

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Nádory hlavy a krku asociované s infekcí lidským papilomavirem

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Karolina Bolková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí, Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D, za odborné vedení, cenné rady, připomínky a věnovaný čas při vypracování mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Ondřeji Bouškovi za jeho čas, pomoc, ochotu a rady s vypracováním experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolina Bolková
Název práce	Nádory hlavy a krku asociované s infekcí lidským papilomavirem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Počet případů nádorů hlavy a krku poslední dobou vzrůstá i u jedinců, kteří nepatří do rizikové kategorie. Ačkoli hlavní příčinou vzniku zůstává konzumace alkoholu a kouření nebo žvýkání tabákových výrobků, svůj podíl však nesou i jiné rizikové faktory, jakým je infekce lidským papilomavirem, který je spojován především s karcinomem děložního hrdla. Cílem této bakalářské práce je validovat možnost detekce vysoce rizikového lidského papilomaviru typu 16 ve vzorcích výplachu ústní dutiny, získaných pomocí kloktání, technikou real-time polymerasové řetězové reakce. Metoda byla validována na simulovaných vzorcích (za použití linií CaSki a SiHa). Odběr kloktáním s následnou detekcí pomocí polymerasové řetězové reakce se ukazuje jako velmi vhodný pro detekci přítomnosti lidského papilomaviru. U 100 patientských vzorků nebyla přítomnost lidského papilomaviru typu 16 potvrzena. Tyto výsledky ukazují, že u běžné populace bez podezření na nádor v oblasti hlavy a krku je prevalence infekce lidským papilomavirem velmi malá.

Klíčová slova	lidský papilomavirus, HPV16, nádory hlavy a krku, GARGTEST, real-time PCR
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karolina Bolková
Title	Head and neck cancer associated with human papillomavirus
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The number of cases of head and neck tumors has recently increased even in individuals who do not belong to the risk category. Although alcohol consumption and smoking or chewing tobacco products remain the main cause, other risk factors, such as human papillomavirus infection, which is mainly associated with cervical carcinoma, also play a role. The objective of this bachelor thesis is to validate the possibility of detecting high-risk human papillomavirus type 16 in oral lavage samples obtained by gargling using real-time polymerase chain reaction. The method was validated on simulated samples (using CaSki and SiHa cell lines). Collection by gargling followed by polymerase chain reaction detection has been shown to be very appropriate for detecting the presence of human papillomavirus. The presence of human papillomavirus type 16 was not confirmed in 100 patient samples. These results show that the prevalence of human papillomavirus infection is very low in the general population without suspected head and neck cancer.

Keywords	human papillomavirus, HPV16, head and neck tumours, GARGTEST, real-time PCR
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Lidský papilomavirus	2
2.1.1	Charakteristika lidského papilomaviru	2
2.1.2	Protein E1	3
2.1.3	Protein E2	3
2.1.4	Protein E4	4
2.1.5	Protein E5	5
2.1.6	Protein E6	5
2.1.7	Protein E7	6
2.1.8	Proteiny L1 a L2	6
2.2	Životní cyklus lidského papilomaviru	8
2.2.1	Přenos infekce	8
2.2.2	Vstup do buňky	8
2.2.3	Počáteční fáze životního cyklu	10
2.2.4	Produktivní fáze životního cyklu	10
2.2.5	Pozdní fáze životního cyklu	10
2.2.6	Integrace genomu viru do genomu hostitele	12
2.3	Nádory hlavy a krku	13
2.3.1	Anatomické lokalizace nádorů hlavy a krku	13
2.3.2	Nově zavedené klasifikace	14
2.3.3	Nádory hlavy a krku asociované s HPV	15
2.3.4	Rozdíly mezi HPV-pozitivními a HPV-negativními nádory hlavy a krku	16
2.4	Metody detekce lidského papilomaviru	18
2.4.1	Polymerasová řetězová reakce	18
2.4.2	Imunohistochemické barvení proteinu p16	19
2.4.3	<i>In situ</i> hybridizace	20
2.4.4	Southern blot	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Materiál	22
3.1.1	Biologický materiál	22
3.1.2	Použité chemikálie	22
3.1.3	Použité roztoky	23
3.1.4	Použité přístroje	24

3.1.5	Ostatní pomůcky	24
3.2	Metody.....	26
3.2.1	Příprava biologického materiálu pro izolaci nukleových kyselin.....	26
3.2.2	Izolace nukleových kyselin pomocí Zybionucleic Acid Extraction Kitu (Magnetic Bead Method)	28
3.2.3	Izolace nukleových kyselin pomocí QIAamp® DSP Virus Spin Kitu	30
3.2.4	Real-time PCR pro detekci genu <i>E6 HPV16</i> a <i>GAPDH</i>	33
4	VÝSLEDKY	36
4.1	Stanovení přítomnosti HPV po izolaci nukleových kyselin pomocí Zybionucleic Acid Extraction Kitu v simulovaných vzorcích.....	36
4.2	Stanovení přítomnosti HPV po izolaci nukleových kyselin pomocí QIAamp DSP Virus Spin Kitu v simulovaných vzorcích.....	38
4.3	Stanovení přítomnosti HPV v patientských vzorcích.....	40
5	DISKUSE.....	43
6	ZÁVĚR	46
7	LITERATURA.....	47

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Zpracování literární rešerše zaměřené na téma:

- Popis struktury genomu lidského papilomaviru a funkce jeho proteinů
- Životní cyklus lidského papilomaviru a karcinogeneze
- Nádory hlavy a krku a jejich asociace s lidským papilomavirem
- Metody detekce lidského papilomaviru

Praktická část

- Zvládnutí laboratorních technik izolace nukleových kyselin dvěma rozdílnými metodami
- Zvládnutí techniky real-time PCR použitelné pro detekci lidského papilomaviru
- Otestování patientských vzorků na přítomnost lidského papilomaviru

1 ÚVOD

Lidský papilomavirus (HPV) je virus schopný napadat keratinocyty epiteliální tkáň kůže a sliznic člověka. V některých případech může dojít k tvorbě nezhoubných útvarů (při infekci níže rizikovými genotypy HPV) nebo k rozvoji přednádorových změn či nádorového onemocnění (vysoce rizikové genotypy HPV). Infekce vysocí rizikovými typy HPV je nejčastěji spojována s nádory děložního hrdla, kde byla prokázána kauzální souvislost, ve více než 99 % karcinomů je přítomna HPV infekce, nejčastěji typem HPV16 (Cottage *et al.*, 2001). HPV je však spjato s celou řadou nádorů, jako jsou nádory hlavy a krku, jejichž incidence je přibližně 600 000 případů ročně a celosvětově jsou šestým nejčastějším karcinomem. I když jsou hlavními rizikovými faktory dlouhodobé vystavování alkoholu a tabákovým výrobkům, byla infekce HPV taktéž prokázána jako rizikový faktor pro rozvoj nádorového onemocnění v oblasti hlavy a krku a případů, kde je HPV skutečnou příčinou, stoupá. Pro prognózu karcinomů hlavy a krku je pak velmi důležité detekovat přítomnosti či nepřítomnosti HPV (Keck *et al.*, 2015).

V této bakalářské práci byly otestovány patientské vzorky na přítomnost vysocí rizikového HPV16 metodou real-time PCR. Tyto vzorky byly odebrány od pacientů kloktáním pomocí odběrové sady GARGTEST, o které se uvažuje jako o technice, jenž by se mohla využívat v běžné praxi při odebírání biologického materiálu pro následnou detekci HPV. V současnosti se touto metodou odebírají patientské vzorky pro testování na přítomnost viru SARS-CoV-2. Pro optimalizaci metody detekce byly testovány dvě odlišné metody izolace nukleových kyselin ze simulovaných vzorků s následnou real-time PCR analýzou.

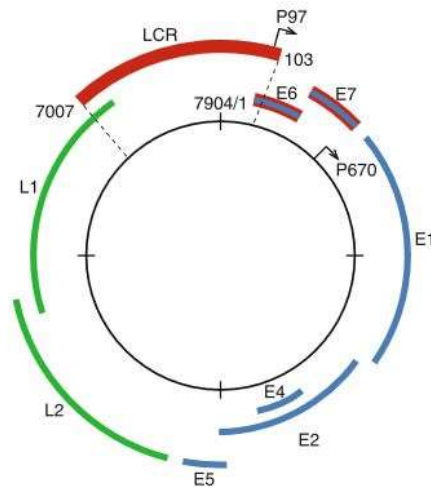
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Lidský papilomavirus

2.1.1 Charakteristika lidského papilomaviru

Lidské papilomaviry (HPV) patří mezi neobalené viry (Handisurya *et al.*, 2009), jejichž nukleovou kyselinou je cirkulární dvouvláknová DNA spojená s proteiny, které jsou podobné histonu (Araldi *et al.*, 2018). Viriony mají ikosahedrální tvar (Doorbar, 2006) o průměru 50-55 nm a jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 5000 kDa. Velikost virové DNA je přibližně 8000 bp. Genom viru se dělí na tři oblasti – časná, pozdní a nekódující (Obr. 1). Časná oblast (E) zahrnuje geny kódující proteiny E1, E2, E4, E5, E6 a E7, které souvisí s replikací viru (Araldi *et al.*, 2018). K transkripci těchto genů dochází na promotoru P97 (Doorbar, 2006; Zheng a Baker, 2006). Pozdní oblast (L) obsahuje geny kódující velký L1 a malý L2 strukturní protein kapsidy (Araldi *et al.*, 2018). Ty jsou transkribovány z promotoru P670 (Zheng a Baker, 2006). Nekódující oblast (NCR) nebo také dlouhá kontrolní oblast (LCR), umístěna mezi otevřenými čtecími rámci (ORF) L1 a E6, zahrnuje velkou část regulačních prvků transkripce a replikace, jako je začátek replikace (*Ori*) (Araldi *et al.*, 2018).

HPV mohou infikovat epitel kůže a sliznic (Stanley *et al.*, 2007). Způsobují benigní i maligní nádory (Zheng a Baker, 2006), podle čehož jsou kmeny viru rozděleny na skupiny s nízkým anebo vysokým rizikem transformace lidských buněk (Stanley *et al.*, 2007). Viry s nízkým rizikem (low risk HPV, lrHPV) tedy zapříčiňují vznik nezhoubných lézí a řadí se zde kmeny HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89 (Ref. 1), přičemž nejrozšířenější je typ 6 a 11 (Araldi *et al.*, 2018). Viry s vysokým rizikem (high risk HPV, hrHPV) způsobují zhoubné nádorové bujení a patří zde kmeny HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (Ref. 1), kdy nejčastěji vyskytujícími se typy jsou 16, 18, 31, 33 a 45 (Araldi *et al.*, 2018). Kmeny HPV jsou klasifikovány podle lišících se sekvencí genu, který kóduje velký kapsidový protein L1 (de Villiers *et al.*, 2004).



Obrázek 1 Schéma genomu lidského papilomaviru typu 16 (Rautava a Syrjänen, 2012)

2.1.2 Protein E1

Protein E1 má molekulovou hmotnost 68 kDa. Je kódován ORF genu *E1*, což je u papilomavirů druhou nejvíce konzervovanou sekvencí. Má podstatnou funkci v replikaci virové DNA (Araldi *et al.*, 2018) a je také jediným proteinem viru, který má enzymatickou aktivitu (Castro-Muñoz *et al.*, 2019). Tento protein se skládá ze tří domén: N-terminální, centrální a C-terminální (Araldi *et al.*, 2018). N-terminální doména nese sekvenci pro jadernou lokalizaci a jaderný exportní signál. C-terminální doména má helikasovou/ATPasovou aktivitu a také obsahuje sekvence podílející se na oligomerizaci proteinu (Castro-Muñoz *et al.*, 2019). Centrální doménou se protein E1 váže s proteinem E2, vytváří komplex E1-E2 (Araldi *et al.*, 2018) a v tomto komplexu se pak pomocí DNA-vazebných domén váží na počátek replikace *Ori* virové DNA. Postupně dochází k tvorbě dvojitých hexamerů E1, které fungují jako helikasa rozvíjící vlákna DNA. V této fázi díky interakci s E1 dochází k vazbě dalších enzymů, potřebných pro replikaci, do místa *Ori*. Takovými enzymy jsou topoisomerasa I, DNA polymerasa α a replikační protein A (Schuck *et al.*, 2015).

2.1.3 Protein E2

Protein E2 má molekulovou hmotnost 48 kDa. Je kódován ORF stejnojmenného genu a tak jako protein E1, je podstatný pro replikaci virové DNA. Tento protein obsahuje dvě domény: N-terminální transaktivační a C-terminální. Kromě iniciace replikace tvorbou komplexu E1-E2, má také funkci regulátoru transkripce ORF *E6* a *E7*. Pokud se E2 vyskytuje ve vyšším množství, váže se na sekvenci promotoru P97 v LCR. Takto se na promotor P97 nemůže navázat RNA polymerasa II a exprese *E6* a *E7* je tak potlačena.

Jestliže se E2 vyskytuje v malém množství, váží se na něj transkripční faktory potřebné pro replikaci (Araldi *et al.*, 2018).

Při integraci virového genomu do genomu hostitele u karcinomů děložního hrdla často dochází k disrupci genu *E2* (Collins *et al.*, 2009) a ztrátě proteinu E2. U buněk, ve kterých je gen *E2* narušen, je větší pravděpodobnost, že dojde k vývoji v nádor a méně pravděpodobně u takových buněk proběhne apoptosa (Sanchez-Perez *et al.*, 1997). Naopak přítomnost proteinu E2 může mít pro vývoj nádoru supresorovou funkci. To bylo potvrzeno u buněčných linií karcinomu děložního hrdla, které neexprimovaly virový protein E2. Po přidání proteinu E2 k těmto buněčným liniím došlo k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi prostřednictvím represe endogenní exprese *E6* a *E7* (Bellanger *et al.*, 2011).

2.1.4 Protein E4

mRNA u HPV je často polycistronická a zahrnuje více než jeden ORF, jako je tomu u proteinu E4. Ten bývá označován i jako pozdní protein E1^{E4}. Jeho prvních pět aminokyselin pochází z ORF *E1*, ostatní pak z ORF *E4*. Z HPV proteinů je tento nejvíce exprimovaným a také prvním exprimujícím se pozdním proteinem (Tsakogiannis *et al.*, 2012). K jeho expresi dochází před L1 a L2 (McIntosh *et al.*, 2010; Doorbar, 2013) v celém epitelu, avšak akumuluje se ve svrchních vrstvách (McIntosh *et al.*, 2010). Nadměrná exprese tohoto proteinu může vést k zástavě buněčného cyklu v G2 fázi (Tsakogiannis *et al.*, 2012).

