E7 z HR HPV 16,18 a 31 i LR HPV 11 tvoří přímo komplex s HIF-1 α (Bodily, Mehta and Laimins, 2011). Tvorba tohoto komplexu ale není pro aktivaci HIF-1 nezbytná. Podle autorů regulace probíhá prostřednictvím vazby deacetyláz histonů (HDAC z angl. histone deacetylase) na C-konec onkoproteinu E7. Dle modelu vytvořeného autory HDAC za běžné situace v buňce dávají nezbytný aktivační signál transkripci závislé na HIF-1, ale zároveň jejich přítomnost v blízkosti transkripčního komplexu může mít i tlumivý

efekt. Onkoprotein E7 svou vazbou HDAC umožní přetrvání aktivačního signálu, ale tlumí inhibiční efekt, tudíž celkově zvyšuje transkripci genů závislých na HIF-1 (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Model aktivace transkripce závislé na HIF-1 prostřednictvím proteinu E7. A: Histonové deacetylázy (HDAC) poskytují nezbytný aktivační signál, ale mohou mít na transkripční komplex i inhibiční efekt. B: Protein E7 váže HDAC, čímž tlumí inhibiční efekt, ale zároveň je umožněno přetrvání aktivačního signálu. C: V přítomnosti mutované formy E7 se zvýšila interakce HIF-1 s E7 a transkripce nebyla posílena jako v případě B. Převzato z (Bodily, Mehta and Laimins, 2011).

Mechanismus zvýšení exprese HIF-1 α onkoproteinem E6 spočívá v posttranslační stabilizaci HIF-1 α , jak bylo pozorováno *in vitro* na buněčných liniích pozitivních na HPV 16 (Guo *et al.*, 2014). Autoři pozorovali, že protein E6 tvoří s HIF-1 α komplex a tlumí interakci HIF-1 α s VHL, tudíž je HIF-1 α méně ubiquitinylován a není degradován proteazomem. Na buněčných liniích nádorů pozitivních na HPV 16 bylo pozorováno, že onkoprotein E6 HPV 16 podporuje glykolýzu a angiogenezi. Na základě toho, že protein E6 inhibuje p53, a nefunkčnost proteinu p53 byla v již v jiném výzkumu spojena s aktivací VEGF (Kieser *et al.*, 1994), by se dalo předpokládat, že regulace probíhá touto cestou. E6 je ale schopen aktivace VEGF nezávisle na p53 (López-Ocejo *et al.*, 2000).

Na vzorcích od 129 pacientů s benigními onemocněními a nádory děložního čípku byla pomocí imunohistochemických metod zkoumána exprese několika proteinů, které souvisí s metabolismem nádorových buněk v hypoxii a zároveň jsou ovlivňovány transkripčním

faktorem HIF-1 (Pinheiro *et al.*, 2014). Mezi nimi byly membránové transportéry MCT 1 a MCT 4 (z angl. monocarboxyl transporter), které přenášejí molekuly jako je laktát a pyruvát. Mají proto význam při Warburgovu efektu, transportují laktát ven z buňky, a zároveň se podílejí na regulaci pH, pomáhají buňce předcházet překyselení, protože z buňky transportují protony. Dále autoři sledovali množství povrchového glykoproteinu CD 147, který úzce souvisí s regulací MCT (Wilson *et al.*, 2005) a také byla pozorována hladina přenašeče glukózy GLUT 1 a anhydrázy CAIX. V případě MCT 4 a GLUT 1 byla pozorována signifikantně vyšší hladina u závažnějších stádií nádorů, u MCT 1, CD 147 a CAIX podobná souvislost prokázána nebyla. Neprůkaznost výsledků mohla být ale v některých případech způsobena příliš malým počtem vzorků. Autoři na *in vitro* buněčných kulturách z keratinocytů předkožky, které exprimovaly buď HPV 16 proteiny E6 a E7, nebo celý genom HPV 16 nebo 18, dále sledovali, jak zkoumané proteiny hostitelské buňky ovlivní exprese proteinů HPV. Hladinu MCT 4 a CD 147 zvyšovala exprese E7 i celého genomu HPV, totéž platilo pro CAIX. Naopak MCT 4 ovlivněn nebyl, a hladinu GLUT 1 neovlivnily samotné proteiny E6 a E7, ale pouze exprese celého genomu HPV. Pozorování autorů tedy částečně potvrzuje fakt, že zvýšená hladina virových proteinů hraje roli v anaerobním metabolismu, resp. Warburgovu efektu, v hypoxických maligních nádorech. Zároveň byla pozorována zvýšená hladina některých těchto proteinů ve spojení s infekcí HPV. Nádory exprimující tyto proteiny byly agresivnější, protože mají jednak možnost využít energie z glykolýzy k rychlému růstu, a navíc jsou odolnější proti překyselení. U proteinů, kde nebyl pozorován očekávaný nárůst hladiny sledovaných buněčných proteinů mohou existovat ještě jiné mechanismy regulace, anebo byl nárůst tak malý, že nebyl na daném počtu vzorků signifikantní.

