



Struktura i właściwości wirusa brodawczaka ludzkiego

Justyna Broniarczyk, Maria Magdalena Koczorowska,
Julia Durzyńska, Alicja Warowicka, Anna Goździcka-Józefiak
Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Poznań

The structure and properties of *Human papillomavirus*

Summary

Human papillomaviruses (HPVs) are a large group, with over 100 genotypes, of small nonenveloped, double-stranded DNA viruses. HPV types may be classified by infection location on the body each virus tends to infect and its potential for oncogenesis. 'High-risk' and 'low-risk' nomenclature was proposed for HPV genotypes (HPV-HR and HPV-LR). HPV is the major etiologic factor in cervical cancer and is found in the majority of cervical tumors. The major mechanisms through which HPV contributes to neoplastic initiation and progression include the activity of two viral oncoprotein, E6 and E7, which interfere with critical cell cycle tumor suppressive proteins, p53 and pRB. However, HPV infection is not a sufficient cause of cervical cancer and other cofactors contribute to the multi-step process or tumor formation, such as individual genetic variation as well as environmental factors.

Recently, prophylactic HPV vaccines have been shown to be effective in preventing infection in young women.

Key words:

Human papillomavirus (HPV), cervical cancer, prophylactic HPV vaccines.

Adres do korespondencji

Anna Goździcka-Józefiak,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Umultowska 89,
61-614 Poznań;
e-mail:
agjozef@amu.edu.pl

1. Wstęp

W roku 2008 laureatem jednej z Nagród Nobla był prof. Harald zur Hausen. Nagrodę tę otrzymał za odkrycie wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *Human papillomavirus*). Profesor zur Hausen nie tylko odkrył HPV, ale także opisał rolę, jaką ten

wirus pełni w rozwoju raka szyjki macicy oraz współuczestniczył w opracowaniu szczepionki przeciw najbardziej onkogennym typom wirusa.

Ludzkie wirusy brodawczaka HPV należą do rodziny *Papillomaviridae*. HPV mają nieosłonięty wirion o symetrii ikosaedralnej i średnicy 55 nm. Kapsyd zbudowany jest z dwóch białek strukturalnych: 360 kopii białka L1 i 12 kopii białka L2 zorganizowanych w 72 kapsomery (1-3). Genom wszystkich wirusów brodawczaka ma postać kolistej, kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki dsDNA, zbudowanej z około 8 tysięcy par zasad, zasocjowanej z histonami tworząc strukturę podobną do chromatyny (4). Tylko jedna nić DNA jest kodująca i zawiera do 8 nachodzących na siebie otwartych ramek odczytu (rys. 1).

Wirusy HPV wykazują tropizm do komórek nabłonka wielowarstwowego błon śluzowych i skóry. Do zakażenia komórek warstwy podstawnej nabłonka dochodzi w wyniku urazu skóry lub naskórka. Replikacja wirusów HPV jest zależna od wirusowych i komórkowych białek regulatorowych oraz ściśle skorelowana z procesem różnicowania komórek nabłonka (5-7).

Klinicznym efektem zakażenia wirusem HPV są brodawki skóry oraz błon śluzowych jamy ustnej, dróg oddechowych, narządów płciowych, układu moczowego i odbytu. Wiele wirusów brodawczaka jest odpowiedzialnych za zakażenie dróg płciowych, które mogą często prowadzić do stanu zapalnego, kłykcin płaskich i kończystych, inicjacji stanów przednowotworowych, jak również płaskonabłonkowych i gruczolowych raków szyjki macicy. Patogeny te powodują także zmiany skórne, objawiające się występowaniem m.in. brodawek płaskich, plam barwnikowych i rumieniowych, które często stanowią punkt wyjścia dla inicjacji procesu nowotworowego (6). Postać powstałego schorzenia zależy w dużym stopniu od typu wirusa HPV zakażającego nabłonek.

Dotychczas poznano przeszło 100 różnych typów wirusa HPV. Grupę tę można podzielić na: α , β , γ , μ i ν . Z tego 60 typów wirusa atakujących nabłonek szyjki macicy zaliczanych jest do grupy α , w tym około 30 jest związanych ze zmianami nabłonka prowadzącymi do rozwoju raka szyjki macicy. Wirusy β zakażają skórę, natomiast pozostałe wirusy (grupy γ , μ i ν) są odpowiedzialne za powstanie brodawek, które z reguły nie ulegają transformacji nowotworowej (8,9).

Biorąc pod uwagę potencjał onkogenny tych wirusów, możemy je podzielić na wirusy niskiego, średniego i wysokiego ryzyka (tab. 1) (5-7).

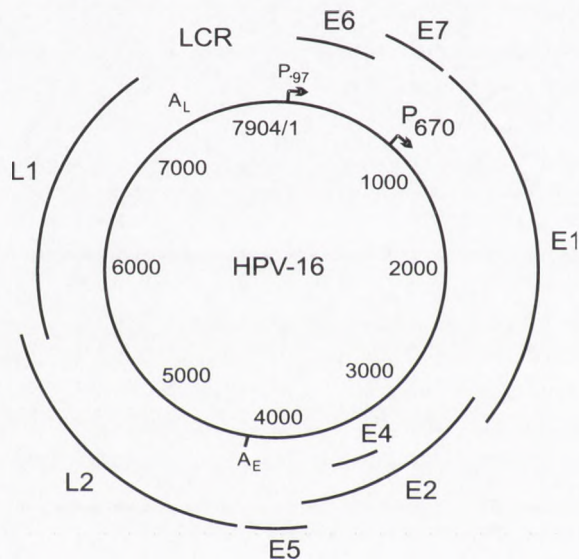
Tabela 1

Klasyfikacja ludzkich wirusów HPV na podstawie ich potencjału onkogennego, określonego jako prawdopodobieństwo wystąpienia transformacji nowotworowej w wyniku zakażenia (10)

Potencjał onkogenny	Typ wirusów HPV
wirusy niskiego ryzyka	6, 11, 42, 43, 44
wirusy średniego ryzyka	33, 35, 39, 51, 52
wirusy wysokiego ryzyka	16, 18, 31, 45, 56