E4 má také funkci při zrání virionů (Roberts *et al.*, 1993). Reorganizuje a zastavuje dynamiku keratinové sítě intermediárních filament keratinocytů. Intermediární filamenta slouží především k mechanické opoře buňky a jsou schopna přestavení např. při mitose. K jejich reorganizaci dochází vazbou proteinu E1^{E4} na keratin prostřednictvím N-terminálního motivu, který je bohatý na leucin, a následnou multimerizací proteinu, díky C-terminální doméně E1^{E4}. Při takovém stresu buňky mohou být sítě keratinových intermediárních filament cílem fosfatasy nebo kinas např. SAPK. To vede k hyperfosforylaci, ubikvitinilaci a následné degradaci keratinu v proteazomu, což poškozuje stabilitu sítě. Dochází k narušení polymerizace keratinových vláken a tím ke křehkosti epidermis indukující narušení celistvosti epitelu, což usnadňuje uvolňování zralých virionů (McIntosh *et al.*, 2010).

2.1.5 Protein E5

Protein E5 je hydrofobní protein (Araldi *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2001). Liší se svou molekulovou hmotností u jednotlivých typů viru, kdy u HPV16 dosahuje 9,4 kDa, zatímco u HPV18 8,3 kDa (Araldi *et al.*, 2018). Je lokalizován na buněčné membráně (Chang *et al.*, 2001), ale vyskytuje se i v Golgiho aparátu, endoplasmatickém retikulu (Araldi *et al.*, 2018) a jaderné membráně. Jeho přítomnost však není nezbytně nutná pro maligní přeměnu buňky, protože ne všechny nádory obsahují protein E5 nebo jeho gen. Při integraci genomu viru do genomu hostitelské buňky často dochází i k delecí genu *E5*.

Protein E5 se může vázat na 16 kDa podjednotku protonové pumpy ATPasy umístěné v membráně endosomu (Tsai a Chen, 2003). Tím je inhibováno snížení pH v endosomu a degradace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Straight *et al.*, 1995). Více molekul receptoru tak zůstává v aktivní podobě a buňka pokračuje v proliferaci. Aktivaci EGFR je iniciována signální kaskáda, která vede k nadměrné expresi onkogenů a podporují rychlý růst buňky. E5 také může inhibovat expresi genu *p21*, který slouží jako nádorový supresor (Tsai a Chen, 2003).

2.1.6 Protein E6

Protein E6 je přibližně 150 aminokyselin dlouhý polypeptid (Mantovani a Banks, 2001), (Thomas *et al.*, 1999) o molekulové hmotnosti 18 kDa. Typickým znakem jsou čtyři motivy Cys-X-X-Cys, které jsou konzervovány v proteinu E6 u celé rodiny HPV, a díky nimž je umožněna tvorba dvou zinkových prstů (Thomas *et al.*, 1999). Společně s proteinem E7 vysoce rizikových typů HPV se podílí na indukci imortalizace primárních lidských keratinocytů a je spojen s maligní přeměnou infikované buňky (Scheffner *et al.*, 1990). Pravděpodobně nejdůležitější funkcí E6 je interakce s proteinem p53. Ten funguje jako nádorový supresor, podporuje zástavu buněčného cyklu a apoptosu. Proteiny E6 hrHPV indukují degradaci p53 tak, že se váží na E6AP a vytváří stabilní komplex E6-E6AP. E6AP je ubikvitin ligasa, přičemž vazbou proteinu E6 je pozměněna substrátová specifita E6AP právě na protein p53. Celý komplex je následně určen k degradaci v proteazomu (Mantovani a Banks, 2001).

U onkogenních typů HPV je další funkcí proteinu E6 aktivace promotoru hTERT. Je tedy zvýšena transkripce tohoto genu, který kóduje telomerasovou reverzní transkriptasu (Veldman *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Doorslaer a Burk, 2012), potřebnou pro zachování telomerických struktur na koncích chromosomů. Prodloužení telomer (telomerasová aktivita) se vyskytuje ve více než 90 % případů imortalizovaných

nádorových buněk (Veldman *et al.*, 2001), v malé míře i u normálních kmenových buněk (Liu *et al.*, 2009) a jde o důležitý krok vedoucí k maligní transformaci a immortalizaci primárních lidských keratinocytů (Veldman *et al.*, 2001). Mimo jiné protein E6 může interagovat s řadou dalších proteinů, které přispívají k rozvoji nádorového onemocnění prostřednictvím regulace diferenciacce, proliferace buňky, apoptosy, transkripce genů či chromozomové stability (Liu *et al.*, 2009).

2.1.7 Protein E7

Protein E7 je polypeptid o přibližně 100 aminokyselinách (Avvakumov *et al.*, 2003; McLaughlin-Drubin a Münger, 2009). Společně s proteinem E6 se u hrHPV podílí na maligní transformaci buněk (Scheffner *et al.*, 1990; Yim a Park, 2005). V CR2 doméně proteinu E7 se nachází konzervovaný motiv Leu-X-Cys-X-Glu (LXCX), který je důležitý pro vazbu E7 na pRb. pRb je retinoblastomový protein, fungující jako nádorový supresor (McLaughlin-Drubin a Münger, 2009). E7 se váže na pRb v místě zvaném „pocket“ doména, která v normálních buňkách váže transkripční faktory rodiny E2F a potlačuje expresi genů, které kódují replikační enzymy. Interakcí s E7 dojde k zabránění vazby E2F na pRb (Jim a Park, 2005). E2F jsou uvolněny v transkripčně aktivní formě, čímž je ovlivněn přechod z G1 do S fáze a z G2 do M fáze buněčného cyklu (Avvakumov *et al.*, 2003; Jim a Park, 2005) a je podporována replikace a dělení buňky.

Protein E7 je schopný ovlivňovat proliferaci buňky i jinými způsoby. Příkladem může být interakce s inhibitory cdk (CKI) p21 a p27 (Jim a Park, 2005). Za normálních podmínek v průběhu buněčné diferenciacce keratinocytů, hladiny těchto CKI rostou a cílí na cdk2, což vyústí v zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Jones *et al.*, 1997; McLaughlin-Drubin a Münger, 2009). V infikovaných buňkách se E7 váže na p21 a ruší tak inhibici cdk2, která by byla za normálních podmínek inhibována vazbou s p21 (Jones *et al.*, 1997), ale zůstává aktivní. E7 může interagovat i přímo s cdk2 nebo cykliny A a E, což jsou pozitivní regulační podjednotky cdk2, a aktivita cdk2 je tak podporována (McLaughlin-Drubin a Münger, 2009).

2.1.8 Proteiny L1 a L2

Proteiny L1 a L2 vytvářejí virovou kapsidu (Finnen *et al.*, 2003) a hrají důležitou úlohu při virové infekci a skládání virionů. Jsou exprimovány později, a proto jsou detekovatelné v již diferencovaných epitelálních vrstvách (Buck *et al.*, 2013).

Kapsida viru má ikosahedrální tvar a je tvořena 360 kopiemi hlavního kapsidového proteinu L1, poskládaného do 72 pentamerických kapsomer (Finnen *et al.*, 2003), které jsou spojeny disulfidickými vazbami (Buck *et al.*, 2013). Pět monomerů L1 je obsaženo v každé kapsomeře. Hlavní kapsidový protein L1 o 55 kDa se využívá pro fylogenetickou klasifikaci různých typů a podtypů viru, protože je nejkonzervovanější sekvencí genomu (Araldi *et al.*, 2018). Je důležitý při procesu virové infekce, kdy se díky němu váže virion na heparansulfát umístěný v bazální membráně epidermis (Buck *et al.*, 2013).

Minoritní kapsidový protein L2 interaguje s pentamery L1. L2 o přibližně 74 kDa se ve virionu vyskytuje ve 36 kopiích. Je schopen vázat DNA viru a podílí se tak na enkapsidaci. Může se také nacházet na povrchu virionu a vytvářet specifický epitop, který pak interaguje s buněčným receptorem a usnadňuje adsorpci viru (Finnen *et al.*, 2003).

2.2 Životní cyklus lidského papilomaviru

2.2.1 Přenos infekce

Infekce hrHPV se nejčastěji šíří kontaktem sliznic, konkrétněji sexuálním přenosem, ať už jde o penilně-vaginální, penilně-anální či orálně-genitální styk. Byl však potvrzen i nesexuální přenos, kdy u pacientů s genitálními bradavicemi asociovanými s HPV, byly detekovány stejné typy HPV na rukou. Je tedy možné, že by takoví pacienti mohli přenést infekci HPV na své sexuální partnery prostřednictvím kontaktu mezi genitáliemi a rukama. Důkazem ručního přenosu může být i případ dětí trpících anogenitálními bradavicemi. Předpokládá se, že došlo k autoinokulaci z bradavic na jejich vlastních rukou nebo se infikovaly od blízkých rodinných příslušníků postižených ručními bradavicemi (Sonnex *et al.*, 1999).

Infekce HPV může být pravděpodobně přenášena i vertikálně. Sekvence DNA HPV byly totiž detekovány v mateřském mléce, plodové vodě, placentě, krvi z pupečníku a ústní dutině novorozenců. Sekvence HPV DNA byly identifikovány i ve spermiích, kdy HPV pravděpodobně způsobuje neplodnost, protože může ovlivňovat pohyblivost spermií. HPV nejspíše může být i příčinou spontánního potratu, který je způsobený poškozením genomu trofoblastických buněk působením proteinů E6 a E7 HPV16 (Araldi *et al.*, 2018).

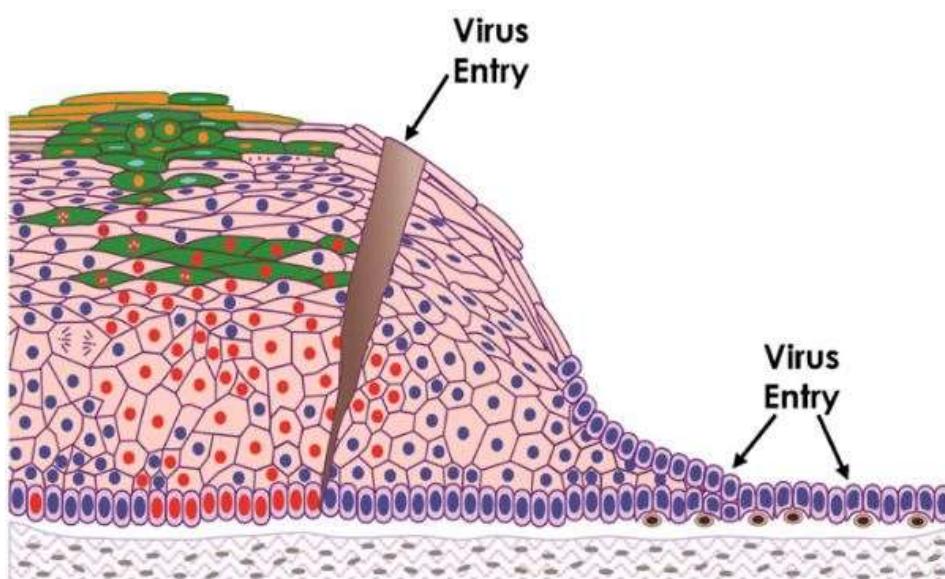
Vertikální přenos HPV infekce potvrzuje i fakt, že děti žen, které během těhotenství trpěly genitálními bradavicemi, mají velké riziko vzniku laryngeálních papilomů. S respiračními papilomy bývají často spojovány typy HPV16 a 11, přičemž se projeví do 4 let u 4 dětí ze 100 000 a 5 % respiračních papilomů spojených s HPV16 se může dokonce rozvinout v nádorové onemocnění (Gillison *et al.*, 2012; Araldi *et al.*, 2018).

2.2.2 Vstup do buňky

V počáteční fázi životního cyklu HPV je napadena hostitelská buňka. Aby došlo k infekci, je nutné, aby se infekční virové částice dostaly k bazální vrstvě keratinocytů epitelální tkáň. Přístup k těmto buňkám je zajištěn prostřednictvím tkáňových lézí nebo i nepatrných mikroporanění tkáň (Doorbar, 2005) (Obr. 2). Vstup virionu do hostitelské buňky začíná vazbou virového proteinu L1 na heparansulfát proteoglykan (HSPG) (Horvath *et al.*, 2010). HSPG jsou molekuly, které se vyskytují připojené k různým proteinům na buněčném povrchu nebo v extracelulární matrix (ECM) a mnoho patogenů včetně virů je využívá k vazbě na povrch buněk (Cagno *et al.*, 2019). Ačkoli jsou HSPG častým vazebným místem, jako receptory pro HPV mohou sloužit i jiné molekuly, jako je laminin-5 lokalizovaný v ECM.

Interakcí proteinu L1 a HSPG dochází ke konformační změně kapsidy, vedoucí k vystavení N-terminální oblasti proteinu L2, která je štěpena furinem. Následuje druhá konformační změna kapsidy viru a dojde k vystavení vazebného místa pro sekundární receptor nebo se sníží afinita k primárnímu receptoru. Tím je potom umožněna vazba na sekundární buněčné receptory (Horvath *et al.*, 2010).

Virus je dále transportován do buňky mechanismem endocytosy, která je zprostředkována klathrinem nebo kaveolinem. Po vstupu do buňky se na tyto endocytické struktury váží lysosomy a tvoří se fagolysosomy, organely vzniklé spojením lysosomu a fagosomu. Následně v nich dochází ke snížení pH, čímž je zapříčiněn rozpad kapsidy viru a tím uvolnění genomu (Araldi *et al.*, 2018). Virový episomální genom je poté transportován do jádra prostřednictvím tubulinu (Graham, 2017).



Obrázek 2 Místa vstupu HPV do hostitelské buňky (Doorbar *et al.*, 2012)

2.2.3 Počáteční fáze životního cyklu

Po napadení a vstupu do jádra buňky jsou na nízké úrovni exprimovány virové proteiny E1, E2, E6 a E7 (Doorbar *et al.*, 2012; Graham, 2017). Nejdříve dochází k expresi E1 a E2, neboť musí dojít k replikaci viru (Graham, 2017). Jelikož HPV neexprimuje polymerasy, interakcí časných virových proteinů s buňkou hostitele dochází k vyvolání nástupu buňky do S fáze, a tím také k zisku komponent potřebných k replikaci (Araldi *et al.*, 2018). E2 vytváří komplex s E1 a ten se poté váže na virový počátek replikace. Exprese E2 také reguluje časný promotor pro přímou expresi proteinů E6 a E7. Genom viru je udržován ve formě episomu s malým počtem kopií, přibližně 50 až 100 kopií na buňku v bazální vrstvě (Graham, 2017).

