

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: B-BI



Eliška Shejbalová

Varianty HPV a jejich vztah k onemocněním
HPV variants and their association with diseases

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Jana Šmahelová

Praha, 2024

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, 08.08.2024

Eliška Shejbalová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Šmahelové za cenné rady a odborné vedení, které mi pomohly při tvorbě mé závěrečné práce.

Práce byla podpořena z Projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Lidské papilomaviry (HPV) jsou malé neobalené DNA viry, které infikují kožní a slizniční vrstevnatý epitel. Vysoko-rizikové typy HPV (HR-HPV) dokáží díky svým onkoproteinům E6 a E7 vyvolat nádorové bujení. Perzistentní infekce HR-HPV je zodpovědná za téměř 100 % případů karcinomu děložního hrdla u žen, a také za velkou část dalších nádorů v anogenitální oblasti a oblasti hlavy a krku u žen i mužů. Typ HPV16 je nejčastěji detekovaným typem u všech HPV-pozitivních nádorů. V rámci typů HPV jsou rozlišovány intratypické varianty – linie a sub-linie. Typ HPV16 je rozdělen na čtyři fylogenetické linie (A, B, C, D) a šestnáct sub-linií (A1–4, B1–4, C1–4, D1–4). Fylogenetické varianty HPV16 se liší geografickou distribucí a rizikem vzniku prekancerózních stádií děložního hrdla a invazivního karcinomu. Také jednotlivé jednonukleotidové polymorfismy v genomu HPV16 mohou ovlivnit rozvoj a průběh onemocnění.

Klíčová slova: papilomavirus, genom, varianty, nádor

Abstrakt

Human papillomaviruses (HPV) are small non-enveloped DNA viruses that infect cutaneous and mucosal stratified epithelia. High-risk HPV types (HR-HPV) encode oncoproteins, E6 and E7, that can induce carcinogenesis. Persistent infections with HR-HPV types are responsible for nearly 100 % cases of cervical carcinoma in women and also for significant portion of other anogenital and head and neck cancers in men and women. HPV16 is the most frequently detected type in all HPV-positive tumors. HPV types are classified into intratype variants – lineages and sub-lineages. HPV16 is separated into four phylogenetic lineages (A, B, C, D) and sixteen sub-lineages (A1–4, B1–4, C1–4, D1–4). HPV16 phylogenetic variants differ in geographical distribution and risk of developing cervical precancerous lesion and invasive carcinoma. In addition, individual single nucleotide polymorphisms in HPV16 genome can impact disease development and progression.

Key words: papillomavirus, genome, variants, cancer

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Genom HPV a struktura virionů	1
2.1	Regulační oblast	2
2.2	Časné geny HPV	3
2.3	Pozdní geny a struktura kapsidy.....	3
3	Taxonomie.....	4
4	Životní cyklus a mechanismus karcinogeneze.....	5
4.1	Karcinogeneze a virové onkoproteiny.....	5
4.1.1	Onkoprotein E5	6
4.1.2	Onkoprotein E6	6
4.1.3	Onkoprotein E7	7
5	HPV a onemocnění	8
5.1	Cervikální intraepiteliální neoplázie a rakovina děložního čípku.....	8
5.2	Nádory hlavy a krku	9
5.3	Ostatní anogenitální nádory asociované s HPV	10
6	Varianty HPV16.....	10
6.1	Linie a sub-linie HPV16 a jejich identifikace	11
6.2	Linie a sub-linie u karcinomu děložního hrdla.....	12
6.3	Variabilita genomu HPV16.....	14
6.3.1	Konzervovaná sekvence genu <i>E7</i>	15
6.3.2	Mutace v genomu HPV16 způsobené enzymem APOBEC3.....	16
6.4	Varianty genu <i>E6</i>	18
6.5	Varianty HPV16 u ostatních anogenitálních nádorů.....	20
6.6	Varianty HPV16 u oropharyngeálního karcinomu.....	21
7	Závěr	21
8	Zdroje.....	23

Zkratky

zkratka	anglický název	český název
AA	Asian-American	asijsko-americká
ADC	adenokarcinom	karcinom žláзовého epitelu
AFR	African	afriká
AS	Asian	asijská
ASCUS	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance	lehce atypické dlaždicové buňky
bp	base pair	pár bází
CC	cervical cancer	rakovina děložního čípku
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	cervikální intraepiteliální neoplázie
CSCC	cervical squamous-cell carcinoma	cervikální karcinom dlaždicových buněk
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	double-stranded DNA	dvouřetězcová DNA
EUR	European	evropská
HPV	human papillomaviruses	lidské papilomaviry
HR-HPV	high risk human papillomaviruses	vysoko-rizikové lidské papilomaviry
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
IFN- κ	interferon kappa	interferon kappa
LCR	long control region	regulační oblast
LR-HPV	low risk human papillomaviruses	nízko-rizikové lidské papilomaviry
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NA	North-American	severo-americká
NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma	orofaryngeální karcinom
ORF/s	open reading frame/s	otevřený/é čtecí rámec/rámce
ori	origin of replication	replikační počátek
PBM	PDZ-binding motif	PDZ-vazebný motiv
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
PV	papillomaviruses	papilomaviry
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
SCC	squamous cell carcinoma	karcinom dlaždicových buněk
SNPs	single nucleotide polymorphisms	jednonukleotidové polymorfismy
URR	upstream regulatory region	regulační oblast

1 Úvod

Papilomaviry jsou malé neobalené DNA viry infikující epitelu vyšších obratlovců. Lidské papilomaviry (HPV, human papillomaviruses) jsou příčinou mnoha benigních i maligních onemocnění u člověka (McBride, 2022). HPV jsou celosvětově zodpovědné za 4,5 % všech nádorových onemocnění a uvádí se, že jsou příčinou téměř 100 % karcinomů děložního hrdla (Walboomers *et al.*, 1999; de Martel *et al.*, 2017). HPV také způsobují další nádory v anogenitální oblasti a některé nádory hlavy a krku u žen i mužů (de Martel *et al.*, 2017). Všechna nádorová onemocnění spojená s infekcí HPV jsou způsobena typy lidských papilomavirů řadících se do rodu *Alphapapillomavirus*. Typy alfa-papilomavirů lze rozdělit podle onkogenního potenciálu na typy vysoko-rizikové (HR, high risk) a nízko-rizikové (LR, low risk). Do HR-HPV patří HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82. LR-HPV jsou na rozdíl od onkogenních HR-HPV asociovány především s benigními lézemi a patří sem například HPV6 a HPV11 (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004). HR-HPV jsou schopné pomocí svých onkoproteinů *E6* a *E7* imortalizovat buňky a v některých případech způsobit i jejich transformaci (Tomaic, 2016).

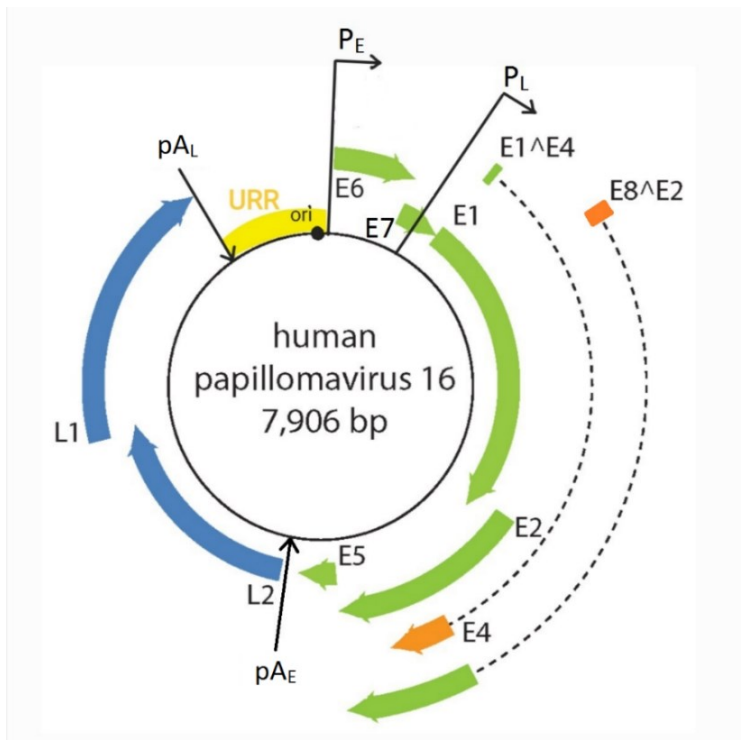
Tato práce se bude zabývat výhradně typem HPV16, který je nejčastěji detekovaným typem u všech HPV-pozitivních karcinomů jak v anogenitální oblasti, tak u nádorů hlavy a krku (De Vuyst *et al.*, 2009; Castellsagué *et al.*, 2016; Olesen *et al.*, 2019). V rámci jednotlivých typů HPV jsou rozlišovány varianty, tedy linie a sub-linie (<https://pave.niaid.nih.gov/>). HPV16 je rozdělen na čtyři linie (A-D) a šestnáct sub-linií (A1-4, B1-4, C1-4, D1-4) (Mirabello *et al.*, 2018).

Cílem této bakalářské práce je popsat genetické varianty HPV16 a jejich vztah k onemocněním. Práce se zabývá rizikem vzniku rakoviny při infekci jednotlivými liniemi a sub-liniemi HPV16 a celkovou genetickou variabilitou genomů HPV16 se zaměřením na onkogeny *E6* a *E7*. Práce je zaměřená hlavně na karcinom děložního hrdla.

2 Genom HPV a struktura virionů

Papilomaviry (PV) patří mezi neobalené viry s ikosahedrální kapsidou o velikosti ~ 60 nm, uvnitř které se nachází virová DNA asociovaná s buněčnými histony, tzv. nukleocore (Baker *et al.*, 1991). Genom lidských papilomavirů tvoří cirkulární dvouřetězcová DNA, jejíž

velikost se pohybuje okolo 8000 bp (pár bází, base pair). Všechny otevřené čtecí rámce (ORF/s, open reading frame/s) se nacházejí na jednom vlákně, jsou orientované jedním směrem, a některé se překrývají. PV si nekódují vlastní DNA ani RNA polymerázu, jsou tudíž závislé na replikačním a transkripčním aparátu hostitelské buňky. Papilomaviry infikují epitelu a exprese jejich genů je silně závislá na stádiu diferenciaci keratinocytů. Pro expresi svých genů hojně využívají alternativní sestřih mRNA, která bývá bicistronní nebo polycistronní (Yu *et al.*, 2022). Genom lze rozdělit na tři části – oblast časných (E, early), pozdních genů (L, late) a regulační oblast [obrázek 1].



Obrázek 1: Schéma organizace genomu HPV16. Oblast časných genů je znázorněna zeleně a oranžově, pozdní geny modře a regulační oblast (URR) žlutě. Promotory pro časné a pozdní geny jsou znázorněny zahnutými šipkami a označeny zkratkami P_E (early promotor) a P_L (late promotor). Černé šipky označené pA_E (early polyadenylation) a pA_L (late polyadenylation) ukazují polyadenylační signály pro časné a pozdní geny. Tečka v regulační oblasti je místo počátku replikace virového genomu (ori, origin of replication). Převzato z (Van Doorslaer *et al.*, 2018) a upraveno podle (Yu *et al.*, 2022).