2. Struktura i organizacja genomu wirusa brodawczaka ludzkiego

Materiał genetyczny ludzkich, jak i zwierzęcych wirusów brodawczaka zorganizowany jest tak samo. W jego genomie można wyróżnić trzy rejony: wczesny (E) – kodujący białka niestrukturalne wirusa, późny (L) – kodujący białka strukturalne oraz długi rejon regulatorowy (LCR lub NCR) (ang. *Long Control Region, Noncoding Region*) (5,6). Rejony E i L przedzielone są dwoma miejscami poliadenylacji: wczesnym A_E i późnym A_L (rys. 1). Najbardziej zachowawczy jest region kodujący białka E1 i L1, natomiast najmniej – LCR. Rejon regulatorowy wirusa (LCR) umieszczony jest pomiędzy otwartymi ramkami odczytu L1 oraz E6 i zawiera około 1000 pz. Zlokalizowany jest w nim promotor (P_{97} u wirusa HPV16) oraz liczne sekwencje funkcjonujące jako wzmacniacze (ang. *enhancer*) i wyciszacze (ang. *silencer*) transkrypcji wirusowych genów. Dotychczas zidentyfikowano około dwudziestu czynników białkowych wiążących się z określonymi elementami sekwencji w LCR. Należą do nich takie białka komórkowe jak: AP-1 (ang. *Activating Protein-1*), AP-2 (ang. *Activating Protein-2*), CDP (ang. *CCAAT Displacement Protein*), CEF-1, CEF-2 (ang. *Cellular*), NF-1 (ang. *Nuclear Factor-1*), NF κ B (ang. *Nuclear Factor E2 Site Binding Factor*), c/EBP β (ang. *CCAAT Enhancer Binding Protein*), c-Myc (ang. *Myelocytomatosis*), OCT-1 (ang. *Octamer Binding Factor-1*), PEF-1 (ang. *Papillomavirus Enhancer Factor-1*), SP1 (ang. *Simian-Virus-40 Prote-*



Rys. 1. Schemat genomu wirusa brodawczaka: LCR – długi rejon regulatorowy, L1-L2 – otwarte ramki odczytu kodujące białka późne wirusa, E1-E7 – otwarte ramki odczytu kodujące białka wczesne wirusa, A_L – późne miejsca poliadenylacji, A_E – wczesne miejsca poliadenylacji, P_{97} – wczesny promotor, P_{670} – późny promotor; numery zawarte w wewnętrznym okręgu wskazują pozycję nukleotydów (wg 5).

in-1), TEF-1 (ang. *Transcription Enhancer Factor 1*), TEF-2, TBP (ang. *TATA Binding Protein*), YY1 (ang. *Yin and Yang 1*), receptory dla hormonów steroidowych oraz białko wirusowe E2 (11-16). Obecność licznych miejsc wiążących czynniki komórkowe określa tropizm wirusa do komórek tkanek nabłonkowych. Białka te mogą aktywować, jak również hamować transkrypcję wirusowych genów w poszczególnych warstwach nabłonka. Aktywność tych czynników może być dodatkowo modulowana przez wiążące się z nimi liczne koaktywatory. W rejonie LCR występują także cztery miejsca wiązania wirusowego białka E2 o sekwencji CN₆GGT.

Geny wczesne wirusa – E (ang. *Early Genes*) kodują białka regulatorowe – E1, E2, E4, E5, E6, E7 – odpowiedzialne za utrzymanie się wirusowego genomu w komórce, jego replikację i aktywację cyklu litycznego. Białko E1 ma aktywność helikazy DNA zależnej od ATP i wiąże się do miejsca inicjacji replikacji wirusowego genomu (*ori*), inicjując replikację jego formy episomalnej. Białko E2 pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, a ponadto oddziałuje z E1 poprzez domenę zlokalizowaną na końcu C cząsteczki, wspomagając wiązanie się białka E1 z rejonem *ori*. Proteiny E1 i E2 nie tylko regulują replikację wirusowego DNA i są odpowiedzialne za utrzymanie go w formie episomalnej w zakażonej komórce, ale również kontrolują segregację wirusowego DNA podczas podziałów komórki (17-20). Na końcu N białka E2 występuje domena transaktywująca zdolna do aktywowania, jak i hamowanie transkrypcji genów nie tylko wirusowych, ale również komórkowych. Białko to oddziałuje z komórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi, jak SP1, C/EBP, CBP/p300, pCAF. Najlepiej poznano białko E2 wirusa zwierzęcego BPV1 (ang. *Bovine papillomavirus*).

Występuje ono w trzech formach: E2-TA, E2TR i E8-E2. Białko E2-TA o masie cząsteczkowej 48 kDa pełni funkcję aktywatora transkrypcji oraz bierze udział w inicjacji replikacji, natomiast jego formy krótsze E2TR (30 kDa) i E8-E2 (28 kDa), pozbawione sekwencji na końcu C, są jej represorami. Takich form nie obserwowano w przypadku białek E2 wirusa HPV, chociaż ich występowania nie można wykluczyć, ponieważ powstaje ono na matrycy składanych na kilka sposobów mRNA. Białko E2 wiąże się z DNA w formie dimeru (21-25), a także może tworzyć kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi C/EBP, które regulują transkrypcję licznych genów odpowiedzialnych za różnicowanie komórek. Na aktywność transkrypcyjną i replikacyjną wirusowego DNA wpływa także jego organizacja w struktury podobne do chromatyny. W rejonie LCR wirusa występują miejsca, do których przyłączają się białka macierzy jądrowej – MAR (ang. *Matrix Attachment Region*) (26).

Otwarta ramka odczytu E4 koduje białko o słabo poznanej funkcji – prawdopodobnie bierze ono udział w uwalnianiu wirionów potomnych z komórki, destabilizując włókna keratynowe. Do innych białek wirusowych należą E5, E6 i E7. Białko E5 jest małym białkiem hydrofobowym, które może asocjować z błoną aparatu Golgiego, endosomów i cytoplazmatyczną. Białka E6 i E7 oddziałują natomiast z regulatorami cyklu komórkowego: proteinami P53 i RB, i umożliwiają wejście komórki w fazę S cyklu komórkowego (7,8). Geny późne – L (ang. *Late Genes*) kodują białka

strukturalne L1 i L2 tworzące kapsyd oraz są odpowiedzialne za wnikanie wirionów do komórki, składanie i uwalnianie wirionów potomnych, a także ich infekcyjność (7,8,27). Funkcje wirusowych białek przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Właściwości i funkcje białek wirusów HPV (wg 7,8)