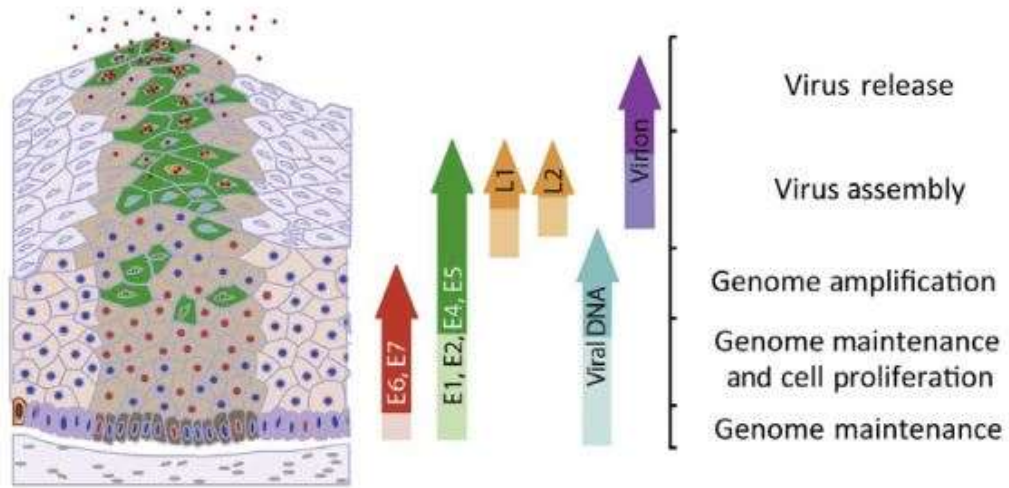
2.2.4 Produktivní fáze životního cyklu

Za normálních podmínek buňky bazální vrstvy dokončí svůj buněčný cyklus, procházejí diferenciací a v průběhu tohoto procesu postupují od bazální vrstvy směrem k povrchu epitelu. V produktivní fázi replikace virového genomu je však tento proces narušen (Doorbar, 2005). Buněčný cyklus infikované buňky je znovu aktivován, díky interakcím virových proteinů, jako je vazba E7 na pRb nebo zabránění apoptosy degradací p53 proteinem E6 (Graham, 2017), a počet kopií virového genomu se tak zvyšuje. U většiny typů HPV hlavní rolí proteinů E6 a E7 není podpora proliferace bazálních buněk, ale spíše stimulace opětovného vstupu do buněčného cyklu za účelem amplifikace genomu (Doorbar *et al.*, 2012). Mimo E6 a E7 jsou exprimovány i ostatní časné virové proteiny, aby byl virový epizom udržen při malém počtu kopií (Doorbar, 2005).

2.2.5 Pozdní fáze životního cyklu

V poslední fázi životního cyklu HPV, která probíhá ve vrchních vrstvách epitelu, dochází k produkci infekčních virionů (Doorbar *et al.*, 2012; Graham, 2017). Po amplifikaci virového genomu buňka vystoupí z buněčného cyklu a exprimují se kapsidové proteiny nutné pro zabalení genomu (Doorbar *et al.*, 2012). Nejprve dochází k expresi proteinů E4, poté L2 a následně L1 (Graham, 2017). Důležitou funkcí E4 je narušení struktury keratinových vláken, což způsobí, že se buňka stane křehčí a náchylnější k uvolnění virionů (Doorbar *et al.*, 2012; Graham, 2017). L2 je importován do jádra (Graham, 2017) a akumulován v jaderných strukturách, tzv. PML tělískách (Doorbar, 2005). Zde se po syntéze lokalizují i virové genomy (Graham, 2017) a L2 zde rekrutuje i proteiny L1 (Doorbar, 2005). Ty se nejprve v cytoplasmě samostatně sestavují v pentamerní kapsomery a poté jsou transportovány do jádra. L2 se

pravděpodobně zabudovává do středu kapsomer (Graham, 2017). Jakmile dojde k enkapsulaci genomu a infikované buňky dosáhnou povrchu epitelu, jsou viriony uvolněny ven (Doorbar, 2005) (Obr. 3).



Obrázek 3 Znázornění exprese virových proteinů v určitých fázích životního cyklu HPV (Doorbar *et al.*, 2020)

2.2.6 Integrace genomu viru do genomu hostitele

Integrace genomu HPV do genomu hostitele je hnací silou onkogeneze (McBride *et al.*, 2017), ale není součástí normálního životního cyklu viru (Senapati *et al.*, 2016). Pro virus se jedná spíše o slepou uličku, protože integrací ztrácí schopnost vytvořit genom, který by se zabalený mohl přenést do nového hostitele (McBride *et al.*, 2017). Místa integrace jsou lokalizována v celém lidském genomu a charakterizují je oblasti, kde nedochází k opravám zlomů dvouvláknové DNA. Takové poškození může být indukováno např. reaktivními formami kyslíku či proteiny HPV.

Integrací není ovlivněn jen hostitelský genom, protože jsou při ní narušeny rovněž virové geny *E1*, *E2*, *E5* a *L2*. Následně se nadměrně exprimují geny pro proteiny E6 a E7. To vede k deregulaci buněčného cyklu a zvýšené genomické nestabilitě hostitele. Integrace tedy ovlivňuje genom hostitele nejen amplifikací onkogenů a narušením tumor supresorových genů, ale také řízením chromozomálních přesmyků jako delece, translokace a inverze, které se objevují v oblastech genomu blízko integračních míst.

Existují dvě možnosti integrace. V prvním případě je integrována jedna kopie virového genomu. Ve druhém je do hostitelského chromosomu integrován virový genom ve formě konkatameru (Senapati *et al.*, 2016). I když je integrace genomu častá u nádorů asociovaných s HPV, není to pravidlem. DNA HPV se může vyskytovat ve formě integrované, episomální či v kombinaci těchto dvou případů. HPV v integrované formě se často nacházejí u premaligních lézí a řadě anogenitálních a orofaryngeálních nádorů. U karcinomů děložního hrdla pozitivních na HPV dochází k integraci u více než 80 % případů. U HPV-pozitivních orofaryngeálních spinocelulárních karcinomů je procento integrace nižší, virová DNA se vyskytuje v episomální nebo kombinované formě (McBride *et al.*, 2017).

2.3 Nádory hlavy a krku

2.3.1 Anatomické lokalizace nádorů hlavy a krku

TNM je jedním z mezinárodních klasifikačních systémů v onkologii, který vznikl v polovině 20. století. U nádorů popisuje jejich anatomický rozsah prostřednictvím tří hodnot T, N a M. T určuje rozsah v místě primárního nádoru (T = tumor) (Ref. 2), N určuje nepřítomnost nebo přítomnost a případný rozsah metastáz v oblastech regionálních lymfatických uzlin (N = lymph nodes) a M určuje nepřítomnost nebo přítomnost metastáz (Brierley *et al.* 2017) vzdáleného orgánového postižení (M = metastasis). Podle těchto tří hodnot je následně stanoven celkový rozsah a klinické stádium nádoru. Klasifikační systém TNM je důležitý pro správnou klasifikaci, výběr léčby a odhad prognóz, výzkum, epidemiologii (Ref. 2) a kontrolu aktivity rakoviny (Huang a O'Sullivan, 2017). Je využíván lékaři, vědci a jinými odborníky (Ref. 2) a je pravidelně aktualizován (Huang a O'Sullivan, 2017).

Nádory hlavy a krku podle 8. vydání klasifikace TNM zahrnují tyto anatomické lokalizace a sublokalizace (Tab. 1):

Tabulka 1 Anatomické lokalizace a sublokalizace nádorů hlavy a krku podle 8. vydání TNM

Ret	zevní horní ret	
	zevní dolní ret	
	ústní koutky	
Dutina ústní	sliznice dutiny ústní	
	horní alveolární hřeben a dásěň	
	dolní alveolární hřeben a dásěň	
	tvrdé patro	
	jazyk	
	spodina dutiny ústní	
Hltan	orofarynx	přední stěna (glosso-epiglotická oblast)
		boční stěna
		zadní stěna
		horní stěna
	nazofarynx	strop a zadní stěna
		boční stěna
		spodní stěna
	hypofarynx	přechod hltanu v jícn
		sinus piriformis
zadní stěna hypofaryngu		
Hrtan	supraglottis	
	glottis	
	subglottis	
Dutina nosní a dutiny paranazální	dutina nosní	
	dutina čelistní	

Tabulka 1 Anatomické lokalizace a sublokalizace nádorů hlavy a krku podle 8. vydání TNM (pokračování)

	dutiny čichové
Karcinom neznámé primární lokalizace - krční uzliny	
Maligní melanom horního oddílu dýchacího a trávicího traktu	
Velké slinné žlázy	glandula parotis (příušní žláza)
	glandula submandibularis (podčelistní žláza)
	glandula sublingualis (podjazyková žláza)
Štítná žláza	

2.3.2 Nově zavedené klasifikace

V posledním 8. vydání klasifikačního systému TNM byla zavedena nová klasifikace pro orofaryngeální karcinom pozitivní na p16. Cílem bylo dosáhnout správného popisu charakteru a prognózy nemoci. Mezi HPV asociovanými/neasociovanými orofaryngeálními nádory je rozdíl v biologické podstatě nemoci, odlišný etiologický molekulární proces a prognóza onemocnění. Proto je zavedení této samostatné klasifikace přesnější.

V 8. vydání klasifikace TNM se upřednostňuje jako metoda detekce HPV zástupný marker - imunobarvení proteinu p16. Za alternativní metodu se považuje detekce HPV *in situ* hybridizací (ISH) nebo PCR. ISH nebo PCR by však měly být provedeny, je-li imunobarvení p16 nejednoznačné. Jestliže se přítomnost p16 neprokáže, postupuje se dále podle TNM klasifikace jako v případě orofaryngeálního karcinomu negativního na p16/HPV (Huang a O'Sullivan, 2017).

Další nově zavedenou klasifikací v 8. vydání systému TNM jsou karcinomy krčních uzlin s neznámou primární lokalizací. Jsou specifikovány jako metastázy v lymfatických uzlinách, kdy v začátku léčby je neznámý jejich anatomický původ. Z hlediska nádorů hlavy a krku může tento karcinom představovat až 5 %. Je však možné, že se během léčby objeví asociace s HPV nebo virem Epstein-Barrové (Kennel *et al.*, 2019). Jestliže se potvrdí přítomnost viru Epstein-Barrové, mělo by se dále postupovat podle klasifikace pro nasofarynx. Když je potvrzena přítomnost HPV, postupuje se dále podle klasifikace pro orofarynx pozitivní na HPV/p16 (Ref. 3).

2.3.3 Nádory hlavy a krku asociované s HPV

Karcinomy dlaždicového epitelu v oblasti hlavy a krku zasahují ústní dutinu, hrtan, orofarynx a hypofarynx (Du *et al.*, 2012). Orofaryngeální karcinom patří mezi nejčastější nádory hlavy a krku asociované s HPV. Může postihovat kořen jazyku, hlavně pak tonsily (You *et al.*, 2019), neboť se předpokládá, že epitel v záhybech tonsilárních krypt je senzitivnější k infekci HPV.

Obecně bylo za hlavní příčinu vzniku karcinomu dlaždicových buněk v oblasti hlavy a krku považováno požívání alkoholických nápojů a kouření či žvýkání tabákových výrobků. Při současném působení těchto faktorů se jejich karcinogenní vliv ještě umocní. Typicky se toto onemocnění vyskytuje u starších lidí, častěji pak u mužů. Případů karcinomů orofaryngu však v poslední době, v řádu desetiletí, začalo přibývat i u mladších lidí a žen, kteří nekonzumovali alkohol, nekouřili nebo neměli jiné přidružené choroby a celkově měli dobrý zdravotní stav (Nováková a Laco, 2008). U takovýchto jedinců je až v 72 % případů potvrzena přítomnost hrHPV, hlavně pak HPV16 (Araldi *et al.*, 2018). Riziko vzniku karcinomu je patnáctkrát až padesátkrát zvýšeno v případě infekce HPV v orální oblasti (Mechl a Lovasová, 2010). V letech 1980–2000 došlo k nárůstu prevalence HPV u karcinomu oropharyngu z 16 % na 72 % a epidemiologie ukazuje, že počty se stále každým rokem zvyšují (Araldi *et al.*, 2018). Na vině mohou být, kromě imunosupresivy, změny v sexuálním chování jako orální sex, orálně-anální kontakt, časté střídání sexuálních partnerů nebo dřívější vstup do sexuálního života (Mechl a Lovasová, 2010). Virová infekce se však může šířit kromě sexuálního přenosu i vertikálně a hematologicky (Araldi *et al.*, 2018).

Odhaduje se, že karcinomy hlavy a krku a karcinomy děložního hrdla, způsobené infekcí HPV, v USA zapříčiňují podobný počet úmrtí. Avšak přítomnost HPV infekce u nádorů hlavy a krku je vnímána spíše jako pozitivní, protože u pacientů s tímto typem karcinomu je predikována příznivější prognóza (Nováková a Laco, 2008), často je léčba zahájena v dřívějším stádiu nádoru a celkově bývají pacienti v lepším zdravotním stavu (Mechl a Lovasová, 2010). HPV pozitivní nádory také lépe reagují na léčbu v podobě chirurgického odstranění, chemoterapie nebo chemoradioterapie (Araldi *et al.*, 2018). Vykazují vyšší citlivost k léčbě, protože je u nich zachováno alespoň nějaké množství funkčního proteinu p53. HPV negativní karcinomy jsou pravděpodobně méně citlivé na léčbu z toho důvodu, že disponují větším počtem mutací v genech, které kódují proteiny zúčastňující se regulace buněčného cyklu (Nováková a Laco, 2008). Dalším důvodem lepší odpovědi na léčbu by mohlo být, že hypoxie u HPV pozitivních nádorů hlavy a

krku nezeslabuje účinek radioterapie (Araldi *et al.*, 2018). Při hypoxii dochází k omezení dostupnosti kyslíku. Je typickým znakem solidních nádorů. Podporuje progresi karcinomu a snižuje citlivost na radioterapii, což může být důvodem selhání léčby (Brahimi-Horn *et al.*, 2007). Příznivější prognóza u HPV asociovaných nádorů je dána i menší celkovou mutační zátěží (Taberna *et al.*, 2018).