2.1 Regulační oblast

Pro regulační oblast se používá zkratka URR (upstream regulatory region) nebo LCR (long control region). Tato část genomu nekóduje žádné proteiny, nachází se zde replikační počátek (ori, origin of replication), časný promotor (P_E , early promotor) a vazebná místa pro buněčné i virové transkripční faktory (Van Doorslaer *et al.*, 2018) [obrázek 1].

2.2 Časné geny HPV

Časné geny, značené písmenem E (early), kódují nestrukturní proteiny. Papilomaviry jsou závislé na replikačním aparátu hostitelské buňky, kódují si však dva proteiny, E1 a E2, které jsou pro jejich replikaci nezbytné (Ustav and Stenlund, 1991). E1 i E2 mají své vazebné místo v ori, kde spolu interagují a vytvářejí replikační iniciační komplex (Berg and Stenlund, 1997; Sedman et al., 1997). Protein E1 je DNA helikáza (Hughes and Romanos, 1993), která kromě rozplétání dvoušroubovice DNA rekrutuje hostitelskou DNA polymerázu alfa-primázu na replikační počátek (Bergvall *et al.*, 2013).

Protein E2 je virový regulátor transkripce, který funguje jako aktivátor nebo represor časného promotoru u HPV (Phelps and Howley, 1987; Romanczuk, Thierry and Howley, 1990), účastní se regulace exprese virových onkoproteinů E6 a E7 (Nishimura *et al.*, 2000). Dále hraje významnou roli při udržování perzistentní infekce v nediferencovaných buňkách epitelu. Zprostředkovává totiž vazbu mezi virovým genomem a chromozomem hostitelské buňky, a tím zajišťuje segregaci virové DNA do dceřiných buněk (Ilves, Kivi and Ustav, 1999).

Protein E1^{E4} je translatován ze sestřižené mRNA sestávající se z části ORF E1 a ORF E4 (Van Doorslaer *et al.*, 2018) [obrázek 1]. Tento protein je syntetizován až v diferencujících buňkách (Doorbar *et al.*, 1997) a jeho transkripce je zahájena z pozdního promotoru (Chow *et al.*, 1987). Protein E1^{E4} váže keratinová intermediální filamenta, způsobuje jejich přeskládání nebo dokonce degradaci, čímž napomáhá k disrupci keratinocytů a uvolňování virionů ve vrchních epiteliálních vrstvách (Wang *et al.*, 2004; McIntosh *et al.*, 2010).

Protein E8^{E2} je translatován podle sestřižené mRNA a funguje jako represor virové transkripce a replikace (Van Doorslaer *et al.*, 2018). Protein E8^{E2} se sestává z E8 domény, která zajišťuje inhibiční funkci, a z C-konce proteinu E2, který obsahuje DNA-vazebnou doménu (Stubenrauch *et al.*, 2000, 2007).

Proteiny E5, E6 a E7 budou popsány v kapitole: 4.1 Karcinogeneze a virové onkoproteiny.

2.3 Pozdní geny a struktura kapsidy

Pozdní geny kódují strukturní, kapsidové proteiny L1 a L2 (Doorbar and Gallimore, 1987), jejichž exprese je zahájena až ve vrchních epiteliálních vrstvách (Doorbar *et al.*, 1997). Povrch ikosahedrální kapsidy papilomavirů se skládá ze 72 kapsomer, tj. 72 pentamerů

majoritního kapsidového proteinu L1 (Baker *et al.*, 1991), který má schopnost se samostatně uspořádat a vytvářet tzv. VLPs (virus-like particles) (Hagensee, Yaegashi and Galloway, 1993). Minoritní kapsidový protein L2 je lokalizovaný na vnitřní straně kapsidy a jeho množství se pohybuje v rozmezí 12-72 molekul L2 na jednu virovou částici (Buck *et al.*, 2008). Oba kapsidové proteiny jsou důležité pro vstup viru do buňky (Kines *et al.*, 2009). Protein L2 dále zajišťuje transport virové DNA do jádra (Day *et al.*, 2004) a v pozdních fázích infekce napomáhá její enkapsidaci (Holmgren *et al.*, 2005).

3 Taxonomie

Taxonomicky jsou zástupci papilomavirů (PV) řazeni do čeledi *Papillomaviridae*, která má dvě podčeledi – *Firstpapillomavirinae* a *Secondpapillomavirinae*. (Van Doorslaer *et al.*, 2018). Do dnešního dne bylo identifikováno více než 200 typů lidských papilomavirů (HPV), které jsou řazeny do pěti rodů – *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* a *Nupapillomavirus* (<https://www.hpvcenter.se/>; Van Doorslaer *et al.*, 2018). Lidské papilomaviry jsou podle tkáňového tropismu děleny na kožní a slizniční. Rody beta, gama, mí a ný infikují kůži a rod alfa zahrnuje typy slizniční a několik kožních (de Villiers *et al.*, 2004). Taxonomie čeledi *Papillomaviridae* je až po typu založena na nukleotidové sekvenci otevřeného čtecího rámce genu L1, který kóduje majoritní kapsidový protein. Jednotlivé rody papilomavirů sdílejí méně než 60 % a druhy 60-70 % nukleotidové sekvence ORF L1. V rámci druhů se pak rozlišují typy papilomavirů, které se mezi sebou liší více než 10% v nukleotidové sekvenci ORF L1, tj. sdílejí 71-89 % (de Villiers *et al.*, 2004).

Varianty jednotlivých typů papilomavirů se dají charakterizovat dvěma způsoby, podle nukleotidové sekvence L1 ORF nebo podle celého genomu. Podle ORF L1 se subtypy liší 2-10 % a varianty méně než 2 % nukleotidové sekvence ORF L1 (de Villiers *et al.*, 2004). V současné době se také používá charakteristika podle celého genomu, kdy rozdíl v nukleotidové sekvenci méně než 10 % definuje linie (1-10 %) a sublinie (0,5-1 %) (Chen *et al.*, 2011; <https://pave.niaid.nih.gov/>).

4 Životní cyklus a mechanismus karcinogeneze

Papilomaviry jsou tkáňově a druhově specifické patogeny, které napadají vyšší obratlovce. Nejdříve infikují kmenové epiteliální buňky stratifikovaného epitelu, které leží na bazální membráně pod vrstvami keratinocytů. Přístup k bazálním buňkám je zajištěn drobným poraněním kůže nebo sliznice. Kmenové buňky jsou rezervoárem perzistentní infekce a je v nich udržován nízký počet kopií virové DNA. Tento počet je ustanoven po primární replikaci virového genomu, protože poté je virová DNA replikována pouze současně s replikací genomu bazální buňky (Pešut *et al.*, 2021). Další fáze životního cyklu PV jsou závislé na diferenciaci keratinocytů. Při dělení kmenových buněk se virový genom dostává do buněk dceřiných, které postupně diferencují směrem k povrchu, a ve kterých životní cyklus viru pokračuje až k sestavení kompletního virionu. K uvolňování virionů do okolí dochází až z mrtvých keratinocytů na povrchu epitelu (McBride, 2022).

Po navázání na receptor na bazálních buňkách dochází k endocytóze virionu do buňky (Kines *et al.*, 2009) a jeho transportu do jádra (Day *et al.*, 2004). V bazálních buňkách dochází k expresi časných genů, prvotní replikaci virového genomu a ustanovení stabilní infekce s nízkým počtem kopií virové DNA (Moody, 2017).

K produktivní fázi virového životního cyklu dochází v diferencujících keratinocytech. Virové proteiny E5, E6 a E7 vytvářejí v buňkách prostředí vhodné pro replikaci virového genomu, dokáží modulovat buněčný cyklus, diferenciaci a přežívání buňky. Diferencující buňky jsou těmito proteiny manipulovány, znovu vstupují do buněčného cyklu a poskytují tak viru replikační proteiny (Moody, 2017). Pro replikaci viru jsou nezbytné enzymy, které se podílí na opravách DNA, virus proto spouští signalizační dráhu, která vede k buněčné odpovědi na poškození DNA (Moody and Laimins, 2009).

Ve vrchních vrstvách epitelu jsou exprimovány pozdní geny a jsou zde sestavovány a uvolňovány viriony (Doorbar *et al.*, 1997; Moody, 2017).

4.1 Karcinogeneze a virové onkoproteiny

U HR-HPV typů hrají proteiny E5, E6 a E7 roli při transformaci buněk, jsou tudíž označovány jako onkoproteiny. HR-HPV E6 a E7 jsou nezbytné pro imortalizaci a transformaci keratinocytů a udržení jejich transformovaného stavu (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Jonson *et al.*, 2008). Onkoprotein E5 k buněčné transformaci přispívá, není však nezbytný.

Během HPV infekce často dochází k integraci virového genomu do hostitelské DNA. Tato událost často vede ke ztrátě některých virových genů, nejčastěji genu *E2*. Onkogeny *E6* a *E7* však většinou zůstávají neporušené a dochází k jejich zvýšené expresi (Tomaic, 2016).

4.1.1 Onkoprotein E5

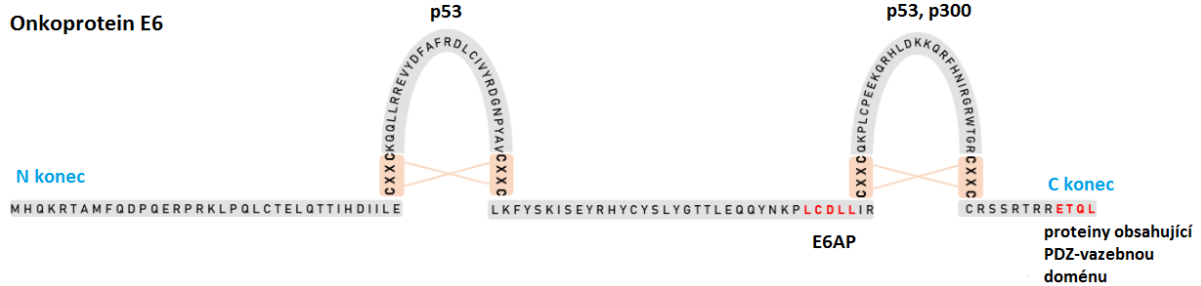
Onkoprotein E5 je hydrofobní transmembránový protein, který je kódován pouze alfapapilomaviry. Aktivací receptoru pro epidermální růstový faktor stimuluje buňky k proliferaci, dále pak napomáhá úniku viru před imunitním systémem (McBride, 2022).

4.1.2 Onkoprotein E6

Onkoprotein E6 obsahuje okolo 150 aminokyselin a interaguje s mnoha buněčnými proteiny, jako jsou p53, E6AP, proteiny s PDZ-vazebnou doménou, histonové acetyltransferázy a další (White *et al.*, 2012). Protein E6 inhibuje funkci proteinu p53. Protein p53 reaguje na poškození DNA a jeho aktivita vede k zastavení buněčného cyklu nebo až k apoptóze. Protein E6 způsobuje ubiquitin-dependentní degradaci proteinu p53 (Scheffner *et al.*, 1990), interaguje totiž s buněčnou ubiquitin ligázou E6AP (E6-associated protein, E6-asociovaný protein), která protein p53 v komplexu s proteinem E6 ubiquitínuje, což následně vede k jeho degradaci v proteasomu (Scheffner *et al.*, 1993). Onkoprotein E6 také inhibuje aktivitu p53, tím že váže jeho transkripční koaktivátor (histon acetyltransferázu) CBP/p300 (Zimmermann *et al.*, 1999). Protein E6 také dokáže přímou interakcí s p53 zabránit jeho vazbě na DNA, a tím inhibovat jeho transkripční aktivitu. (Lechner and Laimins, 1994).