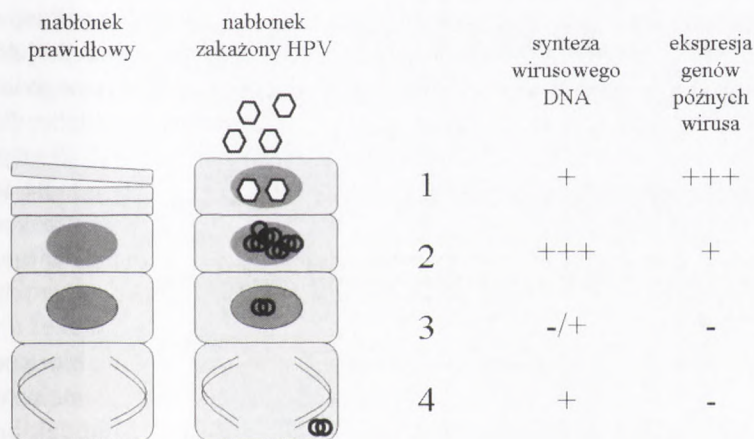
Nazwa białka	Liczba aminokwasów	Masa cząsteczkowa (kDa)	Właściwości	Funkcje
1	2	3	4	5
E1	649	73	– ATP zależna helikaza DNA	– inicjacja replikacji wirusowego DNA – razem z białkiem E2 odpowiada za utrzymanie DNA wirusowego w postaci episomalnej
E2	365	41,8	– hydrofobowe – aktywator, represor transkrypcji	– razem z białkiem E1 bierze udział w replikacji wirusowego DNA i jego segregacji podczas podziałów komórki (asocjuje do mitotycznych chromosomów) – regulacja transkrypcji i kontrola ekspresji genów wczesnych E6 i E7
E4	95	10,5	– zachowawczy koniec N bogaty w reszty leucynowe, – może ulegać fosforylacji	– uwalnianie wirionów potomnych – destabilizacja włókien keratynowych w komórce – zdolne do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2
E5	83	9,4	– hydrofobowe – onkogenne – białko błonowe	– obniża poziom białek MHC klasy I i II – hamuje apoptozę
E6	158	19,2	– aktywator transkrypcji – onkogenne – zawiera dwie domeny o strukturze palców cynkowych	– udział w regulacji replikacji wirusa – oddziałuje z komórkowym białkiem P53
E7	98	11	– aktywator transkrypcji – onkogenne – zawiera jeden motyw o strukturze palca cynkowego	– udział w regulacji replikacji wirusa – oddziałuje z komórkowym białkiem pRB
L1	531	59,4	– może ulegać glikozylacji – właściwości antygenowe – zachowawcza sekwencja wśród różnych typów wirusów HPV	– główne białko kapsydu

1	2	3	4	5
L2	473	50,6	<ul style="list-style-type: none"> - może ulegać fosforylacji - właściwości antygenowe - może wiązać się z DNA - zróżnicowana sekwencja wśród różnych typów wirusów HPV 	<ul style="list-style-type: none"> - białko kapsydu - rekrutacja wirusowych genomów w czasie składania cząstek potomnych - transport wirusowego DNA do jądra

3. Cykl produktywny wirusów HPV

Produktywny cykl replikacyjny wirusów HPV jest zależny od procesu dojrzewania nabłonka, specyficznych czynników komórkowych, ustrojowych oraz białek wirusowych (rys. 2). Wirusy HPV zakażają komórki warstwy podstawnej nabłonka i do zakażenia dochodzi w wyniku powstałych miniurazów. Wirus wnika do komórek warstwy podstawnej nabłonka po uprzednim związaniu się z odpowiednim receptorem na ich powierzchni. Wciąż nie w pełni wyjaśniono, jaki rodzaj receptora bierze udział w zakażeniu komórki wirusem brodawczaka. Sugeruje się, że wirusy HPV wiążą się z siarczanem heparyny lub integrynami (28,29).

Proces wnikania wirusa do komórki inicjuje białko L1. Skuteczność zakażenia zwiększa obecność białka L2 (30). Wirusy HPV wnikają do komórki na drodze endocytozy związanej z klatryną (ang. *Clathrin-Coated Endocytosis*), np. wirus HPV16, lub



Rys. 2. Ekspresja i replikacja wirusowego materiału genetycznego w poszczególnych warstwach dojrzewającego nabłonka. Warstwy nabłonka: 1 – warstwa zrogowaciała naskórka (*stratum corneum*), 2 – warstwa ziarnista (*stratum granulosum*), 3 – warstwa kolczysta (*stratum spinosum*), 4 – warstwa podstawna (*stratum basale*);

+ słaba – synteza wirusowego DNA lub ekspresja genów późnych wirusa,
 ++ silniejsza – synteza wirusowego DNA lub ekspresja genów późnych wirusa,
 +++ wysoka – synteza wirusowego DNA lub ekspresja genów późnych wirusa.

za pomocą kaweoli, np. HPV31 (30,31). Wirusowy materiał genetyczny ulega odplaszczeniu w późnych endosomach lub/i lizosomach, a następnie jest transportowany do jądra komórkowego za pomocą białka L2 (31). Transport kompleksu białko L2 – wirusowy DNA do jądra komórkowego ułatwia receptor związany z retikulum endoplazmatycznym – syntaksyna 18 (ang. *Syntaxin 18*). Z receptorem tym białko L2 wiąże się poprzez swój koniec N w cząsteczce. Wirusowa proteina L2 oddziałuje także poprzez koniec C cząsteczki z białkiem motorycznym – dyneiną (32-34).

W zakażonych komórkach wirusowy genom występuje w niewielu kopiach (10-100), w formie episomalnej (7,8). Za utrzymanie DNA w takiej formie odpowiedzialne są wirusowe białka E1 i E2. W komórkach tych ekspresja wirusowych białek wczesnych jest bardzo niska. Podobne właściwości antyproliferacyjne wykazuje białko E2 HPV, które w dużych ilościach może wywołać apoptozę (35). Podczas różnicowania nabłonka dochodzi do aktywacji promotora genów wczesnych (p97 u HPV16) oraz ekspresji genów E6 i E7, niezbędnych do wejścia komórki w fazę S cyklu komórkowego. Podczas prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusów HPV ekspresja białek E6 i E7 jest ściśle kontrolowana przez wirusowe białka E1 i E2, i utrzymywana na niskim poziomie. Niskie stężenie białek onkogennych wystarcza do stymulacji cyklu replikacyjnego wirusa i nie zaburza procesu różnicowania komórek nabłonkowych (7,8).

Obydwa wspomniane białka wirusowe E6 i E7 biorąc udział w stymulacji cyklu komórkowego oddziałują z komórkowymi regulatorami tego cyklu. E7 wiąże się z pRB, co prowadzi do uwolnienia czynnika E2F z kompleksu pRB-E2F i ekspresji białek niezbędnych do replikacji DNA. Może także asocjować z innymi białkami zaangażowanymi w proliferację komórek, jak deacylaza histonowa, inhibitorami kinaz zależnymi od cyklin – białkami p21 i p27 (36-38). Drugie białko wirusowe E6 oddziałuje z kolei z białkiem p53, prowadząc do jego inaktywacji, jak również z białkami proapoptotycznymi BAX i BCL. Podczas cyklu produktywnego wirusa ekspresja białek E6 i E7 jest ściśle kontrolowana przez wirusowe białko E2 (39,40).