Chemoradioterapie na bázi cisplatiny je standardním postupem v léčbě mimo pacienty s počátečním stadiem karcinomu orofaryngu. Tato léčba se ukázala jako efektivní, avšak s možnými vedlejšími účinky jako je sucho v ústech či ztráta chuti, ale i poměrně závažnější dysfagie (You *et al.*, 2019). Se současnými léčebnými postupy je však spojena relativně vyšší úmrtnost a vedlejší účinky plynoucí z toxicity. Proto jsou hledány jiné léčebné postupy, u kterých by byla snížena toxicita, avšak zachována úspěšnost vyléčení. Takovou alternativou by mohlo být snížení dávky radioterapie v kombinaci s použitím chemoterapie, cisplatiny nebo bez použití cisplatiny anebo snížení dávky chemoterapie používané po chirurgickém odstranění nádoru. Možností pro potlačení vedlejších účinků cisplatiny je terapie cílená na EGFR, kdy se využívají anti-EGFR látky (Taberna *et al.*, 2018). Takovým příkladem je látka Cetuximab, která má v kombinaci s radioterapií dobré výsledky v léčbě (Araldi *et al.*, 2018). Cetuximab je chimérická monoklonální protilátka (Specenier a Vermorken, 2011), jejíž funkcí je inhibice receptoru epidermálního růstového faktoru, který je důležitý pro nádorovou proliferaci (Mechl a Neuwirthová, 2011). Imunologickou léčbou s využitím látky nivolumab se dosáhlo také podobných výsledků (Araldi *et al.*, 2018). Nivolumab je lidská protilátka ze třídy IgG4, která se váže na T-lymfocyty, konkrétně na receptor na jejich povrchu, protein 1 programované buněčné smrti PD-1, které jsou zodpovědné za inaktivaci T-lymfocytu. Vazbou nivolumabu na receptor dojde k zabránění navázání receptoru na antigen viru PD-L1/PD-L2 a tím by došlo k jeho inaktivaci. T-lymfocyt tak zůstává aktivní v imunitní reakci v neprospěch nádorové buňky (Fínek, 2019). Další možností léčby je využití transorální robotické chirurgie, laserové chirurgie nebo jejich kombinace. Oproti běžnému chirurgickému zákroku se efektivita léčby neliší. Hlavní výhodou je, že tyto postupy jsou méně invazivní, dochází k menšímu poškození periferních tkání a tím k menším kosmetickým a funkčním vadám (Kofler *et al.*, 2013).

2.3.4 Rozdíly mezi HPV-pozitivními a HPV-negativními nádory hlavy a krku

Hlavní rozdíl spočívá v příčině vzniku nádorů. U HPV-pozitivních nádorů hlavy a krku je příčinou vzniku nádoru HPV, zatímco HPV-negativní nádory mají jiného původce,

nejčastěji jím bývá dlouhodobé vystavování alkoholu a tabákovým výrobkům, které působí jako karcinogeny s mutagenní aktivitou. Tito činitelé způsobují mutace v důležitých tumor supresorových genech jako *p53* a *pRb*. U 45 % karcinomů hlavy a krku, hlavně u kuřáků, se vyskytuje mutace genu *p53*. Narušením těchto genů tedy vznikají genetické mutace, které následně indukují karcinogenezi. Oproti tomu HPV-pozitivními karcinomy vznikají i v nepřítomnosti somatických mutací genů *p53* a *pRb*, ale hlavně indukci genomické nestability (Nováková a Laco, 2008).

Kromě toho, při srovnávání genomické analýzy HPV-pozitivních a negativních karcinomů hlavy a krku byly detekovány specifické genetické změny, které vedou k rozdílnému chování nádorů. Celková mutační zátěž byla podobná v obou případech. Mutace v HPV-negativních nádorech byly podobné těm u spinocelulárních karcinomů plic a jícnu, avšak navíc s mutacemi v genech *TP53*, *CDKN2A*, *MLL2*, *CUL3*, *NSD1*, *PIK3CA* a *NOTCH* a zvýšeným počtem kopií *EGFR*, *CCND1* a *FGFR1*. Mutace v genech *PIK3CA*, *MLL2* a *NOTCH1* se vyskytovaly taktéž u HPV-pozitivních nádorů. Ty vykazovaly ale jedinečné mutace v *DDX3X*, *FGFR2/3*, změny dráhy *PI3K* a vzácněji mutace *KRAS*. Mutace *FGFR2/3* se vyskytovaly u 17,6 % HPV-pozitivních nádorů. Gen *DDX3X*, kódující ATP-dependentní helikasu, byl mutován pouze v HPV-pozitivních nádorech. I když prognóza HPV-pozitivních nádorů bývá lepší než HPV-negativních, u pacientů, kteří měli v anamnéze užívání tabáku a HPV, byla prognóza horší a mutační zátěž byla čtyřikrát až šestkrát vyšší. Taktéž se v těchto případech častěji objevily mutace *KRAS* a *TP53* (Seiwert *et al.*, 2015).

2.4 Metody detekce lidského papilomaviru

Stanovení správné diagnózy je nutné pro predikci vývoje nádorového onemocnění a včasné zahájení odpovídající léčby. Bylo dokázáno, že infekce HPV v případě karcinomů dlaždicových buněk hlavy a krku je důležitým prognostickým a prediktivním markerem. Oproti karcinomům děložního hrdla, kde má přítomnost HPV menší klinický význam, neboť většina těchto karcinomů je způsobena HPV, pro karcinomy hlavy a krku musejí být použity speciální metody, protože v tomto případě je informace o HPV podstatná pro prognózu i indikaci terapie. Důležitost rozlišení mezi HPV-pozitivními a HPV-negativními nádory hlavy a krku také podporuje to, že HPV-pozitivní nádory lépe reagují na léčbu. V budoucnu by tak mohly léčebné postupy cílit na specifické molekulární dráhy, které jsou v těchto dvou případech odlišné.

Nebyla nalezena jediná optimální metoda pro detekci HPV v nádorech hlavy a krku, pro rozlišení HPV-pozitivních a negativních případů lze použít více metod (Venuti a Paolini, 2012). Imunohistochemické barvení proteinu p16 je v současné době používáno jako screeningový test, exprese proteinu p16 je nepřímým markerem aktivní HPV infekce. Pokud je jeho výsledek pozitivní, je ověřena přítomnost HPV prostřednictvím PCR nebo *in situ* hybridizace (Lewis, 2012).

2.4.1 Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda molekulární biologie, která dokáže velmi rychle, přesně a s vysokou citlivostí detekovat přítomnost specifické DNA/RNA sekvence v biologickém vzorku (Venuti a Paolini, 2012). Z hlediska použití jedné metody pro detekci HPV ve vzorku, je PCR nejvhodnější metodou (Prigge *et al.*, 2017; Vidal Loustau *et al.*, 2019). Dosahuje citlivosti až 98 %, což je vyšší citlivost v porovnání s metodami imunohistochemického barvení p16 a *in situ* hybridizace. Avšak při kombinaci PCR s metodou imunohistochemického barvení p16 bylo dosaženo vyšší specifity, než jakými disponují tyto dvě metody samostatně (Prigge *et al.*, 2017). PCR reakce probíhá opakovaním cyklů, při kterých nejprve dochází k denaturaci za vysoké teploty a tím k narušení vazeb mezi původními řetězci. Následuje hybridizace jednovláknových řetězců DNA s komplementárními primery a závěrem probíhá samotná replikace díky termostabilní DNA polymerase, čímž dojde ke vzniku nových kopií původního vlákna (Venuti a Paolini, 2012). Produkty PCR mohou být detekovány různými způsoby. Jedním z nich je štěpení amplikonu restrikčními endonukleasami následované elektroforezou na agarosovém gelu. Dalším způsobem detekce produktů PCR je využití typově specifických fluorescenčně či jinak značných

sond (Zaravinos *et al.*, 2009). V současné době se pro HPV diagnostiku používá real-time PCR s fluorescenčně značenými sondami (Trzcinska *et al.*, 2020).

Tato metoda je rychlá, reprodukovatelná a využitelná při semikvantitativní detekci virové zátěže. Také dokáže identifikovat velmi nízké koncentrace nukleových kyselin (Zaravinos *et al.*, 2009) a disponuje vysokou specificitou (Venuti a Paolini, 2012). Možnou, avšak ne často používanou metodou detekce HPV je varianta real-time PCR, PCR s reverzní transkripcí. Výhodou této metody je její schopnost podat informace o transkripční aktivitě viru. Nicméně pro rutinní screening je tato metoda technicky náročná. Ne příliš častým, avšak možným způsobem snížení senzitivity PCR je, že u primerů zacílených na oblast *L1* může docházet k delecí v průběhu virové integrace (Venuti a Paolini, 2012). Pro PCR lze využívat typově specifické nebo obecné typy primerů. Typově specifické primery jsou určeny k amplifikaci konkrétního genotypu HPV, zatímco obecné primery slouží k amplifikaci širšího spektra genotypů (Zaravinos *et al.*, 2009). Často komerčně využívanými primery, zaměřenými na oblast *L1*, jsou GP5+/GP6+ (Schmitt *et al.*, 2008) nebo PGMY09/11 (Venuti a Paolini, 2012). Jako interní kontrola kvality DNA se pro PCR s GP primery často využívá β -globin (Schmitt *et al.*, 2008). Existují také detekční testy založené na PCR zaměřené na jiné oblasti různých typů HPV jako *E1*, *E6* nebo *E7*.

2.4.2 Imunohistochemické barvení proteinu p16

Protein p16 může sloužit jako prognostický imunohistologický marker (Klussmann *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2014) a exprese proteinu p16 je nepřímým markerem aktivní HPV infekce. Metoda imunohistochemického barvení (IHC) p16 využívá specifických vazeb mezi protilátkami a antigeny. Vzorky mohou být inkubovány s primárními monoklonálními a poté sekundárními protilátkami značenými často křenovou peroxidasou. Následuje barvení například diaminobenzidinovým činidlem a hematoxylinem. Exprese proteinu je pak hodnocena podle umístění a intenzity barevného signálu (Schlecht *et al.*, 2011). IHC p16 má relativně vysokou senzitivitu. Výhodou je komerční dostupnost monoklonálních protilátek proti proteinu p16, snadná proveditelnost metody na tkáních fixovaných formalinem či parafinem, dostupnost provedení pro většinu laboratoří (Venuti a Paolini, 2012) a také nízká cena této metody (Augustin *et al.*, 2020). Z těchto důvodů je imunohistochemické barvení proteinu p16 rutinně používáno pro rozlišení HPV pozitivních/negativních nádorů hlavy a krku.

Protein E7 onkogenních typů HPV se váže na protein Rb (Venuti a Paolini, 2012) a tím vyvolává obrannou odpověď buňky prostřednictvím exprese tumor supresorového proteinu p16, který inhibuje CDK4/6 podstatné pro průběh buněčného cyklu. Tímto procesem je indukována zástava buněčného cyklu, neboť dochází k hromadění proteinu Rb. p16 je překvapivě i přes svou supresorovou funkci nezbytný pro přežití karcinomů (Munger *et al.*, 2013). Avšak v některých nádorech neasociovaných s HPV může docházet k jeho expresi a stejně tak ne všechny HPV pozitivní nádory expresi tohoto proteinu vykazují (Klussmann *et al.*, 2003), což může vést k nepřesným výsledkům. IHC p16 tedy disponuje nižší specificitou. I když detekce p16 nemusí jednoznačně znamenat infekci HPV, z jeho přítomnosti lze vyvodit podstatné informace pro prognózu a léčbu nádorových onemocnění (Venuti a Paolini, 2012) a jedná se o velmi levnou a rutinně použitelnou metodu.

2.4.3 *In situ* hybridizace

Metoda *in situ* hybridizace (ISH) je využívána pro detekci určité hledané sekvence nukleové kyseliny v místě její původní lokalizace na topografické úrovni (Dürst *et al.*, 1992). Díky zachování buněčných vztahů mohou být odhaleny interakce mezi buňkami exprimujícími různé proteiny. Principem metody je hybridizace hledané sekvence DNA nebo RNA se sondou, kterou je komplementární nukleová kyselina. Tyto sondy mohou být značeny radioaktivními a neradioaktivními nukleotidy (Wilcox, 1993). V komerčně dostupných testech detekce HPV založených na ISH jsou obsaženy sondy buď po jedné pro jednotlivé typy HPV nebo větší množství sond pro více typů HPV najednou.

Přítomnost HPV v jádrech testovaných buněk je následně hodnocena mikroskopicky. Podle signálů lze také určit stav viru, kdy interpunkční signály poukazují na integrovaný virus a difusní signály na virus v episomální podobě. Tato metoda disponuje vysokou specificitou, avšak ne zcela ideální citlivostí (Venuti a Paolini, 2012; Augustin *et al.*, 2020). Technikami pro zesílení signálu, jako je tyramidová amplifikace, lze sensitivitu zvýšit. Nízká sensitivita a náročnost jsou důvodem, proč metoda nenašla využití při rutinním screeningu (Venuti a Paolini, 2012).

2.4.4 Southern blot

Southern blot byl považován za metodu zlatého standardu. Ve srovnání s PCR je ale méně citlivý (Schiffman *et al.*, 1991), nelze jej využít pro detekci HPV ve vzorcích fixovaných ve formalinu a parafinu a nemá praktické využití. Avšak tato metoda je relativně specifická a dokáže rozlišovat mezi episomální a integrovanou virovou DNA.

Na začátku je provedena extrakce genomové DNA ze vzorku a následně je štěpena restričními enzymy. Fragmenty DNA jsou poté separovány podle jejich velikosti pomocí elektroforezy na agarosovém gelu. Fragmenty jsou dále přeneseny na membránu z nitrocelulosy nebo nylonu a hybridizují se s klonovanými genomovými sondami HPV. Tyto sondy jsou značeny isotopovými nebo neisotopovými technikami. Detekce těchto hybridů DNA ve vzorku indikuje přítomnost HPV (Venuti a Paolini, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál pro přípravu simulovaných vzorků byly použity komerčně dodávané buněčné linie SiHa (HTB-35™) a CaSki (CRL-1550™). Oba tyto typy buněčných linií jsou odvozené od karcinomů děložního hrdla, přičemž oba typy vykazují pozitivitu na přítomnost HPV16 (Grenman *et al.*, 1988; Mitra *et al.*, 2006).

Jako patientský materiál byly použity vzorky z testování pacientů na přítomnost viru SARS-CoV-2, získané pomocí sady GARGTEST (IntellMed, s.r.o.). GARGTEST je sada obsahující všechny komponenty potřebné k samoodběru vzorku z ústní dutiny a hltanu pro následnou mikrobiologickou analýzu patogenů infikujících ústní dutinu a horní cesty dýchací. Odběr provádí každý pacient samostatně. Pro pravděpodobnější záchyt infekce z dolních cest dýchacích se pacient zhluboka nadechne a zakašle. Následně si pacient vlije do úst 5 ml pitné vody a kloktá po dobu 20 až 30 s. Obsah úst po vykloktání vyplivne zpět do odměrky a přelije jej do zkumavky s lyofilizovaným stabilizačním médiem, která je součástí sady. Zkumavku uzavře, protřepe, podepíše a takto připravený vzorek je připraven pro analýzu laboratoří (Ref. 4). Pro stanovení přítomnosti HPV v patientských vzorcích bylo použito 100 vzorků GARGTESTů získaných od pacientů v nedefinovaném věkovém rozmezí a poměru mezi oběma pohlavími. Tyto vzorky byly primárně určeny pro testování na přítomnost SARS-CoV-2. Patientské vzorky GARGTESTů posloužily jako materiál pro izolaci nukleové kyseliny pomocí izolačního kitu Zybio.