V nádorech asociovaných s HPV se také vyskytuje hypoxií indukovaná prodloužená aktivace transkripčního faktoru NF- κ B, která byla pozorována na buněčných kulturách lidských keratinocytů pozitivních na HPV16 (An *et al.*, 2008). Tento faktor hraje roli během tvorby metastáz a při úniku nádoru z nepříznivého prostředí. V popisovaném modelu regulace jsou v hypoxii ubikvitinylací, která je nepřímo zprostředkována onkoproteinem E6 z HPV, stabilizovány adaptorové proteiny TRAF (z angl. TNF receptor associated factor), konkrétně TRAF6. Protein TRAF6 aktivuje přes receptor TNF (z angl. tumor necrosis factor) kaskádu kináz, komplex IKK (z angl. I κ B kinase), vedoucí k aktivaci faktoru NF- κ B. Zvýšenou expresi NF- κ B v hypoxii způsobuje také snížená exprese deubikvitinylázy CYLD, která je negativním regulátorem dráhy NF- κ B. Autoři navrhují model, kde protein E6 interaguje přímo s CYLD a ubikvitinylací ho označuje k degradaci v proteazomu.

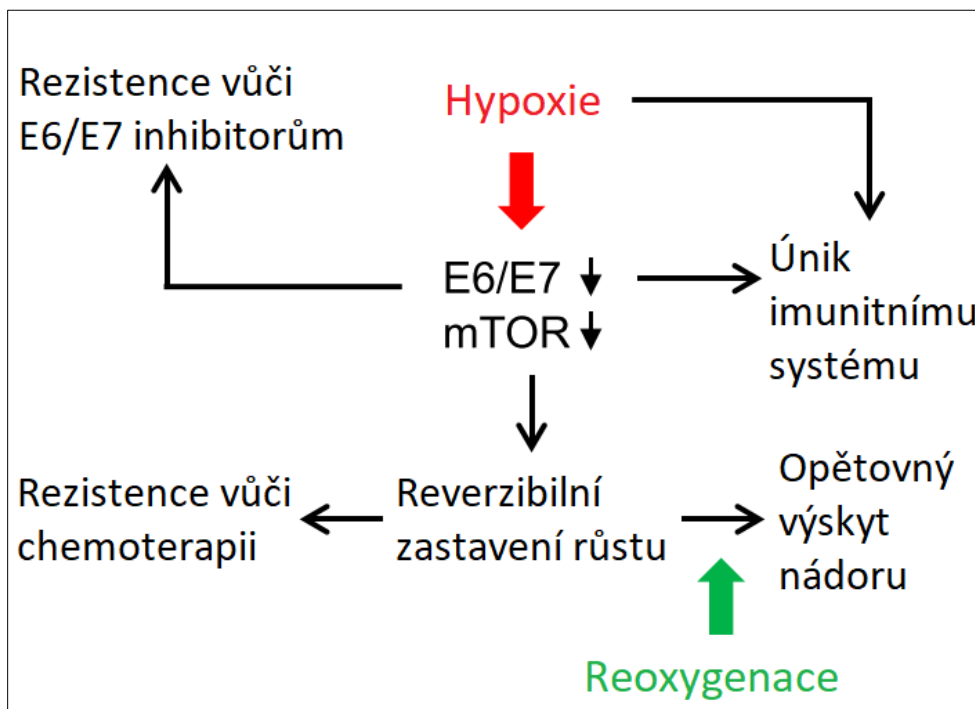
Mezi další virové proteiny, které mohou ovlivňovat metabolismus hostitelské buňky, patří protein E2. Tento protein se běžně nachází v jádře a působí jako negativní regulátor exprese virových proteinů E6 a E7 (Desaintes *et al.*, 1997). Na buněčných kulturách lidských keratinocytů infikovaných adenovirem exprimujícím HR HPV 18 geny, ale pomocí fluorescence bylo pozorováno, že se protein E2 přesouval z jádra do cytoplasmy a mitochondrií (Lai *et al.*, 2013). I v dalších pokusech *in vitro* a *in vivo* byla potvrzena lokalizace E2 ve vnější i vnitřní mitochondriální membráně. tento efekt nebyl pro LR HPV 6 prokázán. V mitochondriích může protein E2 zapříčinit poruchy až úplnou ztrátu křídla a také 2-3x zvyšuje produkci ROS. Mechanismy zvýšení produkce ROS proteinem E2 nejsou známy, ale mohlo by se jednat o narušení elektrontransportního řetězce na vnitřní mitochondriální membráně. Nedochovalo k indukci apoptózy, ale ke stabilizaci HIF-1 α , a to jak v hypoxii, tak v normoxii. V návaznosti na zvýšenou stabilitu HIF-1 α autoři sledovali i hladinu proteinů, jejichž exprese ovlivňuje HIF-1 a zaznamenali například zvýšené množství CAIX nebo VEGF. Virový protein E2 by se tedy mohl podílet se na indukci Warburgova efektu v nádorově transformovaných buňkách pozitivních na HPV, a tím podporovat proliferaci, mít i onkogenní efekt. Tyto poznatky byly ještě dále podpořeny změřením buněčné produkce laktátu, která byla v přítomnosti E2 zvýšená.