Drugi wirusowy promotor jest aktywowany w zróżnicowanych keratynocytach, efektem czego jest wzrost ekspresji białek wirusowych – E1, E2, E4 i E5, ułatwiających powielenie wirusowego genomu. Cykl produktywny wirusa kończy upakowanie wirusowego genomu do kapsydu zbudowanego z białek wirusowych L1 i L2. Do syntezy tych białek oraz białka E4 dochodzi po zreplikowaniu wirusowego genomu w górnych warstwach nabłonka (8).

W składaniu i uwalnianiu wirusowych cząstek prawdopodobnie biorą udział białka E4 i E2. Obecność w rejonie regulatorowym wirusa licznych miejsc wiążących czynniki komórkowe oraz pokrywanie się ich sekwencji wskazuje, jak precyzyjnie regulowana i kontrolowana jest ekspresja wirusowych genów w poszczególnych warstwach nabłonka. Cykl produktywny wirusa kończy się wytworzeniem pełnych wirusowych cząstek, uwalnianych z komórki na drodze egzocytozy.

Główną rolę w składaniu wirionów potomnych odgrywa białko L2, zdolne do wiązania się z DNA oraz wpływające na stabilność i formowanie się kapsydów. W czasie procesu składania wirionów potomnych jest ono odkładane w rejonie struktur

jądrowych, zwanych ciałami POD (ang. *PML Oncogenic Domain*) lub ND-10 (ang. *Nuclear Domain-10*), określanymi jako miejsce replikacji wirusowego DNA i składania wirionów potomnych (7,8,41,42). Cząstki wirusopodobne (ang. *Virus Like Particles*) mogą powstawać mimo braku białka L2, jednak jego obecność znacznie zwiększa szybkość składania wirionów potomnych, a także wpływa na ich właściwości zakaźne (43,44).

Jednym z najsłabiej poznanych etapów produktywnego cyklu replikacyjnego wirusów HPV jest proces ich uwalniania z keratynocytów. W przeciwieństwie do większości wirusów typu DNA, pozbawionych otoczki, wirusy HPV nie dokonują tego w wyniku lizy komórki. Proces uwalniania zachodzi tylko w górnych warstwach komórek nabłonka. Sugeruje się, że istotną rolę w tym procesie odgrywa białko E4, powodując prawdopodobnie zmiany w stabilności włókien keratynowych (7,8,45). Cząstki potomne wirusa mogą ponownie zakażać komórki nabłonka lub są neutralizowane przez układ odpornościowy (7,8).

4. Struktura i ekspresja DNA wirusów brodawczaka

W genomie wirusa HPV16 znajdują się dwa główne promotory: P97 – leżący powyżej E6 ORF, odpowiedzialny za transkrypcję prawie wszystkich genów wczesnych, oraz P670 – położony w obrębie E7 ORF, odpowiedzialny za ekspresję genów późnych (P670 – wirusy HPV16, P742 – wirusy HPV31) (46,47). Zidentyfikowano również inne miejsce promotorów, jednak ich funkcja nie została dotąd poznana.

Promotor P97 (a także jego odpowiedniki u innych typów wirusów HPV) jest bardzo silny i podlega ścisłej kontroli poprzez znajdujące się powyżej elementy *cis* w rejonie LCR. Są tam m.in. miejsca wiązania ACC(N₆)GGT białka E2, działającego jako transaktywator lub represor transkrypcji (48). Transkrybowane z promotora P97 pierwotne transkrypty wczesne podlegają alternatywnemu splicingowi oraz poliadenylacji.

Promotor P670 (jak i jego odpowiedniki u innych typów wirusa HPV) jest aktywny jedynie w dojrzałych keratynocytach. Ponieważ promotor ten umiejscowiony jest wewnątrz genu E7, pierwotny transkrypt składa się z fragmentu genów wczesnych po stronie 5' oraz rejonu późnego po stronie 3'. W ten sposób z jednego pierwotnego transkryptu mogą powstać zarówno transkrypty dla genów wczesnych, jak i późnych, z tym że te ostatnie produkowane są tylko w zróżnicowanych keratynocytach.

W najnowszych badaniach wykazano, że w komórkach zakażonych wirusem HPV jest podwyższona ekspresja niektórych czynników splicingowych, takich jak białka należące do rodziny SR, hnRNPA1, SF2/ASF. Podwyższony poziom ekspresji tych czynników korelował też z pojawianiem się mRNA dla białka L1. W aktywację transkrypcji tych czynników może być zaangażowane białko E2 wirusa (49,50). Pierwsze doniesienia na temat bezpośredniego udziału białek wirusowych w splicingu pochodzą z 1999 r., kiedy to Lai i wsp. wykazali, że białko E2 wirusa HPV5 ma rejon bogaty w serynę i argininę, przypominając swą budową białka splicingowe z rodziny SR. W badaniach prowadzonych nad tym białkiem wykazano, że jest ono zlokalizo-

wane w tym samym miejscu w komórce (kolokalizuje), a także wchodzi w interakcję z białkami z rodziny SR oraz związanymi z snRNP (51,52).

Sugeruje się, że podwyższony poziom ekspresji białek z rodziny SR może stanowić biomarker chorób związanych z wirusem HPV (53). Białko E1^{HPV1}, a także HPV16 i HPV18 oddziałują z komórkową kinazą białek SR SRPK1, zmniejszając jej zdolności do autofosforylacji. Nie można wykluczyć, że skutek zaburzeń w zdolnościach kinazy SRPK1 do fosforylacji, funkcjonowanie jej substratów – białek SR może być zaburzone w komórkach, gdzie zachodzi ekspresja E1^{HPV1} (54).

W najnowszych badaniach wykazano, że białka E2 i E6 mogą przyłączać się bezpośrednio do RNA; E2 za pośrednictwem domeny oddziałującej z DNA, natomiast E6 – poprzez swój koniec karboksylowy. Ponadto pokazano, że białka E2 i E6 wirusa HPV16 działają supresorowo na splicing wielu rodzajów pre-mRNA poprzez swoje końce aminowe. Co więcej, białka E2 i E6 wirusa HPV16, mimo że nie mają powtórzeń serynowo-argininowych, mogą oddziaływać z białkami SR i blokować splicing. Jednakże, molekularny mechanizm hamowania splicingu przez białka wirusa HPV16 nie został, jak dotąd, wyjaśniony (55).

5. Mechanizm kancerogenezy komórek nabłonka szyjki macicy przy udziale wirusów HPV

Ludzki wirus brodawczaka stanowi główny czynnik w etiologii raka szyjki macicy. Obecność materiału genetycznego wirusów HPV jest wykrywalna w 99,7% raków. Najczęściej identyfikowanym typem wirusa jest HPV16 (obecny w ok. 60% przypadków), następnie HPV18 (ok. 18%), HPV45 (8%) i HPV31 (5%) (56).