3.1.2 Použité chemikálie

Zybio Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method)

- deionizovaná voda
- dimethyl karbinol
- guanidinium isothiokyanát
- NaCl
- Proteinasa K
- Tris pufr

QIAamp® DSP Virus Spin Kit

- 96% ethanol
- Eluční pufr
- Lyzační pufr obsahující guanidin hydrochlorid
- Nosná RNA
- Promývací pufr 1 obsahující guanidin hydrochlorid
- Promývací pufr 2
- QIAGEN Proteasa obsahující subtilisin
- Rozpouštědlo proteasy

Real-time PCR

- DEPC voda
- dNTP
- MgCl₂
- Polymerasový pufr ThermoTaq
- Probe/primer mix E6
- Probe/primer mix GAPDH
- Thermo HotStart Taq polymerasa

3.1.3 Použité roztoky

Roztok Proteinasy K

- <5% Proteinasa K

Reagencie pro extrakci nukleových kyselin

Eluční pufr

- deionizovaná voda

Extrakční reagencie I

- <10% Tris pufr
- <50% dimethyl karbinol
- <50% guanidinium isothiokyanát

Extrakční reagencie II

- <10% NaCl
- <10% Tris pufr

Roztok magnetických kuliček

- <50% magnetické kuličky

Reakční mix pro real-time PCR na jednu reakci

- Polymerasový pufr ThermoTaq
- $3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ MgCl}_2$
- $100/200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Probe/primer mix E6
- $100/100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Probe/primer mix GAPDH
- 1 U Thermo HotStart Taq polymerasa
- $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dNTP
- DEPC voda

3.1.4 Použité přístroje

- Centrifuga 5430 (Eppendorf)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Laminární box HerasafeTM KS (Thermo Fisher ScientificTM)
- Light Cycler 480 (Roche)
- Termoblok Dry Batch Incubator (Major Science)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Zybio EXM 6000 (Zybio) - pPřístroj pro provedení izolace nukleových kyselin

3.1.5 Ostatní pomůcky

- Automatické pipety Eppendorf
- Eluční zkumavky
- Fólie na uzavření mikrotitračních destiček
- Kádinky
- Lyzační zkumavky
- Mikrotitrační destičky s 96 jamkami
- Mikrozukumavky Eppendorf
- Nůžky
- Pinzeta
- Promývací zkumavky
- QIAamp MinElute kolony s promývacími zkumavkami

- Sterilní špičky
- Špičky s aerosolovými bariérami

3.2 Metody

3.2.1 Příprava biologického materiálu pro izolaci nukleových kyselin

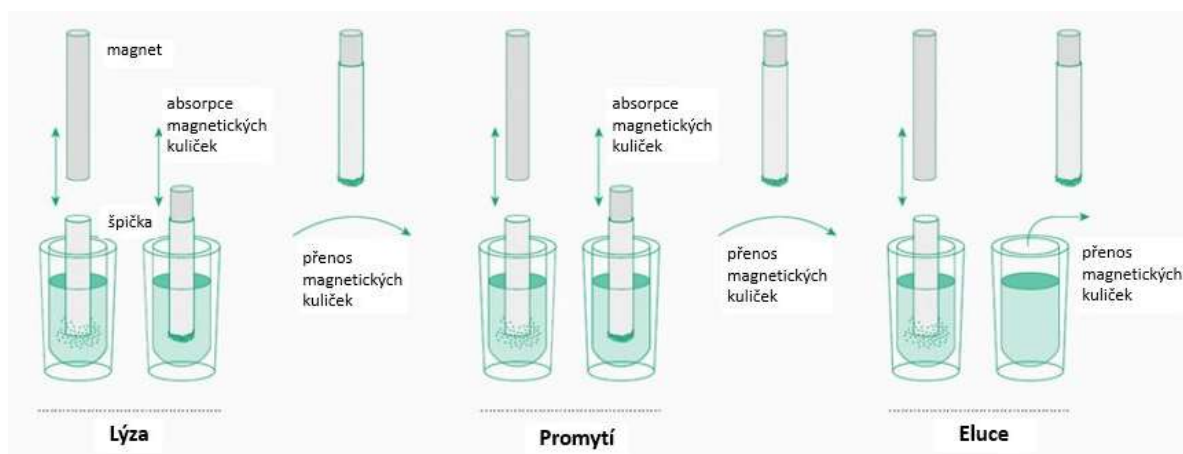
Před stanovením přítomnosti HPV v patientských vzorcích GARGTESTu byla nejprve provedena analýza vzorků simulovaných, z nichž byla nukleová kyselina izolována pomocí Zybio Nucleic Acid Extraction Kitu (Magnetic Bead Method). Pro přípravu vzorků byl použit můj vlastní GARGTEST, jakožto vzorek od pacienta, který je s vysokou pravděpodobností negativní na HPV. U tří vzorků GARGTESTu byla nasimulována pozitivita na HPV přidáním CaSki buněčné linie. V těchto preparátech byla vytvořena z jedné kultury koncentrační řada se sestupným množstvím buněk. Jako počáteční roztok pro ředění byl použit vzorek GARGTESTu s buněčnou linií CaSki o počtu 5 000 000 buněk ve vzorku o objemu 500 μ l. 100 μ l tohoto roztoku bylo 5x zředěno samostatným GARGTESTem, tedy ke 100 μ l roztoku GARGTEST+CaSki bylo přidáno 400 μ l roztoku samostatného GARGTESTu. Vznikl tak vzorek o celkovém objemu 500 μ l obsahující přibližně 1 000 000 buněk. 200 μ l tohoto roztoku bylo použito jako vzorek GARGTEST+CaSki, ve kterém je přibližně 400 000 buněk. Zbylých 300 μ l roztoku bylo využito pro přípravu dalšího vzorku, kdy bylo opět 100 μ l tohoto roztoku 5x zředěno roztokem samostatného GARGTESTu, tedy přídatkem 400 μ l. Vznikl tak vzorek o celkovém objemu 500 μ l obsahující přibližně 200 000 buněk. 200 μ l tohoto roztoku bylo použito jako vzorek GARGTEST+CaSki obsahující přibližně 80 000 buněk. Stejný postup byl aplikován při tvorbě vzorku obsahující 16 000 buněk (Tab. 2). Tyto buněčné linie jsou pozitivní na HPV16, přičemž jedna buňka obsahuje 500-600 kopií viru a byly zvoleny z toho důvodu, protože právě tento typ je jedním z nejrozšířenějších, které způsobují nádory hlavy a krku asociované s infekcí HPV. Jeden vzorek GARGTESTu byl ponechán bez jakéhokoli přídatku buněčné linie.

Tabulka 2 Postup pro ředění při přípravě koncentrační řady simulovaných vzorků GARGTEST+CaSki použité pro detekci genu *E6 HPV16* a *GAPDH* real-time PCR po izolaci nukleových kyselin pomocí Zybionucleic Acid Extraction Kitu

Vzorek	Výsledný počet buněk ve vzorku	Ředění	Počet buněk/1 μ l	Vstupní objem pro izolaci (μ l)	Výsledný počet buněk vložený do izolace
1	5 000 000	500 μ l GARG+CaSki	10 000	200	2 000 000
2	1 000 000	400 μ l GARG+100 μ l (1)	2 000		400 000
3	200 000	400 μ l GARG+100 μ l (2)	400		80 000
4	40 000	400 μ l GARG+100 μ l (3)	80		16 000

3.2.2 Izolace nukleových kyselin pomocí Zybio Nucleic Acid Extraction Kitu (Magnetic Bead Method)

Izolace nukleových kyselin pomocí Zybio Nucleic Acid Extraction Kitu (Magnetic Bead Method) se využívá pro extrakci a purifikaci nukleových kyselin ve vzorcích, přičemž její produkty jsou využitelné v klinické *in vitro* diagnostice. Principem je využití magnetických kuliček. U buněk a virů, které jsou přítomny ve vzorku, za specifických podmínek, jako je například vysoká salinita, rychle dochází k indukci lýzy a uvolňování nukleových kyselin. Nukleové kyseliny jsou specificky adsorbovány na povrch magnetických kuliček a následně při použití magnetického separátoru jsou odděleny od kapalně fáze. Různé zbytkové nečistoty a inhibitory pocházející z kapalně fáze jsou odstraněny promytím v extrakčním činidle II. Závěrem prostřednictvím změny podmínek kapalně fáze jsou nukleové kyseliny uvolněny z magnetických kuliček a je tak zajištěna efektivní separace nukleových kyselin (Ref. 5) (Obr. 4).



Obrázek 4 Proces izolace nukleových kyselin v magnetickém separátoru (převzato a upraveno podle Ref. 6)

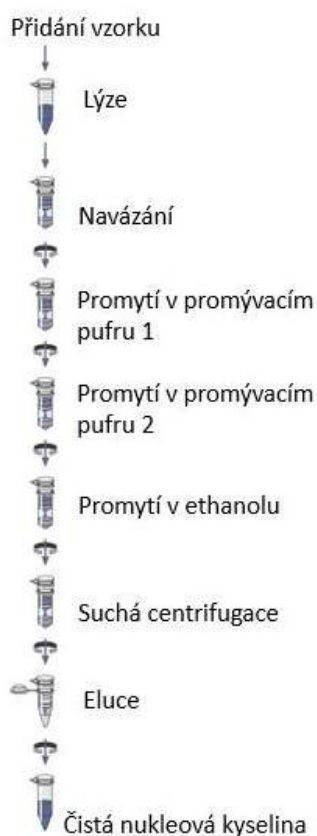
Pro izolaci nukleových kyselin byl použit semi-automatický systém extrakce pomocí přístroje Zybion EXM 6000. Zmražené vzorky byly vyjmuty z mrazáku a ponechány při pokojové teplotě za účelem rozmrznutí. Všechny komponenty izolačního kitu byly vyjmuty ze soupravy a temperovány při pokojové teplotě. 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující výrobcem připravené roztoky pro extrakci nukleových kyselin, byly ponechány stát 3-5 min, aby kapky roztoku ulpívající na hliníkové fólii, která kryje destičky, a stěnách jamek skla na dno, následně byly centrifugovány. Hliníková fólie byla opatrně sundána z destiček a do jamek s reagensii pro extrakci bylo pomocí pipety přidáno 15 μ l Proteinasy K a následně 200 μ l vyšetřovaného vzorku. Systém extrakce nukleových kyselin byl zapnut a na stránce Program Edit byl nastaven proces extrakce podle (Tab. 3). Stisknutím tlačítka „Start“ byl spuštěn 12 min trvající proces extrakce. Po ukončení procesu izolace nukleových kyselin byly destičky s eluovanou DNA vyjmuty z přístroje a vzorky byly uskladněny při -80 °C do doby PCR analýzy.

Tabulka 3 Parametry programu pro izolaci nukleových kyselin pomocí Zybion Nucleic Acid Extraction Kitu (Magnetic Bead Method) na přístroji Zybion EXM 6000

Pořadí	Proces	Doba míchání (min)	Doba absorpce mag. kuliček (s)	Rychlost míchání	Stav teploty	Teplota (°C)
1	pohyb	0	30	pomalé	-	-
2	lýza	4	60	pomalé	zahřívání pro lýzu	55
3	promytí	1	60	pomalé	-	-
4	eluce	2	30	pomalé	zahřívání pro eluci	80
5	pohyb	0	0	pomalé	-	-

3.2.3 Izolace nukleových kyselin pomocí QIAamp® DSP Virus Spin Kitu

QIAamp® DSP Virus Spin Kit je metoda používaná pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin mnoha druhů virů z různých biologických vzorků, které mohou být jak čerstvé, tak zmrazené, a je využitelná pro *in vitro* diagnostické účely. Princip metody je založen na využití technologie silikátové membrány (QIAamp technologie). Proces izolace nukleových kyselin touto metodou zahrnuje čtyři fáze. Nejdříve probíhá lýza, kdy jsou buňky nebo virové částice rozrušeny, což je nutné k uvolnění nukleových kyselin. Následuje navázání uvolněných nukleových kyselin na částice křemíku v silikátových membránách díky chaotropním solím obsaženým v lyzačním a promývacím pufru 1. Poté probíhá promytí nukleových kyselin za účelem odstranění nežádoucích kontaminantů a závěrem je provedena eluce nukleových kyselin z membrány (Obr. 5). Takto izolované nukleové kyseliny jsou připraveny pro další manipulaci (Ref. 7).



Obrázek 5 Proces extrakce nukleových kyselin pomocí QIAamp DSP Spin Kitu (převzato a upraveno podle Ref. 8)

Před procesem samotné izolace bylo nutné připravit reagenty a pufrů. Pro přípravu QIAGEN Proteasy byl celý obsah nádoby obsahující 4,4 ml rozpouštědla proteasy přidán do nádoby s lyofilizovanou QIAGEN Proteasou a roztok byl důkladně promíchán. Pro přípravu lyzačního pufru bylo 310 μ l elučního pufru přidáno do nádoby s 310 μ g lyofilizované nosné RNA. Aby byla nosná RNA dokonale rozpuštěna v lyzačním pufru, musela být nejprve rozpuštěna v elučním pufru a pak až přidána do lyzačního. K promývacím pufrům byl před použitím přidán 96% ethanol. Do nádoby s promývacím pufrům 1 bylo přidáno 25 ml ethanolu a k promývacímu pufru 2 bylo přidáno 30 ml ethanolu.