Onkoproteiny E6 a E7 mohou zvýšením aktivity HIF-1 ovlivnit i další proteiny, které jsou považovány za prognostické markery onemocnění. Mezi ně patří například cytokin MIF (z angl. macrophage migration inhibitory factor), který se podílí na imunitní odpovědi. V experimentech *in vitro* i *in vivo* na buněčných liniích exprimujících onkoproteiny E6 a E7 byla pozorována zvýšená exprese tohoto cytokinu (Kindt *et al.*, 2019). Dle hypotézy autorů tato regulace probíhá prostřednictvím zvýšení aktivity HIF-1 onkoproteiny E6 a E7 a mohla by vést k potlačení imunity a tudíž vzniku příznivějšího prostředí pro nádor.

Nádorové HPV mohou tedy prostřednictvím svých proteinů E6 a E7 měnit aktivitu HIF-1 a tak ovlivňovat spektrum genů aktivovaných HIF. Podle popsáných modelů by takto mohly HPV zvýšit transport glukózy nebo ovlivnit angiogenezi, což by mělo za následek lepší přežití nádoru. Dále by interakce proteinů HPV s proteiny hostitelské buňky mohly vést k oslabení imunitního systému, uniku nádoru z nepříznivého prostředí, zvýšené tvorbě metastáz nebo k vyhnutí se apoptóze a vzniku reverzibilních dormantních stádií.

3.2.2.2 Hypoxická dormantní stádia nádorů indukovaných HPV

V hypoxii (1% O₂) bylo na buněčných kulturách z nádorů děložního čípku pozitivních na HPV 16 a HPV 18 pozorováno výrazné potlačení exprese virových onkoproteinů E6 a E7. Autoři této studie ale zjistili, že potlačení exprese E6 a E7 nevede k senescenci jak by se dalo předpokládat na základě předchozích výzkumů (Goodwin *et al.*, 2000), ale jen k utlumení růstu, proliferace a exprese proteinů (Obrázek 5). Takto se tvoří dormantní stádia nádorů, která mají zvýšenou rezistenci vůči některým typům léčby (Hoppe-Seyler *et al.*, 2017). Tato stádia mohou sloužit jako rezervoáry nádoru, tedy zdroj, ze kterého se nádor po určité době, při reoxygenaci, může obnovit. Dle autorů by k senescenci vedla dráha mTOR, která je ústředním regulátorem řady procesů v buňce. Tato dráha je ale v hypoxii inhibována mTOR inhibitory, mezi které patří například tumor supresorový protein tuberin neboli TSC2 (z angl. tuberous sclerosis complex 2), který spolu s proteinem REDD1 (z angl. regulated in development and DNA damage response 1), jehož expresi v hypoxii zvyšuje HIF, reguluje dráhu mTOR v závislosti na dostupnosti energie (Brugarolas *et al.*, 2004) . Tyto inhibitory tedy umožňují nádorově transformované buňce uniknout senescenci i přes útlum E6 a E7 v hypoxii. Podobný mechanismus ale nebyl pozorován jen u nádorů pozitivních na HPV, ale i u nádorů negativních na HPV. Tento mechanismus hraje také roli během léčby, konkrétně takto může být inhibována senescence buněk vyvolaná chemoterapií.



Obrázek 5 – Model regulace vzniku hypoxických dormantních stádií nádorů pozitivních na HPV, převzato a upraveno podle (Hoppe-Seyler *et al.*, 2017).

4 Závěr

Hladina kyslíku ve tkáních běžně kolísá a v některých případech je kyslíkový gradient dokonce nezbytný pro správné fungování orgánů a organismu. Buňka na změny hladiny kyslíku reaguje prostřednictvím transkripčních faktorů indukovaných hypoxií, které ovlivňují expresi řady genů a také interagují s dalšími transkripčními faktory či signálními a regulačními drahami. Pro nádorové mikroprostředí je typický nedostatek kyslíku neboli hypoxie a spolu s dalšími faktory jako je například acidita může výrazně ovlivnit chování nádoru.

Při virové infekci hostitelské buňky dochází k ovlivnění buněčného metabolismu, což souvisí i se změnami buněčné signalizace a se změnami aktivity transkripčních faktorů. Některé viry jsou schopné navodit nádorovou transformaci buněk. K takovým se řadí i lidské papilomaviry, které jsou spojeny s řadou nádorových onemocnění. Karcinogenní efekt HPV mají na svědomí virové onkoproteiny E6 a E7. Tyto proteiny ovlivňují důležité signalizační dráhy a buněčné regulátory. V mnoha studiích, které se zabývaly nádory asociovanými s HPV, bylo také pozorováno zvýšení aktivity transkripčního faktoru indukovaného hypoxií HIF-1 i v normoxii. Prostřednictvím tohoto transkripčního faktoru se následně zvyšuje hladina jeho cílových proteinů jako je například růstový faktor VEGF, přenašeč glukózy GLUT nebo anhydráza CAIX. Zvýšená hladina těchto proteinů by mohla vést k intenzivnější angiogenezi a tedy lepšímu prokrvení nádoru, a zároveň proteiny jako GLUT a CAIX podporují v buňce glykolýzu, která poté poskytuje rychle se dělícím nádorovým buňkám více energie. Tyto změny by dle navrhovaných modelů mohly mít za následek také uniknutí nádoru z nepříznivého prostředí, oslabení imunitního systému nebo zvýšenou tvorbu metastáz. Nádory indukované lidskými papilomaviry by se také mohly v hypoxii vyhnout apoptóze vytvořením reverzibilních dormantních stádií, která by byla odolná vůči léčbě a sloužila by jako rezervoár nádoru.