Další funkcí onkoproteinu E6 je aktivace buněčné telomerázy, toho dosahuje aktivací promotoru genu pro katalytickou podjednotku telomerázy, a tím zvyšuje její expresi (Oh, Kyo and Laimins, 2001; Veldman *et al.*, 2003).

Onkoproteiny E6 obsahují PDZ-vazebný motiv (PBM), to jim umožňuje vázat některé buněčné proteiny, které PBM také obsahují, s tím, že interakce těchto proteinů s proteinem E6 vede k jejich degradaci nebo změně lokalizace v buňce. Mezi funkce cílových proteinů patří udržování buněčné polaridy, regulace buněčného růstu a dalších dějů v buňce (Pešut *et al.*, 2021). Důležitým strukturním motivem proteinu E6 je CXXC motiv, který se v aminokyselinové sekvenci nachází čtyřikrát a vytváří dva motivy zinkového prstu [obrázek 2]. Motiv CXXC významně ovlivňuje stabilitu a transformační kapacitu proteinu (Cole and Danos, 1987; Kanda *et al.*, 1991).



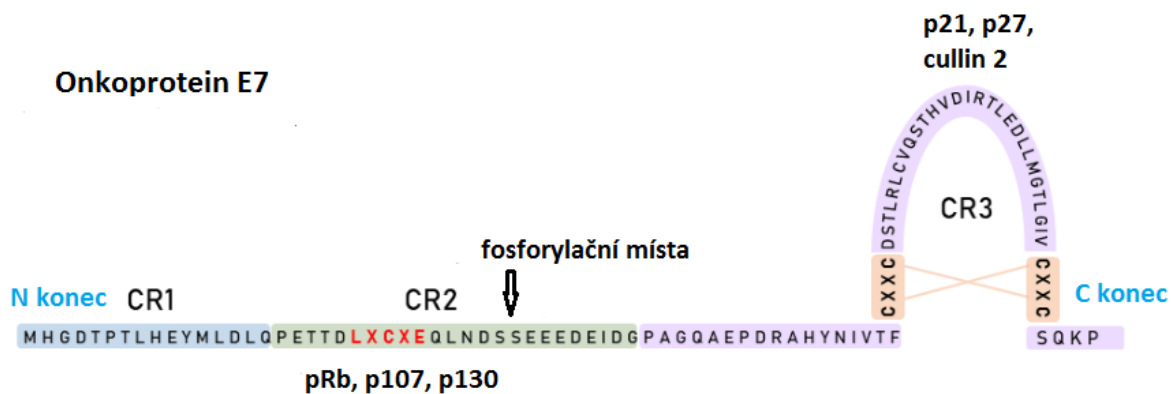
Obrázek 2: Schématické znázornění struktury onkoproteinu E6 u HPV16. Obrázek ukazuje aminokyselinovou sekvenci a důležité motivy proteinu E6 a některé proteiny, které s ním interagují. Žlutě jsou zvýrazněny čtyři CXXC sekvence vytvářející strukturní motivy zinkového prstu. Červeně je znázorněna LXXLL sekvence, na kterou se váže E6AP, červenou barvu má také PDZ-vazebný motiv na C-konci proteinu. Převzato a upraveno z (Pešut *et al.*, 2021).

4.1.3 Onkoprotein E7

Protein E7 má ~ 100 aminokyselin a obsahuje tři konzervované regiony – CR1, CR2 a CR3 [obrázek 3]. Součástí domény CR2 je LXCXE vazebný motiv nezbytný pro interakci s proteinem pRb, který je důležitým regulátorem buněčného cyklu a řadí se mezi tumor supresory. Protein pRb váže transkripční faktor E2F, a tím ho inhibuje. Vazba E7 na pRb způsobuje uvolnění E2F, který tak může stimulovat expresi genů, které jsou důležité pro progres buněčným cyklem, konkrétně pro přechod z G1 do S fáze (Tomaic, 2016; Pešut *et al.*, 2021). Protein E7 způsobuje ubiquitin-dependentní degradaci pRb v proteazomu, a to díky interakci s cullin 2 ubiquitin ligázou (Boyer *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 2007). Protein E7 dále interaguje a destabilizuje proteiny p107 a p130, které patří do pRb rodiny a také regulují buněčný cyklus (Gonzalez *et al.*, 2001). Dalšími regulátory buněčného cyklu, jejichž aktivitu protein E7 inhibuje, jsou p21 a 27. Tyto proteiny zajišťují zastavení buněčného cyklu při poškození DNA tím, že inhibují cyklin-dependentní kinázy (Tomaic, 2016).

Protein E7 také dokáže díky interakci s histonovými acetyltransferázami a histonovými deacetylázami ovlivňovat strukturu chromatinu, a tím regulovat transkripci. A kromě buněčného cyklu moduluje protein E7 i signální dráhy imunitní odpovědi na virovou infekci (Pešut *et al.*, 2021).

Aktivita proteinu E7 je v průběhu buněčného cyklu regulována fosforylací kasein kinázou II, která fosforyluje seriny na pozici 31 a 32, které se nachází v blízkosti LXCXE motivu (Massimi and Banks, 2000) [obrázek 3].



Obrázek 3: Schématické znázornění struktury proteinu E7 u HPV16. Jsou zde vidět tři konzervované domény CR1-3, aminokyselinová sekvence a interakční partneři proteinu E7. Červeně je znázorněna sekvence LXCXE důležitá pro vazbu proteinů z rodiny pRb a žlutě jsou znázorněny dvě sekvence CXXC tvořící strukturální motiv zinkového prstu. Šipka ukazuje na fosforylační místa pro CKII (kasein kináza II). Převzato a upraveno z (Pešut *et al.*, 2021).

5 HPV a onemocnění

Lidské papilomaviry infikují kožní a slizniční epitel. Většina papilomavirových infekcí má asymptomatický průběh. Některé typy však mohou způsobit benigní produktivní léze, jako jsou bradavice na kůži a papilomy na sliznicích, a některé typy mohou způsobit až nádorovou transformaci buněk. Mezi malignity spojené s infekcí HPV patří nádory anogenitálního traktu (rakovina děložního čípku, vulvy, pochvy, anu, penisu) a některé nádory hlavy a krku. Onkogenní typy HPV patří do rodu *Alphapapillomavirus*, konkrétně do druhů alfa-5, alfa-6, alfa-7, alfa-9 a alfa-11, většina alfa-papilomavirů infikuje sliznice a přenášejí se především sexuálním kontaktem (McBride, 2022).

Ačkoliv typy HPV z rodu *Betapapillomavirus* způsobují většinou asymptomatické infekce a tvoří běžnou součást mikrobiomu, mohou s UV zářením jako kofaktorem vyvolat vznik dlaždicobuněčného karcinomu kůže u jedinců s imunodeficiencí. (McBride, 2022).

Další kapitoly se zabývají nádory, které způsobují HPV z rodu alfa.

5.1 Cervikální intraepiteliální neoplázie a rakovina děložního čípku

Lidské papilomaviry jsou hlavní příčinou rakoviny děložního čípku (CC, cervical cancer), kde je prevalence HPV téměř 100 % (Walboomers *et al.*, 1999; de Martel *et al.*, 2017). CC je dnes čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. Celosvětově za rok 2020 na CC zemřelo skoro 350 000 žen a přibýlo přes 600 000 nových případů (Sung *et al.*, 2021).

Pozorované změny na sliznicích po infekci HPV se nazývají cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN, cervical intraepithelial neoplasia). CIN jsou léze tvořené atypickými buňkami a podle závažnosti se dělí na CIN1, CIN2 a CIN3, kdy CIN2 a CIN3 se řadí mezi intraepiteliální neoplázie vyšší třídy a jsou považovány za prekancerózní stádia CC. Cytologický nález, který je méně závažný než CIN1 se nazývá ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance). Většina papilomavirových infekcí (~ 90 %) u žen s cytologickými nálezy ≤ CIN1 je potlačena imunitním systémem do dvou let (Schiffman *et al.*, 2007). Větší riziko vzniku a progresu prekancerózních stádií směrem k CC je spojeno s perzistentní infekcí HR-HPV (Wheeler *et al.*, 2006). Nejvíce perzistentním typem je HPV16, který je více než dvakrát častější u CC než u neoplázií nižší třídy (CIN1) (Clifford *et al.*, 2005). U perzistentních infekcí způsobených HPV16 je vyšší riziko vzniku CIN2/3 a CC v porovnání s perzistentními infekcemi jiných HR-HPV (Wheeler *et al.*, 2006).

HPV způsobují dva histologicky odlišné typy karcinomů: karcinom dlaždicových buněk (SCC, squamous cell carcinoma) a adenokarcinom (ADC), což je karcinom žláзовého epitelu. Nejčastěji detekovanými typy u CC jsou HPV16 a HPV18, které jsou dohromady zodpovědné za více než 70 % případů. I když se distribuce jednotlivých typů HPV v různých geografických regionech liší, je HPV16 nejčastějším (57 %) a HPV18 druhým nejčastějším (16 %) typem u CC po celém světě (Li *et al.*, 2011).

5.2 Nádory hlavy a krku

Mezi rizikové faktory, které mohou přispívat ke vzniku karcinomů hlavy a krku, patří kromě kouření a konzumace alkoholu také infekce HPV. S HPV je asociovaný zejména orofaryngeální karcinom (OPSCC, oropharyngeal squamous cell carcinoma) a dále také karcinom hrtanu a ústní dutiny. Prevalence HPV u OPSCC se však výrazně liší v různých částech světa a také v závislosti na stáří studie, v posledních dekádách byl totiž zaznamenán velký nárůst HPV-pozitivních OPSCC, a to hlavně v Severní Americe a Evropě (Mehanna *et al.*, 2013; Stein *et al.*, 2015). Podle výsledků z meta-analýzy stoupla prevalence HPV v Evropě z 35 % před rokem 2000 na 73 % po roce 2005 a v Severní Americe stoupla z 51 % na 70 % (Mehanna *et al.*, 2013). Nejčastěji detekovaným typem u OPSCC je HPV16, který je zodpovědný za více než 80 % HPV-pozitivních OPSCC (Mehanna *et al.*, 2013), někdy je dokonce uváděno více než 90 % (Stein *et al.*, 2015; LeConte *et al.*, 2018).

Nádory hlavy a krku obecně postihují více muže než ženy, konkrétně OPSCC je u mužů 4krát častější než u žen (Sung *et al.*, 2021). Pacienti s HPV-pozitivními OPSCC jsou mladší a je mezi nimi méně kuřáků v porovnání s HPV- negativními pacienty. Také bylo zjištěno, že lidé s HPV+ OPSCC lépe reagují na léčbu a mají vyšší míru přežití (Young *et al.*, 2015).