Do každé lyzační zkumavky bylo pomocí pipety odměřeno 25 μ l QIAGEN Proteasy, 200 μ l vzorku obsahující DNA a následně 200 μ l lyzačního pufru. Zkumavka byla uzavřena víčkem a přibližně 15 s byl obsah zkumavky důkladně míchán na vortexu. Vzorek byl poté ponechán inkubovat na termobloku při 56 °C po dobu 15 min. Po inkubaci proběhla krátká centrifugace, aby tekutina neulpívala na stěnách zkumavky nebo na víčku. Následně bylo ke vzorku v lyzační zkumavce přidáno 250 μ l 96% ethanolu, zkumavka byla uzavřena víčkem a přibližně 15 s byl obsah zkumavky míchán na vortexu. Po důkladném promíchání byl lyzát s přidaným ethanolem ponechán inkubaci při laboratorní teplotě asi 5 min. Vzorek byl opět krátce centrifugován a po centrifugaci byl veškerý obsah lyzační zkumavky opatrně přenesen na QIAamp MinElute kolonu tak, aby nebyly smáčeny okraje kolony a špičkou pipety nedocházelo ke kontaktu s membránou kolony. Zkumavka byla uzavřena a centrifugována po dobu 90 s při 6000 x g. Jestliže lyzát po centrifugaci neprošel přes kolonu úplně, bylo nutné centrifugaci opakovat, až veškerá tekutina prošla kolonou. Po centrifugaci byla kolona přemístěna do nové čisté promývací zkumavky a na kolonu bylo nanášeno 500 μ l promývacího pufru 1. Promývací zkumavka byla uzavřena a centrifugována po dobu 90 s při 6000 x g. Po proběhnutí centrifugace byla kolona přenesena do nové promývací zkumavky a bylo k ní přidáno 500 μ l promývacího pufru 2. Zkumavka byla uzavřena a proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Po centrifugaci byla kolona opět přemístěna do nové promývací zkumavky a na kolonu bylo přidáno 500 μ l 96% ethanolu. Zkumavka byla uzavřena a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Po ukončení byla kolona přenesena do nové promývací zkumavky a centrifugována ještě jednou po dobu 3 min při přibližně 20000 x g, aby se kolona úplně vysušila. Po ukončení centrifugace byla kolona přemístěna do nové promývací zkumavky a s otevřeným víčkem byla ponechána inkubovat na

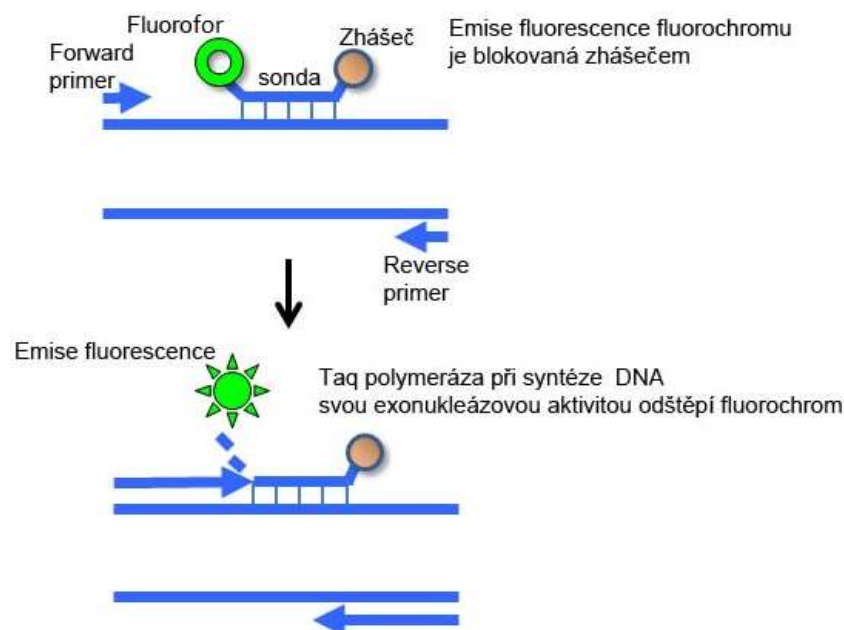
termobloku při 56 °C po dobu 3 min, aby se z kolony odpařila zbývající tekutina a kolona tak byla dokonale suchá. Po inkubaci byla kolona přemístěna do eluční zkumavky a přidáním 70 µl elučního pufru do středu membrány byla zahájena eluce. Následně byla zkumavka uzavřena, ponechána inkubovat 5 min při laboratorní teplotě a centrifugována po dobu 90 s při 20000 x g. Takto připravené vzorky byly uskladněny při -80 °C do doby PCR analýzy.

3.2.4 Real-time PCR pro detekci genu *E6* HPV16 a *GAPDH*

Detekce genu byla provedena pomocí real-time PCR. Při reakci byly použity primery pro HPV16 gen *E6*, které byly navrženy (Peitsaro *et al.*, 2002) a zároveň primery pro lidský gen *GAPDH* popsány (Jaworek *et al.*, 2020). Gen *GAPDH* kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu je housekeeping gen využívaný pro srovnání informací o expresi (Barber *et al.*, 2005) a jehož přítomností je potvrzena i přítomnost lidské DNA ve vzorku. Oba primery byly značeny prostřednictvím TaqMan proby. Tato sonda byla značena pomocí HEX na 5' konci a BHQ1 na 3' konci pro gen *E6* a CY5 na 5' konci a BHQ1 na 3' konci pro gen *GAPDH*. Na 5' konci je proba značena reportérovým fluorescenčním barvivem a na 3' konci nese zhášecí fluorescenční barvivo. Jestliže není proba porušená, je emise fluorescence reportérového barviva blokována zhášecím barvivem. V průběhu PCR je však proba štěpena díky exonukleasové aktivitě DNA polymerasy a reportérové barvivo je uvolněno a odděleno od zhášecího. Emise fluorescence reportérového barviva již není blokována a v takovém případě dochází k emisi fluorescence (Gibson *et al.*, 1996) (Obr. 6). Sekvence jednotlivých primerů a prob jak pro gen *E6* HPV16, tak pro gen *GAPDH*, jsou uvedeny v (Tab. 4) (Jaworek *et al.*, 2020).

Tabulka 4 Sekvence jednotlivých primerů a prob genů HPV16 *E6* a *GAPDH* pro detekci pomocí real-time PCR

Gen	Primer/proba	Sekvence DNA
HPV16 <i>E6</i>	Forward	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3'
	Reverse	5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-3'
	Proba	HEX-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-BHQ1
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-GAGTGAGTGGAAGACAGAATG-3'
	Reverse	5'-GGGACACAAGGTTACCATATAC-3'
	Proba	CY5-CAACTAGGATGGTGTGGCTCCC-BHQ1



Obrázek 6 Nahoře navázání primerů a probe na denaturovaná vlákna DNA, přičemž probe je neporušena, dole probíhající syntéza DNA, kdy probe je štěpena a reportérové barvivo uvolněno (převzato a upraveno podle Ref. 9)

Pro samotnou reakci byl nejprve připraven reakční mix podle (Tab. 5), kdy 23 μ l reakčního mixu bylo pipetou přeneseno do jamek mikrotitrační destičky. Poté byly do jamek, s reakčním mixem, přidány 2 μ l jednotlivých vzorků DNA tak, že po smísení výsledný objem každého vzorku byl 25 μ l. Mikrotitrační destička byla po aplikaci vzorků uzavřena fólií, protřepána na vortexu a centrifugována. Následně byla vložena do cycleru pro provedení PCR za podmínek PCR programu popsaného v (Tab. 6) a DNA byla amplifikována. Jako pozitivní kontrola při PCR pro *GAPDH* byla použita buněčná linie CEM, což jsou lidské buňky zasažené leukemií, a jako pozitivní kontrola pro *E6* byla zvolena buněčná linie CaSki. Netemplátovou a tedy negativní kontrolou byla voda. Analýza přítomnosti *GAPDH* a *E6* genu probíhala současně v jedné reakci.

Po provedení PCR byly analyzovány výsledky, kdy z nastavení bylo vybráno ABS Quant. Byla využita ABS Quant Fit Points metoda, s manuálně nastavitelným noisebandem. Noiseband zároveň sloužil i jako treshold, protože nebyly používány standardy. Výsledkem této analýzy byla u každého vzorku hodnota C_p , která definuje cyklus PCR, kdy fluorescenční signál vzorku dosáhne hodnoty tresholdu. Pro analýzu výsledků HPV genu *E6* byl zvolen filtr HEX s rozsahem excitace a emise 540-580 nm a pro gen *GAPDH* filtr CY5 s rozsahem 610-670 nm a potvrzeno tlačítkem „analyze“.

Tabulka 5 Složení reakčního mixu použitého pro stanovení přítomnosti viru HPV16 pomocí real-time PCR

Složka	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem na jednu reakci [μl]
Pol. pufr ThermoTaq		1x	2,5
MgCl₂	25 mM	3 mM	3
Probe/primer mix E6	1,25/2,5 μM	100/200 nM	2
Probe/primer mix GAPDH	1,25/1,25 μM	100 nM	2
Thermo HotStart Taq polymerasa		1 U	0,2
dNTP	10 mM	200 μM	0,5
DEPC H₂O			12,8
DNA = bio. vzorek			2
Celkový objem			25

Tabulka 6 Podmínky PCR programu

PCR program	Teplota	Čas	Počet opakování
Pre-denaturace	95°C	15 min	1
Denaturace	95°C	15 s	45
Annealing a elongace	60°C	60 s	45
Chlazení	4°C		1

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení přítomnosti HPV po izolaci nukleových kyselin pomocí Zybio Nucleic Acid Extraction Kitu v simulovaných vzorcích

Při analýze genu *GAPDH* ve vzorku GARGTESTu s buněčnou linií CaSki, která obsahovala přibližně 400 000 buněk, nedošlo k detekci. Stejný výsledek byl dosažen i v případě vzorku GARGTESTu s linií CaSki o počtu 80 000 buněk. Detekce *GAPDH* proběhla až v případě, když byl počet buněk linie CaSki ve vzorku přibližně 16 000. U samostatného GARGTESTu byl gen *GAPDH* detekován při hodnotě Cp 25,70. Pozitivní kontrola pro *GAPDH*, kterou byla buněčná linie CEM s přibližným počtem 2 500 000 buněk ve vzorku, vyšla podle předpokladu pozitivně při Cp 30,14, což je vyšší hodnota než u vzorku samostatného GARGTESTu. Voda, jakožto negativní kontrola pro *GAPDH*, byla ověřena jako negativní.

Detekce genu *E6* vyšla pozitivně u vzorků GARGTESTu s buněčnou linií CaSki s přibližným počtem 400 000, 80 000 i 16 000 buněk, přičemž se snižujícím se množstvím buněk CaSki ve vzorku, kdy klesala virová nálož, rostla hodnota Cp. U GARGTESTu bez přítomnosti buněk z buněčných linií CaSki nebyla přítomnost genu *E6* detekována. U pozitivní kontroly, kterou pro gen *E6* představovala buněčná linie CaSki s přibližným počtem 2 500 000 buněk ve vzorku, byl gen *E6* HPV16 detekován s Cp 15,12. U negativní kontroly byla prokázána nepřítomnost *E6* (Tab. 7).

Tabulka 7 Výsledky PCR pro jednotlivé typy simulovaných vzorků po Zybio izolaci nukleových kyselin

Typ vzorku	GAPDH-CY5		HPV 16 E6-HEX	
	Cp	Počet buněk	Cp	Počet buněk
CaSki+GARG	-	400 000	16,11	400 000
CaSki+GARG	-	80 000	16,47	80 000
CaSki+GARG	31,59	16 000	18,85	16 000
GARG	25,70	-	-	-
Poz. PCR	30,14	2 500 000	15,12	2 500 000
NTC PCR	-	-	-	-

Očekávanými výsledky pro detekci *GAPDH* byla pozitivita jak v případě GARGTESTů s buněčnými liniemi CaSki, tak u samotného GARGTESTu. V případě GARGTESTů s CaSki, které obsahovaly přibližně 400 000 a 80 000 buněk nedošlo k detekci z důvodu vysycení PCR reakce. Až v případě vzorku, kde počet buněk klesl na přibližně 16 000 buněk, došlo k detekci *GAPDH*. Detekce HPV16 *E6* genu u samotného GARGTESTu vyšla podle očekávání. Předpokládanými výsledky pro HPV16 *E6* byla přítomnost *E6* u vzorků s CaSki a negativní výsledek přítomnosti *E6* pro samostatný GARGTEST. Reálné výsledky se shodovaly s předpokladem, tudíž přítomnost *E6* byla potvrzena u všech tří vzorků obsahující buněčné linie CaSki o různém množství buněk a vyvrácena u samotného GARGTESTu. Hodnota C_p se se snižujícím množstvím buněk zvyšovala, což naznačuje lepší detekci při vyšším množství buněk (Tab. 7).

4.2 Stanovení přítomnosti HPV po izolaci nukleových kyselin pomocí QIAamp DSP Virus Spin Kitu v simulovaných vzorcích

Při analýze genu *GAPDH* ve vzorku GARGTESTu s buněčnou linií CaSki nedošlo k detekci. V případě vzorku GARGTESTu obsahujícího linii SiHa detekce *GAPDH* proběhla a přítomnost genu v tomto vzorku byla potvrzena s Cp 29,65. U GARGTESTu bez přidané buněčné linie byl gen *GAPDH* detekován při Cp 29,60, což je vyšší hodnota než u vzorku GARGTESTu bez přidané buněčné linie po izolaci Zybico Nucleic Acid Extraction Kitem. Pro pozitivní a negativní kontrolu byly použity totožné vzorky jako u stanovení přítomnosti *GAPDH* po izolaci nukleových kyselin pomocí Zybico Nucleic Acid Extraction Kitu. Hodnota Cp pozitivní kontroly, kterou byla CEM linie, pro *GAPDH* byla stejně jako v předešlé analýze vyšší než Cp samostatného GARGTESTu.

Detekce genu *E6* vyšla pozitivně jak u vzorku GARGTESTu s buněčnou linií CaSki, tak s buněčnou linií SiHa. Hodnota Cp však byla o skoro polovinu vyšší v případě vzorku se SiHa buňkami. U samostatného GARGTESTu nebyla opět přítomnost genu *E6* detekována. Pro pozitivní a negativní kontrolu byly použity totožné vzorky jako u stanovení přítomnosti *E6* po izolaci nukleových kyselin pomocí Zybico Nucleic Acid Extraction Kitu, tedy buněčná linie CaSki jako pozitivní kontrola a voda jako negativní kontrola (Tab. 8).

Tabulka 8 Výsledky PCR pro jednotlivé typy simulovaných vzorků po QIAamp izolaci

Typ vzorku	GAPDH-CY5		HPV 16 E6-HEX	
	Cp	Počet buněk	Cp	Počet buněk
SiHa+GARG	29,65	2 500 000	29,95	2 500 000
CaSki+GARG	-	2 500 000	15,14	2 500 000
GARG	29,60	-	-	-
Poz. PCR	30,14	2 500 000	15,12	2 500 000
NTC PCR	-	-	-	-

U detekce *GAPDH* byla očekávána pozitivita u všech tří vzorků. V GARGTESTu, kde byla pozitivita simulována přidavkem CaSki buněk, byla PCR pro detekci přítomnosti *GAPDH* falešně negativní z důvodu vysycení PCR reakce. U samostatného GARGTESTu a GARGTESTu se SiHa buňkami byl gen *GAPDH* pomocí PCR spolehlivě detekován. Pro *E6* byla předpokládána přítomnost v obou vzorcích s buněčnými liniemi a nepřítomnost v GARGTESTu bez buněčných linií. Předpoklad byl potvrzen reálnými výsledky, kdy *E6* v GARGTESTu bez přidavku buněčné linie nebyl detekován a ve vzorku obsahující CaSki buněčnou linii byl detekován s hodnotou C_p o skoro polovinu nižší než v případě SiHa buněk. I přes stejný přibližný počet buněk obou buněčných liniích ve vzorku byl počet virových kopií jiný, neboť jedna buňka z buněčné linie CaSki obsahuje 500-600 virových kopií, což je mnohem více než u SiHa linie, kdy jedna buňka obsahuje 1-2 kopie viru. Nižší hodnota C_p u vzorku GARGTEST+CaSki naznačuje lepší detekci *E6* při větším množství virové DNA (Tab. 8).