Přesné mechanismy těchto interakcí často nejsou známy nebo jsou závěry pozorování kontroverzní a je zde proto prostor pro další výzkum. Jejich poznání má význam z hlediska možnosti vývoje nových cílených terapií, umožňuje nacházení nových cílů léčby a zároveň může vysvětlovat neúčinnost některých současných léčebných postupů.

5 Seznam literatury a zdrojů

přehledové články jsou označeny *

*Abraham, R. T. (2003) 'mTOR as a positive regulator of tumor cell responses to hypoxia', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 299–319. doi: 10.1007/978-3-642-18930-2_18.

Acs, G. *et al.* (2003) 'Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 162(6), pp. 1789–1806. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64314-3.

Airley, R. *et al.* (2001) 'Glucose transporter Glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 7(4), pp. 928–934.

An, J. *et al.* (2008) 'Inactivation of the CYLD Deubiquitinase by HPV E6 Mediates Hypoxia-Induced NF- κ B Activation', *Cancer Cell*, 14(5), pp. 394–407. doi: 10.1016/j.ccr.2008.10.007.

Arbyn, M. *et al.* (2011) 'Worldwide burden of cervical cancer in 2008', *Annals of Oncology*, 22(12), pp. 2675–2686. doi: 10.1093/annonc/mdr015.

*Bárdos, J. I. and Ashcroft, M. (2005) 'Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier, pp. 107–120. doi: 10.1016/j.bbcan.2005.05.001.

Bárdos, J. I., Chau, N.-M. and Ashcroft, M. (2004) 'Growth Factor-Mediated Induction of HDM2 Positively Regulates Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), pp. 2905–2914. doi: 10.1128/mcb.24.7.2905-2914.2004.

Batie, M. *et al.* (2019) 'Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 363(6432), pp. 1222–1226. doi: 10.1126/science.aau5870.

Bienes-Martínez, R. *et al.* (2012) 'Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/srep00788.

Bodily, J. M., Mehta, K. P. M. and Laimins, L. A. (2011) 'Human papillomavirus E7

enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases', *Cancer Research*, 71(3), pp. 1187–1195. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2626.

Brizel, D. M. *et al.* (1996) 'Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 56(5), pp. 941–943.

Brizel, D. M. *et al.* (1999) 'Oxygenation of head and neck cancer: Changes during radiotherapy and impact on treatment outcome', *Radiotherapy and Oncology*, 53(2), pp. 113–117. doi: 10.1016/S0167-8140(99)00102-4.

Brugarolas, J. *et al.* (2004) 'Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(23), pp. 2893–2904. doi: 10.1101/gad.1256804.

Cai, Q. *et al.* (2006) 'Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Protein LANA Interacts with HIF-1 To Upregulate RTA Expression during Hypoxia: Latency Control under Low Oxygen Conditions', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 80(16), pp. 7965–7975. doi: 10.1128/jvi.00689-06.

Carmeliet, P. *et al.* (1998) 'Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis', *Nature*, 394(6692), pp. 485–490. doi: 10.1038/28867.

*Carreau, A. *et al.* (2011) 'Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, 15(6), pp. 1239–1253. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.

Carroll, P. A. *et al.* (2006) 'Latent Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection of Endothelial Cells Activates Hypoxia-Induced Factors', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 80(21), pp. 10802–10812. doi: 10.1128/jvi.00673-06.

Chen, E. Y., Fujinaga, M. and Giaccia, A. J. (1999) 'Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development', *Teratology*. John Wiley & Sons, Ltd, 60(4), pp. 215–225. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(199910)60:4<215::AID-TERA6>3.0.CO;2-2.

Cuvier, C., Jang, A. and Hill, R. P. (1997) 'Exposure to hypoxia, glucose starvation and

acidosis: Effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion', *Clinical and Experimental Metastasis*, 15(1), pp. 19–25. doi: 10.1023/A:1018428105463.

Darekar, S. *et al.* (2012) 'Epstein-barr virus immortalization of human B-cells leads to stabilization of hypoxia-induced factor 1 alpha, congruent with the Warburg effect', *PLoS ONE*. Edited by S. W. Tsao. Public Library of Science, 7(7), p. e42072. doi: 10.1371/journal.pone.0042072.