5.3 Ostatní anogenitální nádory asociované s HPV

Na rozdíl od rakoviny děložního čípku jsou nádory vulvy, pochvy, anu a penisu relativně vzácné (Sung *et al.*, 2021). Nejčastěji detekovaným typem je u všech HPV16 [tabulka 1].

lokace HPV-asociovaného nádoru	prevalence HPV	Nejčastější typ HPV	procentuální zastoupení HPV16 u HPV+ nádorů	Druhý nejčastější typ HPV	procentuální zastoupení 2. nejčastějšího typu u HPV+ nádorů
anus	88,3 %	HPV16	80,7 %	HPV18	3,6 %
děložní hrdlo	99,7 %	HPV16	56,6 %	HPV18	16,0 %
penis	50,8 %	HPV16	68,3 %	HPV6	8,1 %
vagina	74,0 %	HPV16	59,0 %	HPV18, HPV52	6,0 %; 6,0 %
vulva	25,1 – 39,1 %	HPV16	> 70,0 %	HPV33	~ 7 %

Tabulka 1: Prevalence HPV u anogenitálních nádorů a procentuální zastoupení dvou nejčastějších typů HPV u HPV-pozitivních nádorů. Data z (Walboomers *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2011; Sanjosé *et al.*, 2013; Alemany *et al.*, 2014, 2015; Olesen *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2023)

6 Varianty HPV16

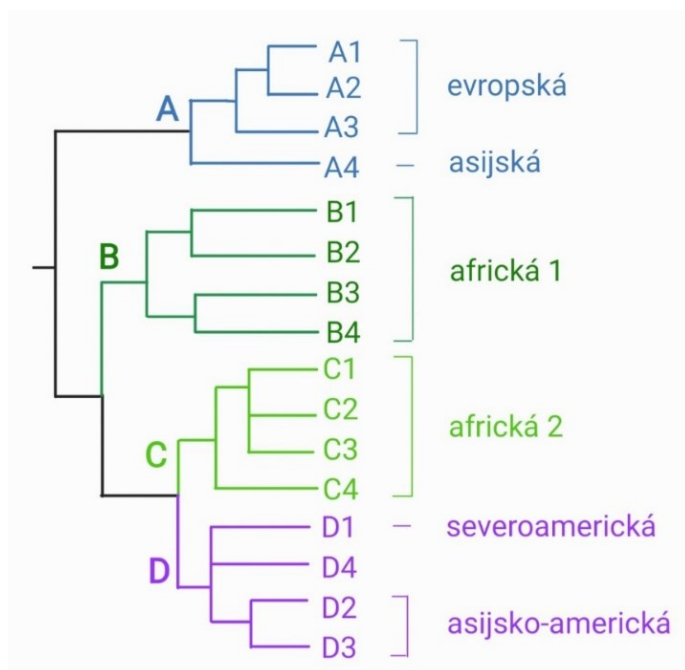
HPV16 je nejčastějším typem detekovaným u všech HPV-pozitivních nádorů (Castellsagué *et al.*, 2016) [tabulka 1], a to z něj dělá asi nejstudovanější typ.

Jednotlivé typy HPV jsou podle míry odlišnosti nukleotidové sekvence celého genomu dále děleny na linie a sub-linie (Chen *et al.*, 2011). Genom HPV16 však vykazuje variabilitu i v rámci linií a sub-linií a většina izolovaných genomů má unikátní sekvenci (Mirabello *et al.*, 2017; Arroyo-Mühr *et al.*, 2018). Onkogenní potenciál je proto studován nejen na úrovni linií a sub-linií, ale i na úrovni jediného nukleotidu, tedy jednonukleotidových polymorfismů (SNPs, single nucleotide polymorphisms), a to zejména v onkogenech E6 a E7. Slovní spojení „varianty HPV16“ zahrnuje linie a sub-linie HPV16, ale také konkrétní SNPs v genomu HPV16.

6.1 Linie a sub-linie HPV16 a jejich identifikace

Dříve byly linie HPV pojmenovány podle geografické distribuce výskytu, u typu HPV16 to byly evropská (EUR), asijská (AS), africká-1 (AFR1), africká-2 (AFR2), asijsko-americká (AA) a severoamerická (NA) linie [obrázek 4]. Tyto linie byly poprvé historicky charakterizovány na základě sekvence LCR nebo LCR a několika genů (Ho *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1995). Každá linie a sub-linie má specifickou kombinaci SNPs, kterými se odlišuje od jiných linií/sub-linií. V genomech HPV se však často nachází i další SNPs, které necharakterizují žádnou linii/sub-linii. Ve Studii Cornet a kol. (2012) byly v sekvenci genu *E6* a LCR identifikovány specifické SNPs pro jednotlivé linie a sub-linie, tzv. diagnostické SNPs. Celkem bylo osekvenováno 953 genů *E6* a URR z izolátů HPV16 z 27 zemí (Cornet *et al.*, 2012). V mnoha recentních studiích se stále setkáme s identifikací linií a sub-linií podle specifických SNPs v těchto oblastech genomu, někdy pouze podle genu *E6*. V nejnovějších studiích se také čím dál častěji setkáme s rozlišováním linií a sub-linií na základě sekvence celého genomu, což bylo umožněno díky sekvenování nové generace (NGS, next generation sequencing), díky kterému je možné získat velké množství sekvencí celých virových genomů za kratší čas v porovnání se staršími sekvenačními metodami.

Dnes jsou linie nejčastěji označovány velkými písmeny abecedy (A, B, ...atd.). Typ HPV16 má čtyři linie A, B, C a D, v rámci kterých je rozlišováno šestnáct sub-linií: A1–3 (dříve označované jako evropské, EUR), A4 (asijská, AS), B1–4 (africké 1, AFR1), C1–4 (africké 2, AFR2), D1 (severoamerická, NA), D2–3 (asijsko-americké, AA) a D4 (Mirabello *et al.*, 2016, 2018) [obrázek 4].



Obrázek 4: Fylogenetický strom linií a sub-linií HPV16. Linie A se sub-liniemi A1-4 jsou znázorněné modrou barvou, linie B se sub-liniemi B1-4 tmavě zelenou, linie C se sub-liniemi C1-4 světle zelenou a linie D se sub-liniemi D1-4 fialovou barvou. Vytvořeno podle (Mirabello *et al.*, 2018).

6.2 Linie a sub-linie u karcinomu děložního hrdla

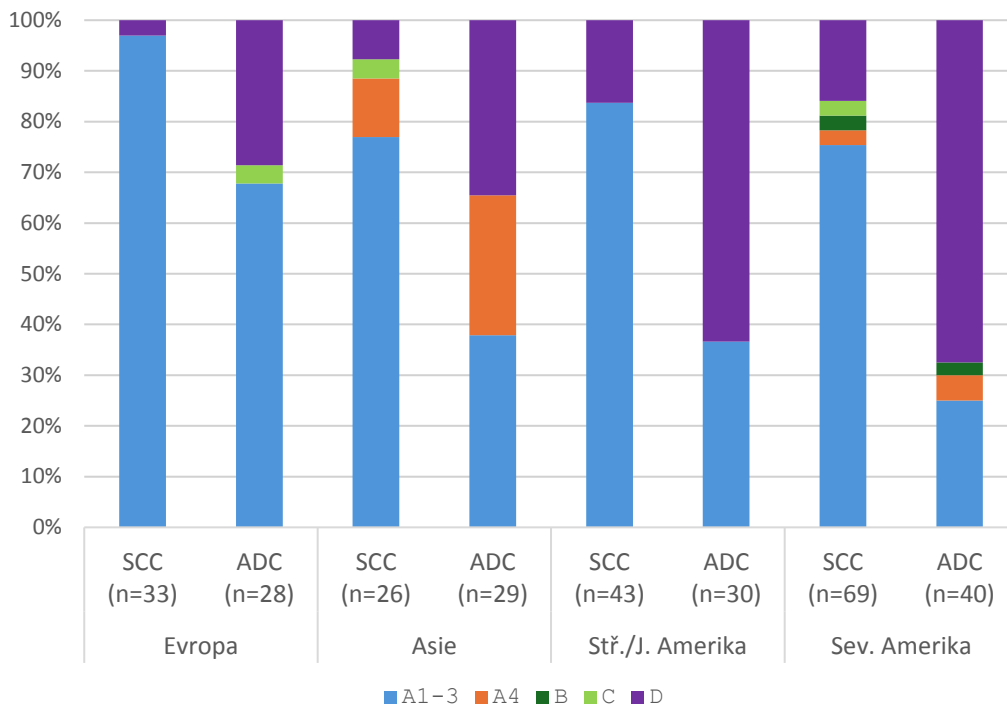
Celosvětová studie Clifford a spol. (2019), která analyzovala přes 7100 sekvencí celých genomů HPV16 u HPV16-pozitivních (HPV16+) žen, se zabývala geografickou distribucí jednotlivých sub-linií a jejich rizikem vzniku CC. Do studie byly zahrnuty ženy s normální cytologií, ASCUS, CIN1-3 a s CC. Sub-linie A1 se ukázala být světově nejrozšířenější a v této studii byla detekována u 61,1 % HPV16+ žen bez ohledu na diagnózu, dominantní byla v Evropě, Střední/Jižní Americe, Severní Americe, jižní Asii a Oceánii, kde byla její prevalence přes 70 %. Hojně zastoupená byla i v severní Africe, sub-saharské Africe a východní Asii (15 – 30 %) (Clifford *et al.*, 2019). Linie B, C, D a sub-linie A3 a A4 vykazují větší geografickou specifitu než A1 a A2. Linie B a C jsou typické pro Afriku a sub-linie A3 a A4 pro východní Asii. Linie D je nejčastější ve Střední a Jižní Americe, kde byla detekována u 24 % HPV16+ žen, a v ostatních geografických regionech, kromě Oceánie, tvořila 10-20 % HPV16 izolátů (Clifford *et al.*, 2019).

Ukázalo se, že při infekci některými sub-liniemi je vyšší riziko vzniku a progresu prekancerózních stádií směrem k CC. Sub-linie A1 je světově nejrozšířenější a je využívána jako referenční, onkogenní potenciál jednotlivých sub-linií je porovnáván právě s A1. (Mirabello *et al.*, 2016; Clifford *et al.*, 2019). Dvě velké studie se shodly na následujícím: při

infekci sub-linií A4 a linií D je mnohem vyšší riziko vzniku CC a sub-linie A2 je srovnatelně riziková s A1. Obě studie sekvenovaly celé genomy HPV16 a pro určení rizikivosti využívaly studie případů a kontrol (Mirabello *et al.*, 2016; Clifford *et al.*, 2019). Ve studii Clifford a spol. (2019) byly do kontrolní skupiny zařazeny ženy s cytologií \leq CIN1 a do případů ženy s CC. Ukázalo se, že u sub-linie A4 a linie D je asociace s CC vyšší v regionech, kde jsou tyto linie/sub-linie běžné. V porovnání s A1 byla sub-linie A4 6,6krát rizikovější v Asii a linie D byla 6,2krát rizikovější v Severní Americe a 2,2krát ve Střední a Jižní Americe. U sub-linií A1 a A2 nebyly významné rozdíly mezi kontrolami a případy, také pro linie B a C nebyla v této studii prokázána vyšší rizikovitost (Clifford *et al.*, 2019). Studie Mirabello a spol. (2016) je studie z USA, která zahrnovala 3200 HPV16+ žen s normální cytologií, ASCUS, CIN1-3 i s CC. Do kontrolní skupiny byly zařazeny ženy s cytologií $<$ CIN2 a do případů CIN3 a/nebo CC. Jako nerizikovější se zde ukázaly sub-linie D2 a D3, které byly více prevaltní u CIN3 a CC než u kontrol. V této studii byla asociace s CC, v porovnání s A1/A2, 28krát vyšší u sub-linie D2 a 14krát vyšší u D3. Vyšší rizikovitost se prokázala i u sub-linie A4. Dále byla zjištěna rozdílná rizikovitost jednotlivých sub-linií v závislosti na etniku/rase, kdy nejvyšší vyšší riziko vzniku CIN3/CC při infekci sub-liniemi D2 a D3 bylo u žen hispánského původu a při infekci sub-linií A4 u žen asijského původu. Je možné, že díky společnému vývoji s určitým etnikem/rasou se tyto sub-linie dokáží lépe vyhýbat imunitnímu systému a persistovat (Mirabello *et al.*, 2016).