Rak szyjki macicy to jeden z najczęstszych nowotworów narządów płciowych kobiet w Polsce, o współczynniku zachorowalności 20 i umieralności 10,9 (57). Proces kancerogenezy komórek nabłonka szyjki macicy jest wieloetapowy, trwa od 12 do 15 lat i chociaż rozpoczęty, nieleczony, nie zawsze kończy się rakiem inwazyjnym, a nawet może ulec samoistnej regresji.

W licznych danych klinicznych i epidemiologicznych wskazuje się, że czynnikami zwiększającymi ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy zakażonej HPV są: predyspozycje genetyczne, immunosupresja, wczesne rozpoczęcie życia płciowego, liczni partnerzy seksualni, złe warunki materialne, palenie papierosów, przewlekłe długotrwałe stosowanie hormonalnej antykoncepcji, częste stany zapalne pochwy, a przede wszystkim przetrwałe zakażenia onkogennymi typami ludzkiego wirusa brodawczaka HPV (58,59).

Czynniki współdziałające z wirusem w procesie kancerogenezy szyjki macicy nie są poznane. Nieznane są także markery umożliwiające wczesne wykrycie tej choroby.

Cykl produktywny HPV jest ściśle skorelowany i zależny od dojrzewania nabłonka. Z tego względu zaburzenia w cyklu rozwojowym wirusa spowodowane nieprawidłowym dojrzywaniem nabłonka, jak również zmianami w strukturze wi-

rusowego genomu mogą prowadzić do zahamowania cyklu replikacyjnego wirusa i rozwoju procesu nowotworowego. Za proces ten mogą być odpowiedzialne liczne czynniki endogenne, np. mutacje w genach odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój nabłonka, zaburzenia hormonalne, nieprawidłowe działanie układu odpornościowego oraz fizyczne, chemiczne i biologiczne czynniki egzogenne, np. zakażenia innymi patogenami bakteryjnymi czy wirusowymi. W jednym z modeli kancerogenezy przy udziale wirusów HPV zakłada się, że do rozwoju tego procesu dochodzi w wyniku integracji wirusowego DNA do genomu gospodarza. Zintegrowany DNA wirusowy z genomem gospodarza obserwuje się w 70% raków szyjki macicy. W pozostałych przypadkach komórki nowotworowe zawierają wirusowy DNA w formie episomalnej lub obie jego formy – zarówno episomalną jak i zintegrowaną (60).

Integracja wirusowego DNA do genomu gospodarza prowadzi do przzerwania sekwencji kodującej białko E2, nadekspresji białek onkogennych E6, E7 i E5, a w konsekwencji niekontrolowanej proliferacji zakażonych komórek (7,8,61,62). Białko E6 wirusów o dużym potencjale onkogennym zawiera w cząsteczce dwa motywy o strukturze CXXC wiążące cynk, natomiast na końcu C domenę PDZ (63,64).

Domena PDZ jest obecna w licznych białkach (PSD-95, Dlg i ZO-1) odpowiedzialnych za kontakt komórek, połączenia międzykomórkowe oraz regulację szlaków przekazu sygnału w komórce (65-68). Białko E6 bierze udział w degradacji komórkowego białka supresorowego p53. Proces ten jest poprzedzony utworzeniem kompleksu E6 ze specyficzną ligazą ubikwitynową E6AP, do którego przyłączane jest białko p53 (30,31). Inicjuje to degradację białka p53 w proteosomach. E6 może także obniżać aktywność białka p53 w sposób pośredni, w wyniku przyłączenia koaktywatorów białka p53; białka p300/CBP (32). Brak w komórce białka p53 uniemożliwia regulację cyklu komórkowego (w punktach G1/S i G2/M) naprawę DNA oraz apoptozę. Degradacja p53 może również prowadzić do zahamowania różnicowania komórek na szlaku p53/Notch1. Białko Notch1 determinuje różnicowanie keratynocytów, a jego ekspresja jest aktywowana przez p53, tak więc E6 pośrednio przez degradację p53 hamuje ekspresję Notch1 (69).

W najnowszych badaniach wykazano również, że białka E6 wirusów HPV wysokiego ryzyka mogą zwiększać aktywność telomerazy poprzez indukowanie ekspresji katalitycznej podjednostki telomerazy hTERT na poziomie transkrypcji. W promotorze hTERT znajduje się miejsce przyłączenia *c-myc*. Wykazano, że białko E6 oddziałuje bezpośrednio z *c-myc* i kompleks *c-myc*/E6 aktywuje ekspresję hTERT, co w efekcie prowadzi do zwiększonej proliferacji komórek (70). Białko E6 HPV oddziałuje także z innymi białkami komórkowymi, w tym z białkiem EF wiążącym wapń, z czynnikiem regulującym aktywność interferonu IRF-3 oraz białkiem adhezyjnym paksyliną (71-73). Powszechnie wiadomo, że wczesne białka wirusa HPV typu wysokiego ryzyka mają właściwości onkogenne, a nawet w sposób decydujący wpływają na rozwój raka (74). Poza tym, białko E6 oddziałuje również z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, jak p300 i ADA3 (75), a także wykazano możliwość

jego interakcji z innymi białkami, takimi jak: E6-BP (ang. *Reticulocalbin 2*), IRF-3(ang. *Interferon Regulatory Factor*), czy paksyliną (76).

Drugie białko wirusa HPV – E7, o wysokim potencjale onkogennym, zdolne jest do wiązania się z białkiem RB odpowiedzialnym za supresję transformacji nowotworowej komórki, jak również z innymi białkami zaangażowanymi w regulację cyklu komórkowego. Podobnie jak inne wirusowe onkoproteiny, potrafi modyfikować funkcje kompleksów formowanych przez białka komórkowe. Nieufosforylowane białko RB w komórce tworzy kompleks z czynnikami transkrypcyjnymi E2F/DP1. Kompleksy takie wiążą się z promotorami genów zaangażowanych w progresję fazy S cyklu komórkowego, jak również apoptozę hamującą ich transkrypcję. Przejście komórki z fazy G1 cyklu do fazy S prowadzi do aktywacji specyficznych kinaz zależnych od cyklin i fosforylacji białka RB. W wyniku tego dochodzi do uwolnienia czynnika E2F z kompleksu i transkrypcji genów aktywnych w fazie S, których regulatorem jest E2F (77). Uwolnienie czynnika E2F z kompleksu z białkiem RB może także nastąpić po związaniu się białka E7 HPV z RB (78,79).