Davis, D. A. *et al.* (2001) 'Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus', *Blood*, 97(10), pp. 3244–3250. doi: 10.1182/blood.V97.10.3244.

Demers, G. W., Halbert, C. L. and Galloway, D. A. (1994) 'Elevated Wild-Type p53 Protein Levels in Human Epithelial Cell Lines Immortalized by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Gene', *Virology*, pp. 169–174. doi: 10.1006/viro.1994.1019.

Desaintes, C. *et al.* (1997) 'Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis', *EMBO Journal*, 16(3), pp. 504–514. doi: 10.1093/emboj/16.3.504.

Deshmane, S. L. *et al.* (2009) 'Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1 α expression', *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pp. 11364–11373. doi: 10.1074/jbc.M809266200.

Doanes, A. M. *et al.* (1999) 'VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc., 255(2), pp. 545–548. doi: 10.1006/bbrc.1999.0227.

*Efeyan, A. and Serrano, M. (2007) 'p53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes', *Cell Cycle*, pp. 1006–1010. doi: 10.4161/cc.6.9.4211.

Eichten, A. *et al.* (2002) 'Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein', *Virology*, 295(1), pp. 74–85. doi: 10.1006/viro.2002.1375.

Fan, R. *et al.* (2016) 'Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells', *Tumor Biology*. Springer Netherlands, 37(4), pp. 4655–4663. doi: 10.1007/s13277-015-4221-5.

Filippi, S. *et al.* (2008) 'CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the

hypoxic response', *EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 27(19), pp. 2545–2556. doi: 10.1038/emboj.2008.180.

Forsythe, J. A. *et al.* (1996) 'Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 16(9), pp. 4604–4613. doi: 10.1128/mcb.16.9.4604.

*Frontini, M. and Proietti-De-Santis, L. (2009) 'Cockayne syndrome B protein (CSB): Linking p53, HIF-1 and p300 to robustness, lifespan, cancer and cell fate decisions', *Cell Cycle*, pp. 693–696. doi: 10.4161/cc.8.5.7754.

Gillison, M. L. (2000) 'Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers', *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), pp. 709–720. doi: 10.1093/jnci/92.9.709.

Gonzalez, S. L. *et al.* (2001) 'Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Is Important for Functional Inactivation and Is Separable from Proteasomal Degradation of E7 Downloaded from', *JOURNAL OF VIROLOGY*, 75(16), pp. 7583–7591. doi: 10.1128/JVI.75.16.7583-7591.2001.

Goodwin, E. C. *et al.* (2000) 'Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(20), pp. 10978–10983. doi: 10.1073/pnas.97.20.10978.

Graeber, T. G. *et al.* (1994) 'Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status.', *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), pp. 6264–6277. doi: 10.1128/mcb.14.9.6264.

Gu, Y. Z. *et al.* (1998) 'Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α ', *Gene Expression*. Cognizant Communication Corporation, 7(3), pp. 205–213.

Guo, Y. *et al.* (2014) 'Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1 α induced warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1 α interaction', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 15(5), pp. 7974–7986. doi: 10.3390/ijms15057974.

Gustafsson, M. V. *et al.* (2005) 'Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state', *Developmental Cell*. Cell Press, 9(5), pp. 617–628. doi:

10.1016/j.devcel.2005.09.010.

*Haedicke, J. and Iftner, T. (2013) ‘Human papillomaviruses and cancer’, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 108(3), pp. 397–402. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.004.

Hanns, E. *et al.* (2015) ‘Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature’, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 51(9), pp. 848–856. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.003.

Hartmann, A. *et al.* (1999) ‘Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma’, *Cancer Research*, 59(7), pp. 1578–1583.

Hasan, N. M. *et al.* (1998) ‘Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability’, *British Journal of Cancer*, 77(11), pp. 1799–1805. doi: 10.1038/bjc.1998.299.

*Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) ‘Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.

Höckel, M. *et al.* (1996) ‘Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix’, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 56(19), pp. 4509–4515. doi: 10.1056/NEJM199604183341606.

Hoff, C. M., Grau, C. and Overgaard, J. (2012) ‘Effect of smoking on oxygen delivery and outcome in patients treated with radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma - A prospective study’, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier, 103(1), pp. 38–44. doi: 10.1016/j.radonc.2012.01.011.

Hoffman, E. C. *et al.* (1991) ‘Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor’, *Science*, 252(5008), pp. 954–958. doi: 10.1126/science.1852076.

Hoppe-Seyler, K. *et al.* (2017) ‘Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(6), pp. E990–E998. doi: 10.1073/pnas.1615758114.

Hwang, I. I. L. *et al.* (2006) ‘Loss of VHL Confers Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-

Dependent Resistance to Vesicular Stomatitis Virus: Role of HIF in Antiviral Response', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 80(21), pp. 10712–10723. doi: 10.1128/jvi.01014-06.

Itoigawa, Y. *et al.* (2010) 'Hypoxia induces adipogenic differentiation of myoblastic cell lines', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 399(4), pp. 721–726. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.007.

Jaakkola, P. *et al.* (2001) 'Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5516), pp. 468–472. doi: 10.1126/science.1059796.