Některé studie ukazují, že sub-linie se mezi sebou liší i prevalencí u jednotlivých histologických typů CC, tedy u SCC a ADC (Mirabello *et al.*, 2016; Nicolás-Párraga *et al.*, 2017; Clifford *et al.*, 2019). Studie Nicolás-Párraga a spol. (2017), která analyzovala vzorky ze 118 SCC a 120 ADC pocházející z Evropy, Střední/Jižní Ameriky, Asie a Afriky, se zabývala distribucí linií/sub-linií u jednotlivých histologických typů. Sub-linie byly identifikovány na základě sekvence LCR, genu *E6* a *L2*, které byly získány Sangerovým sekvenováním. Ukázalo se, že linie D je více asociovaná s ADC v porovnání se sub-liniemi A1-3, které jsou mnohem častější u SCC. V Asii byla pro vznik ADC rizikovější také sub-linie A4 [obrázek 5]. Celkem byly v této studii sub-linie A1-3 detekovány u 81 % SCC, ale pouze u 46 % ADC a linie D byla zodpovědná pouze za 9 % SCC, ale 40 % ADC. Linie B a C jsou mimo Africký region vzácné a této studii nebylo dostatečné množství vzorků pro prokázání asociace s některým z histologických typů CC (Nicolás-Párraga *et al.*, 2017). Zdá se, že při infekci linií D je riziko vzniku ADC vyšší celosvětově, ale ve Střední/Jižní a Severní Americe je ještě výraznější (Mirabello *et al.*, 2016; Nicolás-Párraga *et al.*, 2017; Clifford *et al.*, 2019) [obrázek 5]. Ve

studii Mirabello a kol. (2016) z USA, která zahrnovala 69 SCC a 40 ADC, se asociace s ADC prokázala pro sub-linie D2, D3 a A4. V porovnání s A1/2 měla sub-linie D2 téměř 140krát vyšší riziko vzniku ADC, ale pouze 7,6krát vyšší riziko vzniku SCC, u D3 bylo riziko 59krát vyšší pro ADC a 5,2krát pro SCC a u A4 9,8krát pro ADC a 1,9krát pro SCC.



Obrázek 5: Distribuce variant HPV16 u histologických typů cervikálního karcinomu v rámci čtyřech geografických regionů. Sub-linie A1-3 jsou znázorněny modrou barvou, sub-linie A4 oranžovou, linie B tmavě zelenou, linie C světle zelenou a linie D fialovou barvou. Data pro Evropu, Asii a Střední/Jižní Ameriku jsou z (Nicolás-Párraga *et al.*, 2017), data pro Severní Ameriku jsou ze studie z USA (Mirabello *et al.*, 2016).

6.3 Variabilita genomu HPV16

Genom papilomavirů je vysoce variabilní na úrovni jednotlivých izolátů, studie ukázaly, že většina HPV16+ žen je infikována HPV16 s unikátním genomem (~ 80 %) (Mirabello *et al.*, 2017; Arroyo-Mühr *et al.*, 2018). Variabilita izolovaných HPV16 genomů je porovnávána s referenčním genomem HPV16REF (prototyp), který patří do linie A/sub-linie A1 (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

Ve studii Mirabello a kol. (2017) bylo analyzováno 5 570 celých genomů HPV16 a cílem této studie bylo zjistit, jak genetická variabilita sekvence HPV16 ovlivňuje vznik prekancerózních stádií a CC. Sekvence genomů HPV16 od kontrolní skupiny, kam bylo zahrnuto 1 165 vzorků z cytologií ≤ CIN1, byly porovnávány s genomy z CIN2 (n = 1 150),

CIN3/AIS (n = 1 407) a CC (n = 1 848). Asociace SNPs s rizikem vzniku CIN3/CC byla studována pouze u linií A1 a A2 z důvodu nízkého počtu ostatních sub-linií. Celkem bylo nalezeno 1 985 variabilních pozic. V této studii bylo porovnáváno množství vzácných SNPs (frekvence < 1 %) u případů a kontrol. Ukázalo se, že kontroly obsahovaly více vzácných SNPs. Nesynonymní a nonsense vzácné SNPs byly mnohem častější u kontrol v porovnání s případy, a to zejména v sekvenci genu *E7*, dále také v sekvenci genů *E1* a *L1*. Gen *E7*, u případů a kontrol dohromady, měl také v porovnání s ostatními geny nejmenší poměr nesynonymních a synonymních mutací (Mirabello *et al.*, 2017). I v jiných studiích bylo menší množství SNPs v genomech HPV16 z prekancerózních stádií a CC v porovnání s genomy z kontrol (Hirose *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020). Švédská studie Arroyo-Mühr a kol. (2018) analyzovala celé genomy HPV16 z 218 vzorků od žen s CIN3, CC a normální cytologií. V této studii bylo nalezeno téměř 600 variabilních pozic v genomu HPV16. Nejvíce variabilní oblastí genomu zde byla regulační oblast a nejméně variabilní byl gen *E7*.

Sedm SNPs, které se vyskytovaly s frekvencí $\geq 1\%$, bylo ve studii Mirabello a kol. (2017) v analýze případů a kontrol výrazně asociováno s vyšším nebo nižším rizikem vzniku CIN3/CC. U sub-linií A1/2 byly identifikovány dva SNPs v regulační oblasti na pozicích 7 387 a 7 359, u kterých bylo riziko nižší. U sub-linie A2 bylo identifikováno pět SNPs s vyšší rizikovostí, dva v regulační oblasti na pozicích 7 507 a 7 868 a tři v genu *L2* na pozicích 5 032, 4 247 a 5 121 (Mirabello *et al.*, 2017). V této studii nebyla dále rozebírána významnost těchto SNPs.

6.3.1 Konzervovaná sekvence genu *E7*

Gen *E7* je nejvíce konzervovaným genem v HPV16 genomu a většina HPV16 izolátů z A1/A2 linie má sekvenci genů *E7* shodnou s prototypem (Mirabello *et al.*, 2017; Arroyo-Mühr *et al.*, 2018). Konzervovaná sekvence genu *E7* se zdá být klíčová pro jeho transformační schopnost (Mirabello *et al.*, 2017). Ve studii Arroyo-Mühr a kol. (2018) mělo 83 % žen s CIN3 nebo CC sekvenci genu *E7* shodnou s prototypem (Arroyo-Mühr *et al.*, 2018). Studie Mirabello a kol. (2017) při analýze případů a kontrol ukázala, že geny *E7* jsou u případů CIN3/CC mnohem méně variabilní než geny *E7* u kontrolní skupiny (< CIN2). Velký rozdíl byl zaznamenán hlavně v množství nonsense/nesynonymních mutací, u 4,6 % kontrol byly nalezeny nesynonymní/nonsense mutace v genu *E7*, ale u případů CIN3/CC to bylo pouze 0,7 %. Rozdíl mezi případy a kontrolami byl také v poměru synonymních a nesynonymních mutací v sekvenci genu *E7*. V obou skupinách bylo zaznamenáno více synonymních mutací

než nesynonymních, ale zatímco u kontrol bylo synonymních 3,6krát více u prekancerózních stádií/CC 20krát.

Některé varianty genu *E7*, které byly ve studii Mirabello a kol. (2017) nalezeny pouze u kontrol a varianty nalezené u prekancerózních stádií, byly později studovány v *in vitro* studii (Lou *et al.*, 2022). V této studii byly porovnávány buněčné kultury transfekované plasmidem s genem *E7*, jehož sekvence byla shodná s prototypem, a kultury transfekované plasmidem s variantami genu *E7*. Všechny produkty variant disponovaly menší transformační aktivitou a jejich hladina byla v buňkách nižší v porovnání s proteinem *E7* kódovaným prototypem HPV16. Nejnižší transformační aktivitu vykazovaly varianty H9R, E33K, P92L a P92S identifikované pouze u kontrol. Buňky s těmito variantami také vykazovaly menší schopnost migrace v porovnání s buňkami s prototypem. Buňky s variantami R77S a P6L měly hladinu proteinu *E7* v jádře téměř na stejné úrovni jako u buněk s prototypem. Varianta R77S vykazovala téměř stejnou transformační aktivitu jako prototyp a schopnost migrace buněk s touto variantou byla na stejné úrovni jako u buněk s prototypem (Lou *et al.*, 2022). Varianta H51N byla nalezena i v jiných studiích u CIN3 a také u OPSCC (LeConte *et al.*, 2018; Totaro *et al.*, 2022). Ve studii Hirose a kol. (2018) byla u CIN2/3 identifikována varianta R77L.

Zdá se, že nesynonymní mutace v genu *E7* často vedou k nižší expresi a syntéze defektních proteinů *E7* (Lou *et al.*, 2022), a že konzervovaná sekvence genu *E7* je zásadní pro rozvoj rakoviny (Mirabello *et al.*, 2017). Nesynonymní mutace na některých pozicích v genu *E7* jsou však kompatibilní se vznikem OPSCC a prekancerózních stádií CC.

6.3.2 Mutace v genomu HPV16 způsobené enzymem APOBEC3

Většina HPV16 izolátů má unikátní sekvenci a genomy HPV16 od kontrol (< CIN 2) obsahují více SNPs než HPV16 z prekancerózních stádií a CC (Mirabello *et al.*, 2017). Některé studie ukázaly, že část variability genomů HPV16 by se dala vysvětlit aktivitou hostitelských enzymů z rodiny APOBEC3 (Hirose *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020). APOBEC3 fungují jako cytidin deaminázy a hrají důležitou roli při antivirové imunitní odpovědi buňky. Konkrétně u HPV je významný zejména APOBEC3A a APOBEC3B. Cílové místo tohoto enzymu je dinukleotid TC (Warren *et al.*, 2017). Deaminací cytosinu vzniká uracil, což nakonec vede k záměně cytosinu za thymin ($C \rightarrow T$). Studie ukázaly, že velká část substitucí $C \rightarrow T$ v genomech HPV16 vznikla na cílovém místě pro APOBEC3, a tak se zdá, že některé mutace vznikají *de novo* v průběhu infekce v rámci hostitele (Hirose *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020). Další indikací, že APOBEC3 edituje genom HPV16 v průběhu infekce je zjištění, že SNPs

potencionálně způsobené enzymem APOBEC3 se v populaci vyskytují spíše s nižší frekvencí v porovnání s SNPs, které nebyly způsobené tímto enzymem (Zhu *et al.*, 2020; Faden *et al.*, 2021).