4.3 Stanovení přítomnosti HPV v patientských vzorcích

Pro stanovení přítomnosti HPV v patientských vzorcích bylo použito 100 vzorků GARGTESTů získaných od pacientů v nedefinovaném věkovém rozmezí a poměru mezi oběma pohlavími. Jelikož se jednalo o reálné patientské vzorky, předpokládalo se, že gen *GAPDH* bude přítomen v každém vzorku. To bylo potvrzeno výsledky, kdy opravdu v každém případě vyjma negativní kontroly, kterou byla voda, bylo *GAPDH* detekováno. Hodnota naměřeného Cp se pohybovala od 20,50 do 31,54. Jako pozitivní kontrola byla zvolena buněčná linie CEM. Oproti tomu virový gen *E6* nebyl detekován v žádném z patientských vzorků (Tab. 9), což naznačuje pravděpodobnou nepřítomnost HPV16 infekce u těchto jedinců. Detekce genu *E6* v kontrolním vzorku, který představovala buněčná linie CaSki, vyšla pro tento gen podle předpokladu pozitivně. Negativní kontrolou byla jako u analýzy *GAPDH* voda.

Tabulka 9 Výsledky analýzy PCR pro jednotlivé patientské vzorky

HPV 16 E6-HEX		GAPDH-CY5	
Vzorek	Cp	Vzorek	Cp
-	-	POZ PCR (CEM)	29,89
-	-	NTC PCR	-
CoV162572	-	CoV162572	25,74
CoV162573	-	CoV162573	25,88
CoV162574	-	CoV162574	26,65
CoV162575	-	CoV162575	25,91
CoV162576	-	CoV162576	25,55
CoV162577	-	CoV162577	25,38
CoV162578	-	CoV162578	24,96
CoV162579	-	CoV162579	24,54
CoV162580	-	CoV162580	26,07
CoV162581	-	CoV162581	23,78
CoV162582	-	CoV162582	24,09
CoV162583	-	CoV162583	26,96
CoV162584	-	CoV162584	24,85
CoV162585	-	CoV162585	24,41
CoV162586	-	CoV162586	26,74
CoV162587	-	CoV162587	27,37
CoV162588	-	CoV162588	26,72
CoV162589	-	CoV162589	24,07
CoV162590	-	CoV162590	23,82
CoV162591	-	CoV162591	23,51
CoV162592	-	CoV162592	26,62
CoV162593	-	CoV162593	27,78
CoV162594	-	CoV162594	25,62
CoV162595	-	CoV162595	27,05
CoV162596	-	CoV162596	27,71

Tabulka 9 Výsledky analýzy PCR pro jednotlivé patientské vzorky (pokračování)

CoV162597	-	CoV162597	20,50
CoV162598	-	CoV162598	24,25
CoV162599	-	CoV162599	26,79
CoV162600	-	CoV162600	28,10
CoV162601	-	CoV162601	27,69
CoV162602	-	CoV162602	22,73
CoV162603	-	CoV162603	28,60
CoV162604	-	CoV162604	25,78
CoV162605	-	CoV162605	24,34
CoV162606	-	CoV162606	25,86
CoV162607	-	CoV162607	25,05
CoV162608	-	CoV162608	23,47
CoV162609	-	CoV162609	27,32
CoV162610	-	CoV162610	26,52
CoV162611	-	CoV162611	26,55
CoV162612	-	CoV162612	23,64
CoV162613	-	CoV162613	24,50
CoV162614	-	CoV162614	27,92
CoV162615	-	CoV162615	27,70
CoV162616	-	CoV162616	25,56
CoV162617	-	CoV162617	22,26
CoV162618	-	CoV162618	22,13
CoV162619	-	CoV162619	25,58
CoV162620	-	CoV162620	25,49
CoV162621	-	CoV162621	23,94
CoV162622	-	CoV162622	24,68
CoV162623	-	CoV162623	25,88
CoV162624	-	CoV162624	21,41
CoV162625	-	CoV162625	24,27
CoV162626	-	CoV162626	26,41
CoV162627	-	CoV162627	25,60
CoV162628	-	CoV162628	22,99
CoV162629	-	CoV162629	23,99
CoV162630	-	CoV162630	24,06
CoV162631	-	CoV162631	27,62
CoV162632	-	CoV162632	27,75
CoV162633	-	CoV162633	27,50
CoV162634	-	CoV162634	26,42
CoV162635	-	CoV162635	24,95
CoV162636	-	CoV162636	21,66
CoV162637	-	CoV162637	26,17
CoV162638	-	CoV162638	23,44
CoV162639	-	CoV162639	21,87
CoV162640	-	CoV162640	24,23
CoV162641	-	CoV162641	24,33
CoV162642	-	CoV162642	24,75
CoV162643	-	CoV162643	24,87
CoV162644	-	CoV162644	22,48
CoV162645	-	CoV162645	26,48
CoV162646	-	CoV162646	24,82

Tabulka 9 Výsledky analýzy PCR pro jednotlivé patientské vzorky (pokračování)

CoV162647	-	CoV162647	27,03
CoV162648	-	CoV162648	24,56
CoV162649	-	CoV162649	26,65
CoV162650	-	CoV162650	25,01
CoV162651	-	CoV162651	29,22
CoV162652	-	CoV162652	21,33
CoV162653	-	CoV162653	26,97
CoV162654	-	CoV162654	20,72
CoV162655	-	CoV162655	23,45
CoV162656	-	CoV162656	24,41
CoV162657	-	CoV162657	27,99
CoV162658	-	CoV162658	25,46
CoV162659	-	CoV162659	28,61
CoV162660	-	CoV162660	21,28
CoV162661	-	CoV162661	31,54
CoV162662	-	CoV162662	24,82
CoV162352	-	CoV162352	26,33
CoV162669	-	CoV162669	28,74
CoV162670	-	CoV162670	26,21
CoV162671	-	CoV162671	26,57
CoV162672	-	CoV162672	26,91
CoV162673	-	CoV162673	24,37
CoV162674	-	CoV162674	27,92
CoV162675	-	CoV162675	25,41
CoV162676	-	CoV162676	26,61
POZ PCR (CaSki)	14,71	-	-
NTC PCR	-	-	-

5 DISKUSE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo otestovat patientské vzorky GARGTESTu na přítomnost lidského papilomaviru HPV16. Tento typ je jedním z nejrozšířenějších typů, jehož infekce může vyústit v nádorové onemocnění. Před testováním samotných patientských vzorků byly na HPV16 analyzovány vzorky vlastního GARGTESTu, u nichž byla pozitivita na virus simulována přidavkem buněčných linií SiHa a CaSki. Pro izolaci nukleových kyselin ze vzorků byly použity dvě rozdílné metody.

První metodou izolace nukleových kyselin byl QIAamp DSP Virus Spin Kit. U vzorku s přidavkem CaSki buněk došlo při následné PCR analýze pro housekeeping gen *GAPDH* k nulovému výsledku, a tedy *GAPDH* nebylo naměřeno. Tento výsledek lze přisoudit vysycení PCR reakce. To může být vysvětleno tak, že ve vzorcích, ve kterých je obsažen velký počet virových kopií, je virová DNA preferenčně amplifikována. Při amplifikaci této virové DNA dojde k vysycení PCR reakce, tedy ke spotřebě všech reagensů. Pro amplifikaci interní kontroly již pak nejsou dostupné žádné reagensy a detekce genu nemůže proběhnout. Ve srovnání se vzorkem s buněčnou linií SiHa, který obsahoval přibližně stejné množství buněk jako vzorek s CaSki, detekce *GAPDH* proběhla a housekeeping gen byl při analýze PCR detekován. To lze odůvodnit množstvím virových kopií nacházející se v jedné buňce. Zatímco jedna buňka buněčné linie SiHa nese jednu až dvě kopie viru, jedna buňka linie CaSki obsahuje až 600 virových kopií, což při celkovém množství buněk činí mnohem více virové nukleové kyseliny ve vzorcích GARGTEST+CaSki. U vzorku GARGTEST+SiHa nedošlo tedy k vysycení PCR reakce a detekce mohla proběhnout.

Podobných výsledků bylo dosaženo použitím druhé metody izolace Zybionucleic Acid Extraction Kit, který využíval magnetické kuličky. Vzorky, ze kterých se nukleová kyselina izolovala tímto způsobem, byly obohaceny přidavkem buněčné linie CaSki. Pro ověření množství buněk, při kterém nedochází k vysycení PCR pro *GAPDH*, byla vytvořena koncentrační řada se snižujícím se počtem. Při vyšších množstvích CaSki buněk obsažených ve vzorku nebyl *GAPDH* detekován. Jednalo se o stejnou příčinu jako v prvním případě, když byl pro izolaci nukleových kyselin použit QIAamp DSP Virus Spin Kit. Při analýze došlo k vysycení reagensů PCR reakce pro amplifikaci interní kontroly *GAPDH*. Až při snížení počtu CaSki buněk ve vzorku bylo možné detekovat i housekeeping gen *GAPDH*. Metoda Zybionucleic Acid Extraction Kit, což se detekce *GAPDH* v samostatném GARGTESTu týče, prokázala lepší výsledek než metoda QIAamp, kdy

po analýze PCR byla hodnota Cp nižší než v případě detekce po izolaci metodou QIAamp. Oba typy extrakce nukleových kyselin prokázaly schopnost izolace DNA HPV16 v malých objemech vzorků, avšak určité omezení nastalo v detekci genomové DNA, pokud bylo přítomno příliš vysoké množství virových nukleových kyselin, což nicméně nijak neovlivňuje diagnostiku přítomnosti HPV.

Pro otestování reálných patientských vzorků na přítomnost HPV16 bylo použito 100 vzorků GARGTESTu. Pro izolaci DNA byla využita metoda Zybico Nucleic Acid Extraction Kit a následná PCR, kterou ve své práci pro detekci HPV u nádorů plic využili Jaworek *et al.* (2020). V kohortě otestovaných vzorků se žádný neprokázal jako pozitivní. Nepřítomnost ani jednoho pozitivního pacienta se dala očekávat a byla pravděpodobně dána tím, že v bakalářské práci nebyly použity vzorky odebrané od pacientů postižených nádorovým onemocněním hlavy a krku, u kterých by primárně přítomnost HPV měla být potvrzena nebo vyvrácena. V současné době, kdy jsou preventivní vyšetření utlačována do pozadí, nelze bohužel dostatečný dataset získat. Prevalence HPV16 v ústní dutině v běžné populaci je velmi nízká (Migaldi *et al.*, 2012; de Abreu *et al.*, 2018; Vidal Loustau *et al.*, 2019) a bylo by třeba testovat tisíce bezpříznakových jedinců pro zachycení alespoň jednoho pozitivního. Častou příčinou vzniku nádorů hlavy a krku v české populaci je požívání alkoholu a kouření nebo žvýkání tabákových výrobků. To potvrzuje i studie Tachezy *et al.* (2005). Ti se ve své studii zaměřili na HPV a jiné rizikové faktory vzniku nádorů v oblasti ústní dutiny a orofaryngu v Česku. Z celkového počtu 68 pacientů bylo pozitivní na HPV 51,5 %, u nichž v 80 % byl přítomen HPV16. Avšak celkem 50 % pacientů bylo pravidelnými kuřáky a 63 % patřilo do skupiny lidí, kteří často konzumují alkohol. Nicméně novější data naznačují, že počet případů nádorů hlavy a krku spojených s infekcí HPV v české populaci roste, kdy byl v letech 1977-2016 zaznamenán výrazný nárůst incidence nádorů hlavy a krku asociovaných s HPV, zvláště pak v oblasti tonsil. Nárůst byl zaznamenán i v prevalenci HPV pozitivních nádorů hlavy a krku, kdy v roce 2010 byla prevalence 3913 případů, zatímco v roce 2016 se zvýšila na 5636 (Ref. 10).

Pomocí simulovaných vzorků byla otestována citlivost detekční metody i její vhodnost pro vyšetření tohoto typu vzorků. Tato forma odběru biologického materiálu je jednoznačně velmi vhodná k získání materiálu pro detekci HPV v dutině ústní, a to jak pro její neinvazivnost, tak proto, že lze pomocí tohoto odběru dosáhnout odběru ze všech částí dutiny ústní. U pacientů s orofaryngeálním karcinomem není problémem vyšetřit samotnou biopsii vzorku či stěr z této léze, nicméně u bezpříznakových jedinců,

případně pacientů po léčbě, u nichž je třeba sledovat stav onemocnění, v současné době neexistuje žádná validovaná metoda odběru. Metodu odběru pomocí GARGTESTu s následnou izolací DNA a detekcí HPV pomocí PCR by bylo možné použít rovněž pro screening pacientů v riziku rozvoje orofaryngeálního karcinomu, a to buď v běžné populaci nebo u pacientů se zvýšeným rizikem (např. u sexuálních partnerů HPV pozitivních žen).

6 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše, která se zabývala asociací infekce lidského papilomaviru s nádory v oblasti hlavy a krku. První část byla zaměřena na základní popis genomu lidského papilomaviru a funkcí jednotlivých virových proteinů při životním cyklu a infekci hostitele. Dále byl popsán samotný životní cyklus viru a integrace do lidského genomu, což je předpoklad pro rozvoj nádorového onemocnění. Druhá část byla věnována nádorům hlavy a krku, jejich anatomické lokalizaci podle nejnovějšího 8. vydání klasifikace TNM, roli infekce lidského papilomaviru u těchto nádorů a rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními nádory. V závěru teoretické části byly popsány základní metody detekce lidského papilomaviru v nádorech hlavy a krku.

Cílem praktické části bylo validovat možnost detekce HPV16 u vzorků získaných kloktáním. Pro praktickou část byly vytvořeny vzorky GARGTESTu, ve kterých byla pozitivita na HPV simulována SiHa a CaSki buněčnými liniemi. Z takto připravených vzorků byly izolovány nukleové kyseliny dvěma rozdílnými metodami a následnou PCR analýzou sledována jejich účinnost izolace. Obě metody prokázaly úspěšnost v izolaci virových nukleových kyselin ze vzorků s malými objemy, avšak ve vzorcích s vyšším množstvím virové DNA nedošlo k detekci interní kontroly, kterou byl lidský housekeeping gen *GAPDH*. V rámci experimentální části bylo otestováno 100 patientských vzorků na přítomnost HPV16 pomocí PCR. Z tohoto počtu se jako pozitivní neprokázal ani jeden případ. V této bakalářské práci byla prokázána vhodnost odběrového systému GARGTEST pro vyšetření přítomnosti viru HPV16. V navazující práci bude rozšířen soubor patientských vzorků o vzorek pacienta s prokázaným HPV pozitivním orofaryngeálním karcinomem a bude screeningově vyšetřeno více vzorků odebraných pomocí kloktací sady GARGTEST.