*Keith, B. and Simon, M. C. (2007) 'Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer', *Cell*. Cell Press, pp. 465–472. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.019.

Kieser, A. *et al.* (1994) 'Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression', *Oncogene*, 9(3), pp. 963–969.

Kim, C. Y. *et al.* (1997) 'Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions', *Cancer Research*, 57(19), pp. 4200–4204.

Kindt, N. *et al.* (2019) 'Involvement of HPV Infection in the Release of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Journal of Clinical Medicine*, 8(1), p. 75. doi: 10.3390/jcm8010075.

Kinoshita, M. *et al.* (2001) 'Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 91(3), pp. 322–326. doi: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-IJC1064>3.0.CO;2-P.

Knuth, J. *et al.* (2017) 'Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(52), pp. 89681–89691. doi: 10.18632/oncotarget.20813.

Koch, C. J., Kruuv, J. and Frey, H. E. (1973) 'The Effect of Hypoxia on the Generation Time of Mammalian Cells', *Radiation Research*. JSTOR, 53(1), p. 43. doi: 10.2307/3573446.

Koong, A. C., Chen, E. Y. and Giaccia, A. J. (1994) 'Hypoxia Causes the Activation of Nuclear Factor κ B through the Phosphorylation of I κ B α on Tyrosine Residues¹', *Cancer*

Research, 54(6), pp. 1425–1430.

Koshiji, M. *et al.* (2004) ‘HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc’, *EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(9), pp. 1949–1956. doi: 10.1038/sj.emboj.7600196.

Koumenis, C. *et al.* (2002) ‘Regulation of Protein Synthesis by Hypoxia via Activation of the Endoplasmic Reticulum Kinase PERK and Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α ’, *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 22(21), pp. 7405–7416. doi: 10.1128/mcb.22.21.7405-7416.2002.

Lai, D. *et al.* (2013) ‘Localization of HPV-18 E2 at Mitochondrial Membranes Induces ROS Release and Modulates Host Cell Metabolism’, *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0075625.

*Lee, S. J. *et al.* (2007) ‘Protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit is a hypoxia inducible gene: Its role in post-translational modification of p53 and MDM2’, *Cell Death and Differentiation*, 14(6), pp. 1106–1116. doi: 10.1038/sj.cdd.4402111.

Linge, A. *et al.* (2016) ‘HPV status, cancer stem cell marker expression, hypoxia gene signatures and tumour volume identify good prognosis subgroups in patients with HNSCC after primary radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation’, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 121(3), pp. 364–373. doi: 10.1016/j.radonc.2016.11.008.

Liu, F. *et al.* (2016) ‘ERK signaling pathway is involved in HPV-16 E6 but not E7 oncoprotein-induced HIF-1 α protein accumulation in NSCLC cells’, *Oncology Research*, 23(3), pp. 109–118. doi: 10.3727/096504015X14496932933610.

Löck, S. *et al.* (2017) ‘Residual tumour hypoxia in head-and-neck cancer patients undergoing primary radiochemotherapy, final results of a prospective trial on repeat FMISO-PET imaging’, *Radiotherapy and Oncology*. doi: 10.1016/j.radonc.2017.08.010.

López-Ocejo, O. *et al.* (2000) ‘Oncogenes and tumor angiogenesis: The HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner’, *Oncogene*, 19(40), pp. 4611–4620. doi: 10.1038/sj.onc.1203817.

Madan, E. *et al.* (2019) ‘HIF-transcribed p53 chaperones HIF-1 α ’, *Nucleic acids research*,

47(19), pp. 10212–10234. doi: 10.1093/nar/gkz766.

*De Martel, C. *et al.* (2012) ‘Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis’, *The Lancet Oncology*, 13(6), pp. 607–615. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.

*Martin, A. R. *et al.* (2017) ‘Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories’, *MedChemComm*. Royal Society of Chemistry, pp. 21–52. doi: 10.1039/c6md00432f.

Maxwell, P. H. *et al.* (1999) ‘The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis’, *Nature*. Nature Publishing Group, 399(6733), pp. 271–275. doi: 10.1038/20459.

McFarlane, S. *et al.* (2011) ‘Interaction of the human cytomegalovirus particle with the host cell induces hypoxia-inducible factor 1 alpha’, *Virology*. Academic Press, 414(1), pp. 83–90. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.005.

McNeill, L. A. *et al.* (2002) ‘Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the β -carbon of asparagine-803’, *Biochemical Journal*. Portland Press, 367(3), pp. 571–575. doi: 10.1042/BJ20021162.

Moin, S. M. *et al.* (2009) ‘The hepatitis E virus ORF3 protein stabilizes HIF-1 α and enhances HIF-1-mediated transcriptional activity through p300/CBP’, *Cellular Microbiology*, 11(9), pp. 1409–1421. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01340.x.

Moon, E. J. *et al.* (2004) ‘Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha.’, *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(2), pp. 382–384. doi: 10.1096/fj.03-0153fje.

*Moore, P. S. and Chang, Y. (2010) ‘Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology’, *Nature Reviews Cancer*, pp. 878–889. doi: 10.1038/nrc2961.