Sekwencja białka E7 na końcu N jest podobna do rejonów CR1 i CR2 białka E1A adenowirusa oraz sekwencji w antygenie T wirusa SV40. Wykazano, że mutacje w tych rejonach osłabiają lub znoszą właściwości onkogenne tych białek. Na końcu C białka E7 występują dwie kopie sekwencji CXXC przedzielone 29 aminokwasami, które biorą udział w wiązaniu metali, jak również w procesie dimeryzacji tego białka (80). Koniec C białka E7 bierze także udział w oddziaływaniach z enzymami modelującymi chromatynę, tj. deacetylazą histonową i transferazą acylową histonów. Białko E7 oddziałuje również z innymi białkami pokrewnymi RB, tj. p107 i p130. W oddziaływaniach te zaangażowane są zachowawcze sekwencje LXCXE zlokalizowane w rejonie CR2. Ponadto, białko E7 wpływa na wzrost poziomu cykliny A oraz uszkadza funkcjonowanie inhibitorów kinaz białkowych białek, tj. p21, ^{CIP1} p27 ^{KIP1}, odgrywających podstawową rolę w zahamowaniu cyklu komórkowego podczas różnicowania się keratynocytów (81-83). Białka E7 wirusów o wysokim potencjale onkogennym wiążą się także z deacylazą histonów – HDSX. W ten sposób E7 może wyciszać ekspresję genów odpowiedzialnych za aktywację interferonu. Białko E7 oddziałuje także z koaktywatorami transkrypcji: p300, CBP i pCAF (84).

Reasumując, właściwości onkogenne białek E6 i E7 wirusów HPV są związane z inaktywacją głównych regulatorów cyklu komórkowego i supresorów transformacji nowotworowej: p53 i Rb, natomiast z aktywacją telomerazy. Inaktywacja funkcji białek p53 i pRB biorących udział w regulacji cyklu komórkowego przez białka wirusowe E6 i E7 jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za transformację nowotworową komórek nabłonkowych. Efektem tego jest destabilizacja genomu komórkowego, promująca proces kancerogenezy. Takich zdolności transformujących nie mają białka E6 i E7 wirusów o niskim potencjale onkogennym. Związane jest to ze zmianami w strukturze rejonów odpowiedzialnych za ich specyficzne oddziaływania z białkami komórkowymi. Interakcje tych białek z białkami ko-

mórkowymi są znacznie słabsze i nie prowadzą do degradacji białek supresorowych, jak również aktywacji telomerazy.

Infekcyjność wirusa HPV i jego właściwości onkogenne zależą także od struktury rejonu regulatorowego. Pojedyncze zmiany nukleotydów w sekwencji LCR mogą mieć wpływ na wiązanie się z tym rejonem czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji wirusowych białek onkogennych. Z tego względu różne warianty wirusa mogą mieć odmienne właściwości onkogenne. Właściwości onkogenne ma także białko wirusowe E5, chociaż znacznie słabsze aniżeli E6 i E7 (85-87).

E5 jako białko transbłonowe oddziałuje z integralnymi białkami błonowymi pełniącymi funkcje pompy protonowej, m.in. H-ATPazą, opóźniając proces zakwaszenia endosomów, a ponadto z receptorem płytkowego czynnika wzrostu – PDGF (ang. *Plate-Derived Growth Factor*), prawdopodobnie z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu – EGF (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) oraz czynnikiem CSF (ang. *Colony Stimulating Factor*). Nadekspresja białka E5 w komórce prowadzi do zaburzenia degradacji receptorów dla epidermalnego czynnika wzrostu. W komórkach z nadekspresją onkoproteiny E5 obserwowano liczne zmiany morfologiczne związane z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz zaburzenia w endocytozie, m.in. w transporcie z wczesnych do późnych endosomów (88,90). Ponadto, w wyniku ekspresji E5 dochodzi do zaburzeń w syntezie i funkcjonowaniu białek MHC klasy I i II. Dokładna funkcja białka E5 w transformacji nowotworowej nie została jednak jeszcze w pełni wyjaśniona (91). Najprawdopodobniej białko E5 bierze udział w transformacji komórki na wczesnych etapach kancerogenezy, stymulując wzrost komórki oraz chroniąc komórkę przed apoptozą (89,90,92,93). Kolokalizowano je w komórce z białkiem hamującym apoptozę Bcl-2. E5 zapobiega apoptozie komórki indukowanej za pośrednictwem białek FasL lub TRAIL. TRAIL jest aktywowane w komórce po związaniu liganda jakim jest czynnik martwicy nowotworu natomiast Fas – przez specyficzny ligand FasL. Trimeryzacja zaktywowanych Fas lub TRAIL prowadzi do wiązania się specyficznych białek adapterowych FADD (Fas, ang. *Associated Death Domain*) zawierających tzw. domenę śmierci i aktywacji w komórce proapoptotycznych kaspaz. Ten szlak indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych został przerwany, co pozwala na ich niekontrolowaną proliferację.

Wykazano, że E5 jest także zdolne do aktywacji kinazy p38 i ERK1/2 w ludzkich keratynocytach poprzez mechanizm niezależny od aktywacji czynnika wzrostu. Może też stymulować takie komórkowe onkogeny, jak c-Jun, Jun B i c-Fos. Onkogen c-Jun jest aktywowany poprzez E5 przy udziale kinazy PKC, która aktywuje szlak przykazu sygnału do jądra komórkowego zależny od białka Ras. Efektem tego może być synteza białek AP-1 i NF-1. W rejonie regulatorowym wirusa HPV16 zidentyfikowano miejsca wiążące oba białka. Związanie ich z rejonem regulatorowym wirusa może spowodować wzrost ekspresji białek onkogennych wirusa E6 i E7.

Reasumując, E5 może uczestniczyć w transformacji nowotworowej komórki poprzez regulację ekspresji innych wirusowych onkoprotein. Ponadto hamuje aktywność

białka p21 poprzez aktywację cykliny Cdk4, odpowiedzialnej za fosforylację białka RB i inaktywację jego funkcji w kontroli cyklu komórkowego. Oddziaływania białek onkogennych wirusa z czynnikami komórkowymi pełniącymi główną rolę w regulacji cyklu komórkowego i apoptozie prowadzą do unieśmiertelnienia keratynocytów. Procesowi temu towarzyszą delecje lub zmiany sekwencji w różnych rejonach chromosomów komórkowych. Zidentyfikowano je w ramieniu p chromosomu 3p, 6q, 10p, 11p, 11q, 13q, 18q, 5q, 7q, 8q i 20q. Zmiany w sekwencji w rejonach chromosomów 3p, 6q, 10p, 11q, 13q i 18q ogrywiają ważną rolę w rozwoju kancerogenezy szyjki macicy (7,8). Związane jest to prawdopodobnie z inaktywacją zlokalizowanych tam genów supresji transformacji nowotworowej. Na przykład, delecję w sekwencji w obrębie chromosomu 3 zidentyfikowano w 30-35% zmian typu CIN (ang. *Cervical Intraepithelial Neoplasia*) i do 76% w rakach szyjki macicy, natomiast zmiany w obrębie chromosomu 6 stwierdzono w 75-85% raka szyjki macicy i 57-75% zmian typu CIN.