Studie ukázaly, že SNPs způsobené enzymem APOBEC3 jsou spojené s benigní infekcí a vyčištěním infekce HPV (Hirose *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020). Studie Hirose a kol. (2018) se zabývala genetickou variabilitou typů HPV16, 52 a 58 v rámci hostitele. Analyzováno bylo 151 vzorků z CIN1, CIN2/3 a CC. Substituce C → T tvořila u CIN1 61 % všech substitucí, u CC pouze 33 % (Hirose *et al.*, 2018). V jiné studii, která analyzovala přes 5000 celých genomů HPV16, se ukázalo, že genomy izolované z CIN2/3 obsahují o 30 % méně mutací potencionálně způsobených editací enzymem APOBEC3 v porovnání s genomy HPV16 u kontrolní skupiny (\leq CIN1) (Zhu *et al.*, 2020). Také se ukázalo, že většina nesynonymních a nonsense mutací v ORF E7 u kontrolní skupiny, byla na cílovém místě pro APOBEC3 (Mirabello *et al.*, 2017), a jak už bylo dříve zmíněno, varianty proteinu E7 disponují menší transformační aktivitou (Lou *et al.*, 2022).

Ve studii Hirose a kol. (2018) bylo v genomech HPV16 nalezeno 6,7krát více nesynonymních mutací než synonymních, a to z důvodu vysokého počtu substitucí na první a druhé pozici kodónu. Ve studii Zhu a kol. (2020) bylo 95 % mutací na cílovém místě pro APOBEC nesynonymních, ale pouze 71% mutací, které nebyly způsobené tímto enzymem, bylo nesynonymních. Také studie analyzující 72 sekvencí celých genomů HPV16 z OPSCC ukázala, že více než 90 % mutací způsobených enzymem APOBEC bylo nesynonymních. U mutací nezpůsobených enzymem APOBEC to bylo méně než 80 % (Faden *et al.*, 2021). Tento jev by mohl být vysvětlen tím, že je jen málo cílových míst pro APOBEC, kdy je cytidin na třetím místě kodónu. Je možné, že aktivitou enzymu APOBEC došlo k jejich vypotřebenosti v průběhu evoluce. Substituce na třetím místě kodónu jsou často synonymní, a tak je možné, že v průběhu evoluce docházelo k toleranci editací enzymem APOBEC na těchto pozicích. (Warren *et al.*, 2015).

Je možné, že aktivita APOBEC3 výrazně přispěla k evoluci slizničních alfa-papilomavirů, a také k vývoji jednotlivých linií a sub-linií u HPV16 (Warren *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2020). Ukázalo se, že genomy papilomavirů mají snížený počet dinukleotidů TC a u alfa-papilomavirů, z nichž většina infikuje sliznice, je počet dinukleotidů TC redukovaný nejvíce. V buňkách slizničního epitelu je zvýšená exprese enzymů rodiny APOBEC3 v porovnání s buňkami kožního epitelu. Existuje teorie, že zejména u slizničních alfa-papilomavirů docházelo

v průběhu evoluce k selekci variant, které měly menší počet dinukleotidů TC (Warren *et al.*, 2015).

Také byl zaznamenán rozdíl v množství APOBEC-způsobených mutací mezi sub-liniemi A1/2 a D2/3 u kontrol (\leq CIN1). Kontroly se sub-linií D2/3 obsahovaly 2krát méně těchto mutací než kontroly s A1/A2 (Zhu *et al.*, 2020), díky tomu by mohly mít kontroly se sub-liniemi D2/3 zvýšené riziko vzniku prekancerózních stádií a CC.

6.4 Varianty genu *E6*

Studie zabývající se onkogenním potenciálem HPV16 se často zaměřují na sekvenci virového onkogenu *E6*. Sekvence genu *E6* se liší u jednotlivých sub-linií. Linie D, zejména sub-linie D2 a D3, je asociována s vyšším rizikem vzniku CC v Severní, Střední a Jižní Americe (Mirabello *et al.*, 2016; Clifford *et al.*, 2019). Gen *E6* u sub-linií D2/3 obsahuje pět specifických SNPs (G145T, T286A, A289G, C335T a T350G), z nichž tři jsou nesynonymní (G145T/C335T/ T350G) – vedou k záměně aminokyselin (Q14H, H78Y a L83V) (Cornet *et al.*, 2012). Některé studie se tak zabývaly tím, jak rozdílná sekvence genu *E6* u prototypu a sub-linií D2/3 ovlivňuje jeho onkogenní potenciál.

In vitro studie Niccoli a kol. (2012) se zabývala schopností variant genu *E6* imortalizovat a transformovat primární lidské keratinocyty při nepřítomnosti genu *E7*. Do jednovrstvých buněčných kultur byl pomocí retrovirových vektorů dopraven gen *E6*, který měl sekvenci shodnou s prototypem (A1E6), nebo varianta genu *E6*, která obsahovala nesynonymní SNPs charakteristické pro sub-linie D2/3 (D2/3E6). A1E6 i D2/3E6 byly schopné imortalizovat keratinocyty i bez genu *E7*, avšak varianta D2/3E6 byla efektivnější. Buněčné kultury s D2/3E6 rostly rychleji a exprese katalytické podjednotky telomerázy (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) byla vyšší v porovnání s kulturami s A1E6. Varianta D2/3E6 byla na rozdíl od A1E6 schopná transformovat lidské primární keratinocyty bez genu *E7* (Niccoli *et al.*, 2012). Mezi další studie zabývající rozdílným onkogenním potenciálem variant genu *E6* patří studie Jackson a spol. (2014, 2016). Varianty genu *E6* zde byly studovány v kontextu celého virového genomu. Varianta A1E6 měla sekvenci shodnou s prototypem a varianta D2/3E6 obsahovala tři nesynonymní substituce v genu *E6*, které jsou specifické pro sub-linie D2/3. Pro studium byl použit trojrozměrný epiteliální model (organotypická epiteliální raftová kultura), ve kterém dochází k diferenciaci keratinocytů, a který vytváří vrstevnatý dlaždicový epitel podobný *in vivo* podmínkám. U epiteliálních kultur s D2/3E6 byla zaznamenána vyšší

exprese hTERT a nižší exprese IFN- κ (interferon kappa). Epiteliální kultury s genomem HPV16 v porovnání s kontrolní epiteliální kulturou bez HPV16 měly více vrstev (hyperplázie) a také obsahovaly atypické buňky (dysplázie). Varianta D2/3E6 měla větší schopnost deregulovat diferenciaci keratinocytů a hyperplázie i dysplázie byla mnohem výraznější u kultur s touto variantou v porovnání s kulturami s A1E6. Rafty s A1E6 obsahovaly jen jednu až dvě vrstvy nediferencovaných buněk, na rozdíl od raftů s D2/3E6, u kterých tvořily nediferencované buňky až osm vrstev (Jackson *et al.*, 2014). Dále se ukázalo, že se kultury lišily expresí některých virových genů. Expresie genů *E6* a *E7* byla vyšší u varianty D2/3E6, naopak exprese genu *E2* byla vyšší u A1E6 (Jackson *et al.*, 2014). Zdá se, že větší schopnost proliferace epitelu s variantou D2/3E6 způsobuje výraznější chromozomální nestabilitu, a to zvyšuje náchylnost hostitelského genomu k integraci virové DNA. Větší tendence k integraci u varianty D2/3E6 by vysvětlovala rozdíly v genové expresi, jelikož při integraci dochází často k přerušení či ztrátě některých genů, mezi které patří virový transkripční represor *E2*, a tím ke zvýšené expresi onkogenů *E6* a *E7* (Jackson *et al.*, 2016).

Významnou funkcí proteinu *E6* je degradace proteinu p53. Ve dvou *in vitro* studiích, které využívaly jednovrstvé buněčné kultury a v buňkách byl přítomný pouze gen *E6* nebo geny *E6* a *E7*, nebyly zaznamenány rozdíly ve schopnosti degradovat protein p53 u variant A1E6 a D2/3E6 (Niccoli *et al.*, 2012; Sichero *et al.*, 2012). Ve studii, která zkoumala varianty genu *E6* v kontextu celého virového genomu, a která využívala trojrozměrný epiteliální model, byla v kulturách s variantou D2/3E6 nižší exprese proteinu p53 než v kulturách s A1E6 (Jackson *et al.*, 2014).

Nejčastějším polymorfismem v nukleotidové sekvenci genu *E6* v rámci linie A je substituce T \rightarrow G na pozici 350 (T350G), která vede v proteinu *E6* k záměně leucinu na pozici 83 za valin (L83V) (Cornet *et al.*, 2012). Některé studie uvádí, že varianta T350G se v porovnání s prototypem (T350) liší rizikem vzniku prekancerózních stádií/CC, jestli je však riziko vyšší nebo nižší závisí na konkrétní populaci. Zdá se, že tato varianta je obecně rizikovější ve Střední a Jižní Americe, kde se také nachází s vyšší frekvencí v porovnání s ostatními geografickými regiony (Cornet *et al.*, 2013; Totaro *et al.*, 2022). *In vitro* studie zkoumající schopnost variant genu *E6* immortalizovat a transformovat keratinocyty bez přítomnosti genu *E7* ukázala, že varianta T350G dokáže immortalizovat primární lidské keratinocyty na podobné úrovni jako varianta D2/3E6, tedy efektivněji než prototyp. Buněčné kultury s variantou T350G rostly rychleji a byla v nich zaznamenána vyšší exprese hTERT v porovnání s kulturami s prototypem genu *E6* (Togtema *et al.*, 2015). Varianta T350G však na

rozdíl od D2/3E6 nedokáže způsobit transformaci buněk *in vitro* bez přítomnosti genu *E7* (Niccoli *et al.*, 2012; Togtema *et al.*, 2015). V *in vitro* studii Sichero a kol. (2012), která se zabývala onkogenním potenciálem variant genu *E6* v přítomnosti genu *E7*, měla varianta T350G větší transformační kapacitu v porovnání s prototypem. Tato varianta nevykazovala větší schopnost degradovat protein p53 v porovnání s prototypem (Sichero *et al.*, 2012; Togtema *et al.*, 2015).

6.5 Varianty HPV16 u ostatních anogenitálních nádorů

Většina studií se zaměřuje na varianty HPV16 u CC, existují však i studie zabývající se variantami HPV16 u ostatních anogenitálních nádorů a jednou z nich je Nicolás-Párraga a spol. (2016), která se zabývala distribucí sub-linií HPV16 u karcinomů cervixu, vulvy, pochvy, anu a penisu. Analyzováno bylo 692 HPV16+ vzorků pocházejících z Evropy, Asie a Střední/Jižní Ameriky. Varianty byly identifikovány na základě specifických SNPs v sekvenci LCR a genech *L2* a *E6*. Pouze 9 vzorků patřilo do linie B a C, a tudíž byly z důvodu nízkému počtu vyřazeny z další analýzy. Ukázalo se, že nejsou významné rozdíly v distribuci variant mezi jednotlivými anogenitálními karcinomy v rámci stejného geografického regionu s výjimkou karcinomu anu (AC) v Asii. Nejčastějšími subliniemi ve všech třech regionech byly A1-3, ve Střední a Jižní Americe byla více prevalentní linie D a v Asii sub-linie A4 v porovnání s ostatními regiony. Dohromady byly sub-linie A1-3 zodpovědné za více než 70 % všech anogenitálních nádorů s výjimkou zmíněného AC v Asii, kde byla nejvíce prevalentní sub-linie A4 (80 %) (Nicolás-Párraga *et al.*, 2016).