Münger, K. *et al.* (1989) ‘Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product.’, *The EMBO Journal*. Wiley, 8(13), pp. 4099–4105. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08594.x.

Nakamura, M. *et al.* (2009) ‘Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses’, *Virology*. Academic Press, 387(2), pp. 442–448. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.036.

*Nakazawa, M. S., Keith, B. and Simon, M. C. (2016) ‘Oxygen availability and metabolic adaptations’, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 663–673. doi: 10.1038/nrc.2016.84.

Nasimuzzaman, M. *et al.* (2007) ‘Hepatitis C Virus Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor 1 and Stimulates the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor’, *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 81(19), pp. 10249–10257. doi: 10.1128/jvi.00763-07.

*Nathan, A. T. and Singer, M. (1999) ‘The oxygen trail: Tissue oxygenation’, *British Medical Bulletin*, pp. 96–108. doi: 10.1258/0007142991902312.

Nordsmark, M. *et al.* (2005) ‘Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study’, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier, 77(1), pp. 18–24. doi: 10.1016/j.radonc.2005.06.038.

Palmer, L. A. *et al.* (1998) ‘Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1’, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(2 18-2). doi: 10.1152/ajplung.1998.274.2.1212.

Park, J. Y. *et al.* (2016) ‘Hypoxia leads to abnormal epidermal differentiation via HIF-independent pathways’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc., 469(2), pp. 251–256. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.111.

*Pastorekova, S. and Gillies, R. J. (2019) ‘The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond’, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer New York LLC, pp. 65–77. doi: 10.1007/s10555-019-09799-0.

Pinheiro, C. *et al.* (2014) ‘Lactate transporters and vascular factors in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix’, *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd., 14(1), p. 751. doi: 10.1186/1471-2407-14-751.

Pipiya, T. *et al.* (2005) ‘Hypoxia reduces adenoviral replication in cancer cells by downregulation of viral protein expression’, *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 12(11), pp. 911–917. doi: 10.1038/sj.gt.3302459.

Qiang, L. *et al.* (2012) 'HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway', *Cell Death and Differentiation*, 19(2), pp. 284–294. doi: 10.1038/cdd.2011.95.

*Qiu, B. and Simon, M. C. (2015) 'Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press, pp. 3–10. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.08.005.

Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O. (1992) 'Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein (Arnt) as a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor Author (s): Herminio Reyes , Suzanne Reisz-Porszasz and Oliver Hankinson Published by : American Association for the Advanc', *Science*, 256(5060), pp. 1193–1195. Available at: <http://science.sciencemag.org/>.

Richard, D. E. *et al.* (1999) 'p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia- reducible factor (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1', *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp. 32631–32637. doi: 10.1074/jbc.274.46.32631.

Rodolico, V. *et al.* (2011) 'Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein', *Infectious Agents and Cancer*. BioMed Central, 6(1), p. 18. doi: 10.1186/1750-9378-6-18.

Russo, C. A. *et al.* (1995) 'An Anoxia Inducible Endonuclease and Enhanced DNA Breakage as Contributors to Genomic Instability in Cancer', *Cancer Research*, 55(5), pp. 1122–1128.

Sadlecki, P. *et al.* (2014) 'The role of hypoxia-inducible factor-1 α , glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/616850.

Salceda, S. and Caro, J. (1997) 'Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes', *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), pp. 22642–22647. doi: 10.1074/jbc.272.36.22642.

Samanta, D. *et al.* (2014) 'Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(50), pp. E5429–E5438. doi:

10.1073/pnas.1421438111.

Sang, N. *et al.* (2003) 'MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300', *Journal of Biological Chemistry*. NIH Public Access, 278(16), pp. 14013–14019. doi: 10.1074/jbc.M209702200.

Sartori-Cintra, A. R. *et al.* (2012) 'Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes', *Clinics*, 67(1), pp. 35–40. doi: 10.6061/clinics/2012(01)06.

Scheffner, M. *et al.* (1990) 'The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53', *Cell*, 63(6), pp. 1129–1136. doi: 10.1016/0092-8674(90)90409-8.

Semenza, G. L. *et al.* (1996) 'Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 271(51), pp. 32529–32537. doi: 10.1074/jbc.271.51.32529.

*Semenza, G. L. (1998) 'Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis', *Current Opinion in Genetics and Development*. Current Biology Ltd, 8(5), pp. 588–594. doi: 10.1016/S0959-437X(98)80016-6.

*Semenza, G. L. (2000) 'HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia', *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society Bethesda, MD, pp. 1474–1480. doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.

*Semenza, G. L. (2007) 'Life with oxygen', *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 62–64. doi: 10.1126/science.1147949.

Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992) 'A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 12(12), pp. 5447–5454. doi: 10.1128/mcb.12.12.5447.

*Shannon-Lowe, C. and Rickinson, A. (2019) 'The Global Landscape of EBV-Associated Tumors', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 713. doi: 10.3389/fonc.2019.00713.

Sinha, S. *et al.* (2011) 'IGF-1 induced HIF-1 α -TLR9 cross talk regulates inflammatory responses in glioma', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., 23(11), pp. 1869–1875. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.024.