W licznych badaniach wykazano także zmiany w metylacji genów supresorowych w komórkach szyjki macicy HPV pozytywnych. Zidentyfikowano je w genach: *CDH1*, *DAPK*, *FHIT*, *HIC-1*, *p16*, *RAR beta*, *RASFA1*, *TIMP2* i *TSLC1* (7,8).

W ostatnich latach zwraca się także uwagę na rolę mitochondriów w rozwoju raka szyjki macicy (94) oraz występowanie mutacji w mtDNA i ich potencjalny wpływ na strukturę białek w wybranych typach nowotworów (95). Organelle te pełnią główną rolę w wewnątrzkomórkowym szlaku apoptozy, skupiają oraz integrują pro- i antyapoptotyczne sygnały z innych struktur komórkowych, jak i środowiska zewnętrznego komórki (96). W zakażonych wirusem HPV komórkach szyjki macicy stwierdzono zmiany w profilu ekspresji kaspaz inicjatorowych i wykonawczych (97). Ponadto wykazano, że wczesne białka wirusa HPV16 E1E4 mogą wiązać się z mitochondriami (przez koniec N bogaty w aminokwas leucynę), co prowadzi do skupiania się mitochondriów wokół jądra komórkowego, zaburzenia potencjału błony mitochondrialnej i zmiany w mitochondrialnym szlaku apoptozy. Zidentyfikowano także zmiany w sekwencji nukleotydowej w obszarze pętli D mitochondrialnego DNA (mtDNA) w komórkach szyjki macicy zakażonych wirusem HPV typu onkogenego (najczęściej HPV16 lub HPV18) (98). Ponieważ region ten jest zaangażowany w kontrolę replikacji mtDNA zaobserwowano także zmiany w ilości kopii mtDNA (99). Sugeruje się, że zmiany/mutacje w genomie mitochondrialnym mogą mieć związek z infekcją wirusem HPV (100). Pojawiają się dane, że mitochondria z czasem mogą być wykorzystywane jako cel w terapii przeciwnowotworowej (101).

Poznano wiele białek wirusowych uczestniczących w regulacji odpowiedzi komórki gospodarza na zakażenie. Nieznany jest, jak dotąd, mechanizm dokładnego działania białka E1E4 w tym procesie. Prawdopodobnie zaburzenia sieci cytotkeratynowej i włączenie szlaku mitochondrialnego apoptozy może mieć znaczenie w uwalnianiu nowo zsyntetyzowanych potomnych cząstek wirusa HPV i ponownym zakażeniu nabłonka (infekcja przetrwała) (102). Stwierdzono również, że białka E1E4 HPV16 mają niezależną, od oddziaływania z białkami cytoszkieletu, zdolność do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2. Niedawno stwierdzono, że białka te

mogą odgrywać również rolę w zwiększaniu czułości komórki na czynniki stymulujące apoptozę poprzez mechanizm zależny lub niezależny od białka p53 (103).

6. Wirusy HPV a nowotwory

Wirusy brodawczaka są uważane za główny czynnik w rozwoju raka szyjki macicy. Najczęściej jest za to odpowiedzialny wirus typu 16, rzadziej 18. W badaniach przesiewowych wskazuje się jednak, że tylko z niewielu zmian spowodowanych infekcją HPV rozwija się nowotwór. Do zakażenia dochodzi najczęściej w rejonie tarczy szyjki. Ponadto, oprócz najczęściej występujących typów 16 i 18, w szyjce macicy zidentyfikowano typy wirusa: 6, 11, 35, 39, 42, 43, 44, 51, 55, 58, 72. Poza szyjką, w innych miejscach narządów płciowych, stwierdzono obecność wirusów typu: 6, 11, 26, 27, 30, 35, 39, 40, 45, 59, 61, 62 i 64 (57).

Wirusy typu 16 i 18 uważane są za najbardziej kancerogenne. Obecność zakażeń HPV, nawet bezobjawowych, łatwo można zidentyfikować w wymazach z szyjki, z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Zakażenia HPV powodują najczęściej zmiany miejscowe, które należy usunąć, ponieważ w przeciwnym razie mogą one prowadzić w szyjce do rozwoju zmian neoplastycznych typu CIN I (ang. *Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade I*) oraz dalszej progresji do CIN II, CIN III i raka szyjki macicy. Cykl produktywny wirusowych cząstek może zachodzić tylko w CIN I, rzadko w CIN II, natomiast w CIN III obserwuje się przede wszystkim ekspresję wirusowych białek onkogennych E6 i E7. Progresja CIN III do nowotworu zachodzi w tych komórkach, w których doszło do integracji wirusowego DNA do genomu komórkowego i wzrostu ekspresji wirusowych białek onkogennych, natomiast nie ma ekspresji białek E2 i E4. Z tych względów zmiany typu CIN I mogą ulec regresji. Sytuację taką obserwuje się w około 60% przypadków. Ważny wpływ na dalszy rozwój CIN i progresję do raka szyjki macicy ma układ odpornościowy.

Wirusy HPV mogą być także czynnikiem w etiologii innych zmian neoplastycznych. Ich obecność (typy: 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 17, 20, 21, 23, 25, 28, 38, 47 i 49) stwierdzono w rakach skóry u osób z *Epidermodysplasia verruciformis* (EV), jak również rakach płaskonabłonkowych skóry (57).

Obecność wirusów HPV typu 16, 18 i 31 wykazano w 50% raka pochwy i 50% raka sromu (typ 16 i 18). Patogeny te obecne są w 70% raka narządów analnych i 50% raka prącia, a także stanowią jeden z czynników w etiologii raka krtani. Sugeruje się również ich udział w rozwoju raka języka oraz progresji czerniaka. Na podstawie tych danych potwierdza się związek ludzkich wirusów brodawczaka z rozwojem licznych nowotworów. Z uzyskanych wyników badań epidemiologicznych i klinicznych wynika, że w związku z infekcją HPV dochodzi do rozwoju różnych typów nowotworów u 6-33% nim zakażonych. Czas od zakażenia do rozwoju zmian neoplastycznych szacuje się od 1,7 do 2,7 lat, natomiast raka inwazyjnego – po 6 latach. Zależy to od szeregu czynników wpływających na rozwój i przebieg zakażenia.