Papilomaviry jsou zodpovědné i za vznik neoplázií u mužů a několik studií se zabývalo distribucí a perzistencí variant HPV16 v populaci mužů (Gonçalves *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2023). Podle Ferreira a kol. (2023) je linie A spojená s 2,7krát vyšším rizikem dlouhodobé perzistentní infekce genitálií u mužů v porovnání s ostatními liniemi. Studie trvala 3 roky a jako dlouhodobá perzistentní infekce zde byla považovaná infekce trvající ≥ 12 měsíců. Do této studie bylo zahrnuto přes 700 HPV16+ mužů z USA, Brazílie a Mexika a linie byly identifikovány na základě sekvence LCR oblasti. V průběhu studie se u 17 mužů vyvinuly externí genitální léze, kdy 7 z nich byly penilní intraepiteliální neoplázie vyšší třídy (PeIN 2/3). U všech PeIN 2/3 a téměř u všech méně závažných lézí byla detekovaná sub-linie A1 (Ferreira *et al.*, 2023). Studie Gonçalves a spol. (2022) zkoumala perzistenci variant HPV16 análního kanálu u 124 HPV16+ mužů bez ohledu na diagnózu. Vzorky pocházely z USA, Brazílie a Mexika. V této studii nebylo zjištěno vyšší riziko perzistentní infekce u žádné z linií.

6.6 Varianty HPV16 u oropharyngeálního karcinomu

Typ HPV16 je u HPV+ OPSCC ještě prevalentnější než u CSCC (cervical squamous cell carcinoma). V novějších studiích z USA byl HPV16 detekován u více než 90 % HPV+ OPSCC (LeConte *et al.*, 2018; Lewis *et al.*, 2021). Studie LeConte a kol. (2018) z USA porovnávala distribuci linií a sub-linií HPV16 u 92 vzorků z HPV16+ OPSCC a 49 vzorků z HPV16+ CSCC. Varianty byly identifikovány na základě sekvence genů *E6* a *E7*. V této studii nebyly zjištěny významné rozdíly v prevalenci jednotlivých sub-linií mezi OPSCC a CSCC, avšak při porovnání skupin vytvořených na základě fylogenetické příbuznosti se ukázalo, že linie A, tedy sub-linie A1-4 dohromady, je mnohem častější u OPSCC (90 %) než u CSCC (71 %) a sub-linie D2-3 dohromady byly zase prevalentnější u CSCC (23 %) než u OPSCC (4 %). Pro porovnání, v dalších novějších studiích z USA a Kanady se prevalence linie A u HPV16+ OPSCC také pohybovala okolo 90 % a prevalence sub-linií D2-3 byla 6 – 7 % (Lewis *et al.*, 2021; Lang Kuhs *et al.*, 2022; Gameiro *et al.*, 2023) a podle Mirabello a kol. (2016) byla u HPV16+ CSCC prevalence linie A 78 % a sub-linií D2-3 16 %.

Dále byl zaznamenán rozdíl v počtu nesynonymních mutací v genu *E6*, 17 z 92 vzorků OPSCC obsahovalo nesynonymní mutaci v genu *E6* a u CSCC pouze 1 vzorek ze 49. Gen *E7* byl málo variabilní jak u OPSCC, tak u CSCC (LeConte *et al.*, 2018). Studie Lang Kuhs (2022) analyzovala 384 sekvencí celých genomů HPV16 z OPSCC a cílem této studie bylo zjistit asociaci genetických variant s celkovým přežíváním pacientů. Celkem bylo identifikováno 8 SNPs, jejichž frekvence byla ≥ 1 %, u kterých bylo zjištěno horší přežívání pacientů. V genu *E1* na pozici 1 053, v genu *L2* na pozicích 4 410, 4 539, 5 050, 5 254, v genu *L1* na pozicích 5 962, 6 025 a v URR na pozici 7 173 (Lang Kuhs *et al.*, 2022). Pozice těchto SNPs se neshodují s těmi, které byly popsány u vzorků z cervixu jako více rizikové pro rozvoj CIN3 a CC. Stojí však za povšimnutí, že všechny rizikovější SNPs u vzorků z cervixu a velká část SNPs spojená s horším přežíváním pacientů s OPSCC jsou v sekvenci genu *L2* a v regulační oblasti (Mirabello *et al.*, 2017; Lang Kuhs *et al.*, 2022).

7 Závěr

Tato práce se zabývala genetickými variantami HPV16, jejich distribucí v různých geografických regionech a jejich vlivem na prognózu pacientů. Popsány byly fylogenetické varianty, tedy linie a sub-linie, a také konkrétní jednonukleotidové polymorfismy. Práce také popisuje *in vitro* studie zabývající se onkogenním potenciálem variant onkogenů *E6* a *E7*.

Většina studií, které se zabývaly distribucí a rizikovostí linií a sub-linií HPV16, byla provedena na vzorcích z cervixu. Epidemiologické studie ukázaly, že prevalence linií a sub-linií HPV16 je v jednotlivých geografických regionech rozdílná, a že při infekci některými sub-liniemi hrozí vyšší riziko progresu infekce a vzniku prekancerózních stádií a CC. Prevalence jednotlivých linií a sub-linií je také rozdílná u histologických typů CC. Míra rizikovosti sub-linií však závisí na konkrétním geografickém regionu. Předpokládá se, že rizikovost variant HPV16 je výrazně ovlivněna jejich koevolucí s určitým etnikem/rasou. Epidemiologických studií, které se zabývaly variantami HPV16 u ostatních HPV-asociovaných nádorů, je mnohem méně a chybí zejména ty, které by analyzovaly celé genomy. Limitem studií, které se zabývají ostatními HPV-asociovanými anogenitálními nádory, je také malé množství pacientů.

Většina izolátů HPV16 má unikátní sekvenci genomu, a to z velké části díky aktivitě hostitelského enzymu APOBEC, který edituje genom HPV16 v hostiteli v průběhu infekce. U vzorků z cervixu se ukázalo se, že čím je cytologický nález závažnější, tím méně je izolovaný genom HPV16 variabilní. Bylo zjištěno, že kumulace mutací v genomu HPV16 způsobených enzymem APOBEC snižuje riziko progresu cervikálních neoplázií a zvyšuje pravděpodobnost vyčištění infekce HPV16. Studie také vyzdvihují důležitost konzervované sekvence genu *E7*, která je důležitá pro schopnost transformovat keratinocyty, což potvrdila i studie *in vitro*.

Některé studie se také zabývaly SNPs napříč celým genomem a jejich vztahem k prognóze pacientů. V genomech HPV16 z OPSCC bylo nalezeno několik SNPs, které byly asociované s horším celkovým přežitím pacientů. V genomech HPV16 ze vzorků z cervixu bylo identifikováno několik SNPs, které byly asociované s výrazně nižším nebo vyšším rizikem vzniku CIN3 a CC. Zatím však nebyly provedeny *in vitro* studie, které by se zabývaly mechanismem, jakým tyto SNPs ovlivňují funkci proteinů a regulační oblasti.

NGS sekvenování umožnilo analyzovat velké množství celých genomů HPV16 za relativně krátký čas. Díky tomu je možné efektivněji zkoumat variabilitu genomu HPV16 a zhodnotit významnost SNPs napříč celým genomem. Zdá se, že i jediný polymorfismus v genomu HPV16 může mít vliv na průběh onemocnění a jeho vyústění. Do budoucna jsou potřeba další studie, které by zkoumaly riziko vzniku ostatních anogenitálních nádorů a nádorů hlavy a krku při infekci jednotlivými variantami HPV16.

8 Zdroje

*Sekundární zdroje

- Alemaný, L. *et al.* (2014) 'Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: A worldwide study in 597 samples', *European Journal of Cancer*, 50(16), pp. 2846–2854. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.018>.
- Alemaný, L. *et al.* (2015) 'Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide', *International Journal of Cancer*, 136(1), pp. 98–107. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.28963>.
- Arroyo-Mühr, L.S. *et al.* (2018) 'Human papillomavirus type 16 genomic variation in women with subsequent in situ or invasive cervical cancer: prospective population-based study', *British Journal of Cancer*, 119(9), pp. 1163–1168. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0311-7>.
- Baker, T.S. *et al.* (1991) 'Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction.', *Biophysical Journal*, 60(6), pp. 1445–1456.
- Berg, M. and Stenlund, A. (1997) 'Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins', *Journal of Virology*, 71(5), pp. 3853–3863. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3853-3863.1997>.
- *Bergvall, M., Melendy, T. and Archambault, J. (2013) 'The E1 proteins', *Virology*, 445(1), pp. 35–56. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E. and Band, V. (1996) 'E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway', *Cancer Research*, 56(20), pp. 4620–4624.
- Buck, C.B. *et al.* (2008) 'Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid', *Journal of Virology*, 82(11), pp. 5190–5197. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02726-07>.
- Chen, Z. *et al.* (2011) 'Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67', *PLOS ONE*, 6(5), p. e20183. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020183>.
- Chow, L.T. *et al.* (1987) 'Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata', *Journal of Virology*, 61(8), pp. 2581–2588. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.61.8.2581-2588.1987>.
- Clifford, Gary M. *et al.* (2005) 'Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(5), pp. 1157–1164. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0812>.
- Clifford, G.M. *et al.* (2019) 'Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive

- women', *Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)*, 7, pp. 67–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.02.001>.
- Cole, S. and Danos, O. (1987) 'Nucleotide-Sequence and Comparative-Analysis of the Human Papillomavirus Type-18 Genome - Phylogeny of Papillomaviruses and Repeated Structure of the E6 and E7 Gene-Products', *Journal of Molecular Biology*, 193(4), pp. 599–608. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90343-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90343-3).
- Cornet, I. *et al.* (2012) 'Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR', *Journal of Virology*, 86(12), pp. 6855–6861. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.00483-12>.
- Cornet, I. *et al.* (2013) 'HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide', *British Journal of Cancer*, 108(1), pp. 240–244. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.508>.
- Day, P.M. *et al.* (2004) 'Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), pp. 14252–14257. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404229101>.
- De Vuyst, H. *et al.* (2009) 'Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis', *International Journal of Cancer*, 124(7), pp. 1626–1636. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.24116>.
- Doorbar, J. *et al.* (1997) 'Characterization of Events during the Late Stages of HPV16 Infection *in Vivo* Using High-Affinity Synthetic Fabs to E4', *Virology*, 238(1), pp. 40–52. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8768>.
- Doorbar, J. and Gallimore, P.H. (1987) 'Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a.', *Journal of Virology*, 61(9), pp. 2793–2799.
- Faden, D.L. *et al.* (2021) 'APOBEC Mutagenesis Is Concordant between Tumor and Viral Genomes in HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Viruses*, 13(8), p. 1666. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13081666>.
- Ferreira, M.T. *et al.* (2023) 'Human Papillomavirus 16 Lineage A Variants Associated With Persistent Genital Infections in Men: The HPV Infection in Men (HIM) Study', *The Journal of Infectious Diseases*, 228(12), pp. 1748–1757. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad204>.
- Gameiro, S.F. *et al.* (2023) 'HPV16 Intratypic Variants in Head and Neck Cancers: A North American Perspective', *Viruses*, 15(12), p. 2411. Available at: <https://doi.org/10.3390/v15122411>.
- Gonçalves, M.G. *et al.* (2022) 'Prevalence and persistence of HPV-16 molecular variants in the anal canal of men: The HIM study', *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 149, p. 105128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128>.