Slebos, R. J. C. *et al.* (1994) 'p53-Dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), pp. 5320–5324. doi: 10.1073/pnas.91.12.5320.

Srikanth, L. *et al.* (2016) 'Anaerobic glycolysis and HIF1 α expression in haematopoietic stem cells explains its quiescence nature', *Stem Cells: Mediated Regeneration*, 10(2), pp. 87–98.

Stadler, P. *et al.* (1999) 'Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Elsevier, 44(4), pp. 749–754. doi: 10.1016/S0360-3016(99)00115-7.

Sutton, K. M. *et al.* (2007) 'Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1', *Oncogene*, 26(27), pp. 3920–3929. doi: 10.1038/sj.onc.1210168.

Tacchini, L. *et al.* (1999) 'Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation', *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), pp. 24142–24146. doi: 10.1074/jbc.274.34.24142.

*Al Tameemi, W. *et al.* (2019) 'Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media SA, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00004.

Tang, X. *et al.* (2007) 'Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 α protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 13(9), pp. 2568–2576. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2704.

Thai, M. *et al.* (2014) 'Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication', *Cell Metabolism*. Cell Press, 19(4), pp. 694–701. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.009.

Tian, H., McKnight, S. L. and Russell, D. W. (1997) 'Endothelial PAS domain protein 1

(EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells', *Genes and Development*, 11(1), pp. 72–82. doi: 10.1101/gad.11.1.72.

Tomaskova, J. *et al.* (2011) 'Hypoxia Induces the Gene Expression and Extracellular Transmission of Persistent Lymphocytic Choriomeningitis Virus', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 85(24), pp. 13069–13076. doi: 10.1128/jvi.00829-11.

*Torre, C., Perret, C. and Colnot, S. (2010) 'Molecular determinants of liver zonation', in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., pp. 127–150. doi: 10.1016/B978-0-12-385233-5.00005-2.

Treins, C. *et al.* (2006) 'AMPK activation inhibits the expression of HIF-1 α induced by insulin and IGF-1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(4), pp. 1197–1202. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.088.

Ullah, M. S., Davies, A. J. and Halestrap, A. P. (2006) 'The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism', *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), pp. 9030–9037. doi: 10.1074/jbc.M511397200.

*Vaupel, P. *et al.* (1991) 'Oxygenation Of Human Tumors: Evaluation Of Tissue Oxygen Distribution In Breast Cancers By Computerized O₂ Tension Measurements'', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 51(12), pp. 3316–3322.

Wakisaka, N. *et al.* (2004) 'Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Synthesis of Hypoxia-Inducible Factor 1', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 24(12), pp. 5223–5234. doi: 10.1128/mcb.24.12.5223-5234.2004.

Wang, G. L. *et al.* (1995) 'Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), pp. 5510–5514. doi: 10.1073/pnas.92.12.5510.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995) 'Purification and characterization of hypoxia-inducible factor', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 270(3), pp. 1230–1237. doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.

Wang, P. *et al.* (2019) 'Modeling the regulation of p53 activation by HIF-1 upon hypoxia',

FEBS Letters, 593(18), pp. 2596–2611. doi: 10.1002/1873-3468.13525.

Wilson, M. C. *et al.* (2005) ‘Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: The ancillary protein for the insensitive MCT2 is embigin (gp70)’, *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*, 280(29), pp. 27213–27221. doi: 10.1074/jbc.M411950200.

Xia, O. *et al.* (2009) ‘Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(11), pp. 4260–4265. doi: 10.1073/pnas.0810067106.

Yogev, O. *et al.* (2014) ‘Kaposi’s Sarcoma Herpesvirus MicroRNAs Induce Metabolic Transformation of Infected Cells’, *PLoS Pathogens*, 10(9). doi: 10.1371/journal.ppat.1004400.

Yoo, Y. G. *et al.* (2003) ‘Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 α through activation of mitogen-activated protein kinase pathway’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp. 39076–39084. doi: 10.1074/jbc.M305101200.

Young, S. D., Marshall, R. S. and Hill, R. P. (1988) *Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells (experimental metastatic efficiency/gene amplification)*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Yu, Y., Maguire, T. G. and Alwine, J. C. (2014) ‘ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, enhances glucose metabolism to support biosynthesis in human cytomegalovirus-infected cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(5), pp. 1951–1956. doi: 10.1073/pnas.1310779111.

Zelzer, E. *et al.* (1998) ‘Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT’, *EMBO Journal*, 17(17), pp. 5085–5094. doi: 10.1093/emboj/17.17.5085.

Zhang, B., Chen, W. and Roman, A. (2006) ‘The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), pp. 437–442. doi: 10.1073/pnas.0510012103.

Zheng, Xiaofeng *et al.* (2008) 'Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), pp. 3368–3373. doi: 10.1073/pnas.0711591105.

Zimmermann, H. *et al.* (1999) 'The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP/p300', *Journal of Virology*, 73(8), pp. 6209–6219. doi: 10.1128/jvi.73.8.6209-6219.1999.