7 LITERATURA

- Araldi R.P., Sant'Ana T.A., Módolo D.G., de Melo T.C., Spadacci-Morena D.D., de Cassia Stocco R., de Souza E.B. (2018): The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106**, 1537–1556.
- Augustin J.G., Lepine C., Morini A., Brunet A., Veyer D., Brochard C., Mirghani H., Péré H., Badoual C. (2020): HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue?. *Frontiers in oncology* **10**, 1751.
- Avvakumov N., Torchia J., Mymryk J. (2003): Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* **22**, 3833–3841.
- Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J. (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics* **21(3)**, 389–395.
- Bellanger S., Tan C.L., Xue Y.Z., Teissier S., Thierry F. (2011): Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res.* **1(3)**, 373-389.
- Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouysségur J. (2007): Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, **85(12)**, 1301–1307.
- Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (2017): Úvod. In: *TNM Klasifikace ZHOUBNÝCH NOVOTVARŮ*. 8th ed., (Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C., O'Sullivan B., Mason M., Asamura H., Lee A., Van Eycken E., Denny L., Amin M.B., Gupta S.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, 15-30
- Buck C.B., Day P.M., Trus B.L. (2013): The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* **445(1-2)**, 169-174.
- Cagno V., Tseligka E.D., Jones S.T., Tapparel C. (2019): Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias?. *Viruses* **11(7)**, 596.
- Castro-Muñoz L.J., Manzo-Merino J., Muñoz-Bello J.O., Olmedo-Nieva L., Cedro-Tanda A., Alfaro-Ruiz L.A., Hidalgo-Miranda A., Madrid-Marina V., Lizano M. (2019): The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Scientific reports* **9(1)**, 13620.
- Collins S.I., Constandinou-Williams C., Wen K., Young L.S., Roberts S., Murray P.G., Woodman, C.B.J. (2009): Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Research* **69(9)**, 3828–3832.
- Cottage A., Downen S., Roberts I., Pett M., Coleman N., Stanley M. (2001): Early genetic events in HPV immortalised keratinocytes. *Genes, Chromosomes and Cancer* **30(1)**, 72-79.
- de Abreu P.M., C6 A.C.G., Azevedo P.L., do Valle I.B., de Oliveira K.G., Gouvea S.A., Cordeiro-Silva M.F., Louro I.D., de Podest6 J.R.V., Lenzi J., Sena A., Mendonça E.F., S.L.V. von Zeidler (2018): Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **18**, 324.
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. (2004): Classification of papillomaviruses. *Virology* **324(1)**, 17-27.
- Doorbar J. (2005): The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* **32**, 7–15.
- Doorbar J. (2006): Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* **110(5)**, 525-541.
- Doorbar J. (2013): The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* **445(1-2)**, 80-98.
- Doorbar J., Jenkins D., Stoler M.H., Bergeron C. (2020): Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of PreCancer and Cancer. *Human Papillomavirus*, 67–83.
- Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Broker T.R., Stanley M.A. (2012): The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* **30**, F55-F70.
- Du J., Nordfors C., Åhrlund-Richter A., Sobkowiak M., Romanitan M., Näsman A., Dalianis T. (2012): Prevalence of Oral Human Papillomavirus Infection among Youth, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* **18(9)**, 1468–1471.

- Dürst M., Glitz D., Schneider A., zur Hausen H. (1992): Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: Analysis by in situ hybridization. *Virology* **189(1)**, 132-140.
- Fínek J. (2019): Nivolumab. *Remedia* **29**, 241–246.
- Finnen R.L., Erickson K.D., Chen X.S., Garcea R.L. (2003): Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *Journal of virology* **77(8)**, 4818–4826.
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research* **6(10)**, 995–1001.
- Gillison M.L., Alemany L., Snijders P.J.F., Chaturvedi A., Steinberg B.M., Schwartz S., Castellsagué X. (2012): Human Papillomavirus and Diseases of the Upper Airway: Head and Neck Cancer and Respiratory Papillomatosis. *Vaccine* **30**, F34-F54.
- Graham S.V. (2017): The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science* **131(17)**, 2201-2221.
- Grenman S., Shapira A., Carey T.E. (1988): In vitro response of cervical cancer cell lines CaSki, HeLa, and ME-180 to the antiestrogen tamoxifen. *Gynecologic oncology* **30(2)**, 228–238.
- Handisurya A., Schellenbacher C., Kirnbauer R. (2009): Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **7(5)**, 453-466.
- Horvath C.A., Boulet G.A., Renoux V.M., Delvenne P.O., Bogers J.P. (2010): Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal* **7**, 11.
- Huang S.H., O’Sullivan B. (2017): Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology* **18(7)**, 40.
- Chang J.L., Tsao Y.P., Liu D.W., Huang S.J., Lee W.H., Chen S.L. (2001): The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *Journal of Biomedical Science* **8(2)**, 206–213.
- Chung C.H., Zhang Q., Kong C.S., Harris J., Fertig E.J., Harari P.M., Wang D., Redmond K.P., Shenouda G., Trotti A., Raben D., Gillison M.L., Jordan R.C., Le Q.T. (2014): p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32(35)**, 3930–3938.
- Jaworek H., Koudelakova V., Slavkovsky R., Drabek J., Hajduch M. (2020): The absence of high-risk human papillomavirus in Czech non-small cell lung cancer cases. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **164(1)**, 71–76.
- Jones D.L., Alani R.M., Munger K. (1997): The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development* **11(16)**, 2101–2111.
- Keck M.K., Zuo Z., Khattri A., Stricker T.P., Brown C.D., Imanguli M., Rieke D., Endhardt K., Fang P., Brägelmann J., DeBoer R., El-Dinali M., Aktolga S., Lei Z., Tan P., Rozen S.G., Salgia R., Weichselbaum R.R., Lingen M.W., et al. (2015). Integrative Analysis of Head and Neck Cancer Identifies Two Biologically Distinct HPV and Three Non-HPV Subtypes. *Clinical Cancer Research* **21(4)**, 870-881.
- Kennel T., Garrel R., Costes V., Boisselier P., Crampette L., Favier V. (2019): Head and neck carcinoma of unknown primary. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* **136(3)**, 185-192.
- Klussmann J.P., Gültekin E., Weissenborn S.J., Wieland U., Dries V., Dienes H.P., Eckel H.E., Pfister H.J., Fuchs P.G. (2003): Expression of p16 Protein Identifies a Distinct Entity of Tonsillar Carcinomas Associated with Human Papillomavirus. *The American Journal of Pathology* **162(3)**, 747-753.
- Kofler B., Laban S., Busch C.J., Lörincz B., Knecht R. (2013): New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **271(7)**, 1861–1867.
- Lewis J.S. (2012): p16 Immunohistochemistry As a Standalone Test for Risk Stratification in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathology* **6(S1)**, 75–82.
- Liu X., Dakic A., Zhang Y., Dai Y., Chen R., Schlegel R. (2009): HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106(44)**, 18780-18785.

- Mantovani F., Banks L. (2001): The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20(54)**, 7874-7887.
- McBride A.A., Warburton A., Spindler K.R. (2017): The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathogens*, **13(4)**.
- McIntosh P.B., Laskey P., Sullivan K., Davy C., Wang Q., Jackson D.J., Griffin H.M., Doorbar J. (2010): E1^{E4}-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *Journal of Cell Science* **123(16)**, 2810-2822.
- McLaughlin-Drubin M.E., Münger K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, **384(2)**, 335-344.
- Mechl Z., Lovasová Z. (2010): Lidský papilomavirus a nádory hlavy a krku. *Remedia* **20**, 81-85.
- Mechl Z., Neuwirthová J. (2011): Cetuximab rozšiřuje léčebné možnosti nádorů hlavy a krku. *Onkologics* **5(4)**, 219-224.
- Migaldi M., Pecorari M., Forbicini G., Nanni N., Grottola A., Grandi T., Delle Donne G., Leocata P., Trovato D., Sgambato A. (2012): Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **41(1)**, 16-20.
- Mitra A., Chakrabarti J., Banerji A., Das S., Chatterjee A. (2006): Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2. *Journal of cancer research and clinical oncology* **132(8)**, 505–513
- Munger K., Gwin T.K., McLaughlin-Drubin M.E. (2013): p16 in HPV-associated cancers. *Oncotarget* **4(11)**, 1864–1865.
- Nováková V., Laco J. (2008): Role of human papillomavirus in carcinogenesis of head and neck cancer. *Klinická Onkologie* **21(4)**, 141-148.
- Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S. (2002): Integrated human papilloma-virus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* **40(3)**, 886-91.
- Prigge E.S., Arbyn M., von Knebel Doeberitz M., Reuschenbach M. (2017): Diagnostic accuracy of p16^{INK4a} immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer* **140(5)**, 1186–1198.
- Rautava J., Syrjänen S. (2012): Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head and Neck Pathology* **6(S1)**, 3–15.
- Roberts S., Ashmole I., Johnson G.D., Kreider J.W., Gallimore P. H. (1993): Cutaneous and Mucosal Human Papillomavirus E4 Proteins Form Intermediate Filament-like Structures in Epithelial Cells. *Virology* **197(1)**, 176–187.
- Sanchez-Perez A.M., Gaston K., Soriano S., Clarke A.R. (1997): Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *Journal of General Virology* **78(11)**, 3009-3018.
- Seiwert T.Y., Zuo Z., Keck M.K., Khattri A., Pedomallu C.S., Stricker T., Brown C., Pugh T.J., Stojanov P., Cho J., Lawrence M.S., Getz G., Brägelmann J., DeBoer R., Weichselbaum R.R., Langerman A., Portugal L., Blair E., Stenson K., Lingen M.W., Hammerman P.S. (2015): Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **21(3)**, 632–641.
- Senapati R., Senapati N.N., Dwibedi B. (2016): Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious agents and cancer* **11**, 59.
- Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63(6)**, 1129-1136.
- Schiffman M.H., Bauer H.M., Lorincz A.T., Manos M.M., Byrne J.C., Glass A.G., Cadell D.M., Howley P.M. (1991): Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *Journal of clinical microbiology* **29(3)**, 573–577.
- Schlecht N., Brandwein-Gensler M., Nuovo G., Li M., Dunne A., Kawachi N., Smith R.V., Burk R.D., Prystowsky M.B. (2011): A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol* **24**, 1295–1305.

- Schmitt M., Dondog B., Waterboer T., Pawlita M. (2008): Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *Journal of clinical microbiology* **46(3)**, 1050–1059.
- Schuck S., Stenlund A., Imperiale M.J. (2015): A Conserved Regulatory Module at the C Terminus of the Papillomavirus E1 Helicase Domain Controls E1 Helicase Assembly. *Journal of Virology* **89(2)**, 1129-1142.
- Sonnex C., Strauss S., Gray J.J. (1999): Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sexually transmitted infections* **75(5)**, 317–319.
- Specenier P., Vermorken J.B. (2011): Cetuximab in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert Rev. Anticancer Ther* **11(4)**, 511–524.
- Stanley M.A., Pett M.R., Coleman N. (2007): HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* **35(6)**, 1456-1460.
- Straight S.W., Herman B., McCance D.J. (1995): The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *Journal of virology* **69(5)**, 3185–3192.
- Taberna M., Torres M., Alejo M., Mena M., Tous S., Marquez S., Bravo I.G. (2018): The Use of HPV16-E5, EGFR, and pEGFR as Prognostic Biomarkers for Oropharyngeal Cancer Patients. *Frontiers in Oncology* **8**.
- Tachezy R., Klozar J., Saláková M., Smith E., Turek L., Betka J., Hamšíková E. (2005): HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Diseases* **11(3)**, 181–185.
- Thomas M., Pim D., Banks L. (1999): The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690–7700.
- Trzcinska A., Zhang W., Gitman M., Westra WH (2020): The Prevalence, Anatomic Distribution and Significance of HPV Genotypes in Head and Neck Squamous Papillomas as Detected by Real-Time PCR and Sanger Sequencing. *Head and Neck Pathol* **14**, 428–434.
- Tsai T.C., Chen S.L. (2003): The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Archives of Virology* **148(8)**, 1445-1453.
- Tsakogiannis D., Ruether I.G.A., Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Skordas V., Gartzonika, C., Markoulatos P. (2012): Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece. *Archives of Virology* **157(9)**, 1729–1739.
- Van Doorslaer K., Burk R.D. (2012): Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology* **433(1)**, 216-219.
- Veldman T., Horikawa I., Barrett J.C., Schlegel R. (2001): Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of virology* **75(9)**, 4467–4472.
- Venuti A., Paolini F. (2012): HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathol* **6**, 63–74.
- Vidal Loustau A.C., Dulguerov N., Curvoisier D., McKee T., Lombardi T. (2019): Low prevalence of HPV-induced oral squamous cell carcinoma in Geneva, Switzerland. *Oral Diseases* **25(5)**, 1283-1290.
- Wilcox J.N. (1993): Fundamental principles of in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **41(12)**, 1725-1733
- Yim E.K., Park J.S. (2005): The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment* **37(6)**, 319–324.
- You E.L., Henry M., Zeitouni A.G. (2019): Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management. *Current oncology (Toronto, Ont.)* **26(2)**, 119–123.
- Zaravinos A., Mamas I.N., Sourvinos G., Spandidos D. A. (2009): Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *The International Journal of Biological Markers* **24(4)**, 215-222.
- Zheng Z.M., Baker C.C. (2006): Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience* **11(1)**, 286-302.
- Ref. 1: HPV-college home page: <https://www.hpv-college.cz/o-hpv> (17.1.2021)

- Ref. 2: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR home page: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--klasifikace--tnm-klasifikace-zhoubnych-novotvaru> (9.3.2021)
- Ref. 3: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR home page: https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/TNM_8_Presentace_Klasifikace_zhoubnych_novotvaru.pdf (29.3.2021)
- Ref. 4: GARGTEST home page: <https://www.gargtest.com/> (9.5.2021)
- Ref. 5: Příbalový leták Zybio Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method). Zybio Inc.
- Ref. 6: Cambridge bioscience home page: <https://www.bioscience.co.uk/cpl/exm6000> (8.5.2021)
- Ref. 7: QIAamp® DSP Virus Spin Kit Instructions for Use. QIAGEN GmbH, January 2021
- Ref. 8: QIAGEN home page: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiaamp-dsp-virus-spin-kit/> (18.5.2021)
- Ref. 9: LAB Guide home page: <https://labguide.cz/taqman-sondy/> (12.5.2021)
- Ref. 10: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR home page: <https://nsc.uzis.cz/res/file/zpravy/2018-07-12-priloha-03-epidemiologie-hpv-related-cancers.pdf> (27.5.2021)