- 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’, *Journal of Virology*, 75(16), pp. 7583–7591. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7583-7591.2001>.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N. and Galloway, D.A. (1993) ‘Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins’, *Journal of Virology*, 67(1), pp. 315–322. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.67.1.315-322.1993>.
- Hawley-Nelson, P. *et al.* (1989) ‘HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes.’, *The EMBO Journal*, 8(12), pp. 3905–3910. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x>.
- Hirose, Y. *et al.* (2018) ‘Within-Host Variations of Human Papillomavirus Reveal APOBEC Signature Mutagenesis in the Viral Genome’, *Journal of Virology*, 92(12), p. 10.1128/jvi.00017-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.00017-18>.
- Ho, L. *et al.* (1993) ‘The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations.’, *Journal of Virology*, 67(11), p. 6413. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6413-6423.1993>.
- Holmgren, S.C. *et al.* (2005) ‘The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle’, *Journal of Virology*, 79(7), pp. 3938–3948. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3938-3948.2005>.
- Hughes, F. and Romanos, M. (1993) ‘E1 Protein of Human Papillomavirus Is a Dna Helicase/ATPase’, *Nucleic Acids Research*, 21(25), pp. 5817–5823. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/21.25.5817>.
- Huh, K. *et al.* (2007) ‘Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor’, *Journal of Virology*, 81(18), pp. 9737–9747. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.00881-07>.
- Ilves, I., Kivi, S. and Ustav, M. (1999) ‘Long-Term Episomal Maintenance of Bovine Papillomavirus Type 1 Plasmids Is Determined by Attachment to Host Chromosomes, Which Is Mediated by the Viral E2 Protein and Its Binding Sites’, *Journal of Virology*, 73(5), pp. 4404–4412. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.73.5.4404-4412.1999>.
- Jackson, R. *et al.* (2014) ‘Tumorigenesis driven by the human papillomavirus type 16 Asian-American e6 variant in a three-dimensional keratinocyte model’, *PLOS ONE*, 9(7), p. e101540. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101540>.
- Jackson, R. *et al.* (2016) ‘Functional variants of human papillomavirus type 16 demonstrate host genome integration and transcriptional alterations corresponding to their unique cancer epidemiology’, *BMC Genomics*, 17(1), p. 851. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3203-3>.

- Jonson, A.L. *et al.* (2008) ‘Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer’, *Gynecologic Oncology*, 111(2), pp. 356–364. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.06.033>.
- Kanda, T. *et al.* (1991) ‘Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif’, *Virology*, 185(2), pp. 536–543. Available at: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90523-E](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90523-E).
- Kines, R.C. *et al.* (2009) ‘The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), pp. 20458–20463. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908502106>.
- Lang Kuhs, K.A. *et al.* (2022) ‘Genetic variation within the human papillomavirus type 16 genome is associated with oropharyngeal cancer prognosis’, *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 33(6), pp. 638–648. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.03.005>.
- Lechner, M.S. and Laimins, L.A. (1994) ‘Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins’, *Journal of Virology*, 68(7), pp. 4262–4273. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4262-4273.1994>.
- LeConte, B.A. *et al.* (2018) ‘Differences in the viral genome between HPV-positive cervical and oropharyngeal cancer’, *PLOS ONE*, 13(8), p. e0203403. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203403>.
- Lewis, J.S. *et al.* (2021) ‘Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Morphology and Subtypes by Human Papillomavirus Type and by 16 Lineages and Sublineages’, *Head and Neck Pathology*, 15(4), pp. 1089–1098. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12105-021-01318-4>.
- Li, N. *et al.* (2011) ‘Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication’, *International Journal of Cancer*, 128(4), pp. 927–935. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>.
- Li, Z. *et al.* (2023) ‘Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a positivity in vulvar cancer and vulvar intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis’, *The Lancet. Oncology*, 24(4), pp. 403–414. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00066-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00066-9).
- Lou, H. *et al.* (2022) ‘HPV16 E7 Nucleotide Variants Found in Cancer-Free Subjects Affect E7 Protein Expression and Transformation’, *Cancers*, 14(19), p. 4895. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14194895>.
- de Martel, C. *et al.* (2017) ‘Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type’, *International Journal of Cancer*, 141(4), pp. 664–670. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.30716>.
- *McBride, A.A. (2022) ‘Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions’, *Nature Reviews. Microbiology*, 20(2), pp. 95–108. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00617-5>.

- McIntosh, P.B. *et al.* (2010) 'E1^{E4}-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium', *Journal of Cell Science*, 123(16), pp. 2810–2822. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.061978>.
- Mehanna, H. *et al.* (2013) 'Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region', *Head & Neck*, 35(5), pp. 747–755. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.22015>.
- Mirabello, L. *et al.* (2016) 'HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108(9), p. djw100. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djw100>.
- Mirabello, L. *et al.* (2017) 'HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis', *CELL*, 170(6), pp. 1164–1174. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.001>.
- Mirabello, L. *et al.* (2018) 'The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis', *Viruses*, 10(2), p. 80. Available at: <https://doi.org/10.3390/v10020080>.
- *Moody, C. (2017) 'Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes', *Viruses*, 9(9), p. 261. Available at: <https://doi.org/10.3390/v9090261>.
- Moody, C.A. and Laimins, L.A. (2009) 'Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation', *PLoS Pathogens*, 5(10), p. e1000605. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000605>.
- Muñoz, N. *et al.* (2003) 'Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer', *The New England Journal of Medicine*, 348(6), pp. 518–527. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.
- Niccoli, S. *et al.* (2012) 'The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes', *Journal of Virology*, 86(22), pp. 12384–12396. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01512-12>.
- Nicolás-Párraga, S. *et al.* (2016) 'HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus', *Cancer Medicine*, 5(10), pp. 2909–2919. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.870>.
- Nicolás-Párraga, S. *et al.* (2017) 'Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma', *International Journal of Cancer*, 140(9), pp. 2092–2100. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.30636>.
- Nishimura, A. *et al.* (2000) 'Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition', *Journal of Virology*, 74(8), pp. 3752–3760. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.8.3752-3760.2000>.

- Oh, S.T., Kyo, S. and Laimins, L.A. (2001) ‘Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites’, *Journal of Virology*, 75(12), pp. 5559–5566. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001>.
- Olesen, T.B. *et al.* (2019) ‘Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis’, *The Lancet. Oncology*, 20(1), pp. 145–158. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30682-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30682-X).
- *Pešut, E. *et al.* (2021) ‘Human Papillomaviruses-Associated Cancers: An Update of Current Knowledge’, *Viruses*, 13(11), p. 2234. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13112234>.
- Phelps, W.C. and Howley, P.M. (1987) ‘Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product’, *Journal of Virology*, 61(5), pp. 1630–1638. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1630-1638.1987>.
- Romanczuk, H., Thierry, F. and Howley, P.M. (1990) ‘Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters’, *Journal of Virology*, 64(6), pp. 2849–2859. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.64.6.2849-2859.1990>.
- Sanjosé, S. de *et al.* (2013) ‘Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva’, *European Journal of Cancer*, 49(16), pp. 3450–3461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.033>.
- 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. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8).
- Scheffner, M. *et al.* (1993) ‘The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53’, *Cell*, 75(3), pp. 495–505. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3).
- Schiffman, M. *et al.* (2007) ‘A 2-Year Prospective Study of Human Papillomavirus Persistence among Women with a Cytological Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion’, *The Journal of Infectious Diseases*, 195(11), pp. 1582–1589. Available at: <https://doi.org/10.1086/516784>.
- Sedman, T., Sedman, J. and Stenlund, A. (1997) ‘Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus’, *Journal of Virology*, 71(4), pp. 2887–2896. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2887-2896.1997>.
- Sichero, L., Sobrinho, J.S. and Villa, L.L. (2012) ‘Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants’, *Virology*, 432(1), pp. 127–132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.011>.
- Stein, A.P. *et al.* (2015) ‘Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review’, *The Cancer Journal*, 21(3), p. 138. Available at: <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000115>.

- Stubenrauch, F. *et al.* (2000) ‘The E8^{E2C} Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes’, *Journal of Virology*, 74(3), pp. 1178–1186. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1178-1186.2000>.
- Stubenrauch, F. *et al.* (2007) ‘The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins’, *International Journal of Cancer*, 121(10), pp. 2284–2292. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.22907>.
- Sung, H. *et al.* (2021) ‘Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Togtema, M. *et al.* (2015) ‘The human papillomavirus 16 European-T350G E6 variant can immortalize but not transform keratinocytes in the absence of E7’, *Virology*, 485, pp. 274–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.07.025>.
- *Tomaic, V. (2016) ‘Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites’, *Cancers*, 8(10), p. 95. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>.
- Totaro, M.E. *et al.* (2022) ‘Genetic variation in the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 in northeastern Argentina’, *Journal of Medical Virology*, 94(2), pp. 745–751. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.27359>.
- Ustav, M. and Stenlund, A. (1991) ‘Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames.’, *The EMBO Journal*, 10(2), pp. 449–457.
- *Van Doorslaer, K. *et al.* (2018) ‘ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae’, *Journal of General Virology*, 99(8), pp. 989–990. Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>.
- Veldman, T. *et al.* (2003) ‘Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate *in vivo* and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter’, *PNAS*, 100(14), pp. 8211–8216. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1435900100>.
- de Villiers, E.-M. *et al.* (2004) ‘Classification of papillomaviruses’, *Virology*, 324(1), pp. 17–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- Walboomers, J.M.M. *et al.* (1999) ‘Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide’, *The Journal of Pathology*, 189(1), pp. 12–19. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).
- Wang, Q. *et al.* (2004) ‘Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1 Δ E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization’, *Journal of Virology*, 78(2), pp. 821–833. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.821-833.2004>.

- Warren, C.J. *et al.* (2015) ‘Role of the host restriction factor APOBEC3 on papillomavirus evolution’, *Virus Evolution*, 1(1), p. vev015. Available at: <https://doi.org/10.1093/ve/vev015>.
- *Warren, C.J. *et al.* (2017) ‘Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression’, *Viruses*, 9(8), p. 233. Available at: <https://doi.org/10.3390/v9080233>.
- Wheeler, C.M. *et al.* (2006) ‘Human Papillomavirus Genotypes and the Cumulative 2-Year Risk of Cervical Precancer’, *The Journal of Infectious Diseases*, 194(9), pp. 1291–1299. Available at: <https://doi.org/10.1086/507909>.
- White, E.A. *et al.* (2012) ‘Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity’, *Journal of Virology*, 86(24), pp. 13174–13186. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02172-12>.
- Yamada, T. *et al.* (1995) ‘Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments.’, *Journal of Virology*, 69(12), pp. 7743–7753.
- *Young, D. *et al.* (2015) ‘Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV)’, *Oral Oncology*, 51(8), pp. 727–730. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.03.015>.
- *Yu, L., Majerciak, V. and Zheng, Z.-M. (2022) ‘HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation’, *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(9), p. 4943. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23094943>.
- Zhu, B. *et al.* (2020) ‘Mutations in the HPV16 genome induced by APOBEC3 are associated with viral clearance’, *Nature Communications*, 11(1), p. 886. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14730-1>.
- 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. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6209-6219.1999>.

Internetové zdroje

International Human Papillomavirus Reference Center. (n.d.). Online. Available at:

https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones (Accessed: 07-08-2024)

PaVE. (n.d.). Online. Available at:

https://pave.niaid.nih.gov/explore/variants/variant_nomenclature (Accessed: 07-08-2024)