7. Biotechnologia w profilaktyce zakażeń HPV

Biorąc pod uwagę częstotliwość zakażeń HPV i jej związek z rakiem szyjki macicy oraz wieloma innymi zmianami nowotworowymi, opracowanie szczepionki przeciw wirusom HPV stało się jednym z głównych przedsięwzięć w służbie zdrowia na całym świecie w ostatniej dekadzie. Było to możliwe dzięki poznaniu właściwości antygenowych wirusowych białek oraz możliwości ich syntezy metodami biotechnologicznymi. Obecnie opracowano i wprowadzono na rynek dwie szczepionki profilaktyczne, które przebadano klinicznie. Szczepionka czterowalentna zawiera cztery rodzaje cząstek wirusopodobnych – VLP (ang. *Virus-Like Particle*), które są zbudowane z głównego białka kapsydu L1 i czterech typów wirusa brodawczaka (HPV-6, -11, -16, -18) (104). Szczepionka dwuwalentna zawiera dwa rodzaje cząstek wirusopodobnych (HPV16 i -18), a białko kapsydu jest głównym immunogenem wirusów brodawczaka (105). Podana w odpowiedniej dawce i konformacji indukuje odporność immunologiczną, która może się utrzymywać przez wiele lat. Antygen ten podawano w dawkach podzielonych (np. 0, 2 i 6 miesięcy), według wytycznych skoordynowanych programów szczepień w Europie i na świecie (106). Szczepieniom najlepiej poddać dziewczęta i młode kobiety. Według niektórych ekspertów należałoby szczepić nawet już dziewięciolatki. Wiadomo, że w tej grupie populacyjnej częstość występowania wirusów brodawczaka jest niska. Tylko nieliczne kraje do programów obowiązkowych szczepień włączyły młodzież płci męskiej, np. Austria (107,108). Zakażenia u ludzi może wywołać wiele typów HPV, a ponad 30 infekuje nabłonek szyjki macicy. W badaniach odporności krzyżowej skierowanej przeciw genotypom HPV wykazano, że jest ona zadowalająca, ale pod warunkiem, że wirusy te są filogenetycznie spokrewnione (109,110).

Cząstki wirusopodobne wykorzystywane do produkcji szczepionek otrzymuje się w komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) lub komórkach owadów (*Spodoptera frugiperda Sf-9*, *Trichoplusia ni Hi-5*). Główne białko kapsydu L1 wirusów brodawczaka ma zdolność do spontanicznego składania się w cząstki wirusopodobne w komórkach eukariotycznych. Do oczyszczania cząstek VLP wykorzystuje się te same metody, jakie służą do oczyszczania infekcyjnych wirionów HPV z komórek zakażonych wirusem (m.in. wirowanie w gradiencie sacharozy) (110). Istnieje również możliwość otrzymania cząstek wirusopodobnych w komórkach prokariotycznych (*Escherichia coli*), w których główne białko kapsydu występuje przede wszystkim w postaci kapsomerów. Białko to po oczyszczeniu z ekstraktu białkowego, np. metodą chromatografii, składa się w cząstki wirusopodobne w warunkach *in vitro* w wysokiej sile jonowej (obecność NaCl). W badaniach serologicznych wykazano, że cząstki wirusopodobne wyprodukowane w taki sposób mają pełne spektrum właściwości immunogennych (112).

Szczepionki profilaktyczne nie mają wpływu na regresję zmian nowotworowych, dlatego od wielu lat szuka się również rozwiązań terapeutycznych, które są znacznie większym wyzwaniem. Prace nad szczepionkami leczniczymi i profilaktycznymi rozpoczęto mniej więcej w tym samym czasie, jednak żadna z grupy tych pierwszych nie została zatwierdzona do obrotu na rynku leków. Główna różnica polega na tym, że

szczepionki profilaktyczne indukują odpowiedź humoralną u osób zdrowych (z założenia nie zakażonych wirusem HPV), natomiast usunięcie komórek, których transformacja została spowodowana wirusem HPV, u osób z aktywną infekcją, wymaga silnego pobudzenia limfocytów T. Dlatego, leczenie zmian już istniejących (CIN2-3, rak szyjki macicy) koncentruje się na białkach E6 i E7 wirusów brodawczaka. Przede wszystkim one są odpowiedzialne za kancerogenezę. Wiele koncernów farmaceutycznych podjęło próby przygotowania białek E6 i E7 w takiej postaci, aby indukowały odpowiedź komórkową, zdolną do zwalczania zmian przednowotworowych. Aby osiągnąć ten cel opracowano wiele strategii: zastosowano wirus krowianki Ankara (MVA), białka fuzyjne, peptydy, bakteryjne wektory DNA (plazmidy) i wektory DNA eukariotyczne. Ciekawą strategią jest, jak się wydaje, wykorzystanie białka szoku termicznego (Hsp) połączonego z białkiem E7. W takim układzie aktywowane będą najpierw komórki dendrytyczne, które następnie zaprezentują antygen wirusowy E7 limfocytom T. Obiecującym pomysłem, podobnie jak w szczepionkach profilaktycznych, jest wykorzystanie cząstek wirusopodobnych, do których powierzchni przyłączone jest białko E7. Według najnowszych badań, w odpowiedzi immunologicznej w zakażeniach HPV istotną rolę pełnią komórki Langerhansa, które wirus brodawczaka wykorzystuje, aby wymknąć się spod kontroli układu odpornościowego człowieka. Na podstawie wstępnych wyników badań wskazuje się, że głównym przełącznikiem tej ścieżki jest kinaza PI3. Zablokowanie jej aktywności *in vitro* aktywuje komórki Langerhansa i prowadzi do inicjacji odpowiedzi na zakażenie HPV (113,114).

W dobie stosowania szczepień profilaktycznych przeciw wirusom brodawczaka nadal ważne są badania przesiewowe na obecność HPV, szczególnie wśród dzieci i młodzieży. Różnorodność genotypów HPV oraz różna częstotliwość ich występowania wśród zdrowych osób różnych populacji została już opisana. Wiadomo, że u przedstawicieli jednych badanych populacji częściej pojawiają się w jamie ustnej oraz w gardle zakażenia wirusami brodawczaka wysokiego ryzyka (115), a u innych występują częściej HPV niskiego ryzyka (116). Zakażenia wirusami brodawczaka wysokiego ryzyka mogą również prowadzić do powstania zmian nowotworowych głowy i szyi, które są poważnym zagrożeniem dla zdrowia na całym świecie (117). Szacuje się, że w samych tylko Stanach Zjednoczonych łączna liczba rocznych zakażeń HPV przekracza 6 mln (118). Z badań przeprowadzonych na materiale pochodzącym z dróg rodnych wynika, że wśród Europejek częstotliwość zakażeń wirusami brodawczaka wysokiego ryzyka jest najwyższa wśród młodych kobiet i stosunkowo niska u kobiet w wieku średnim (119). Wykazano również, że Polska znajduje się w czołówce krajów Unii Europejskiej, pod względem liczby zachorowań na raka szyjki macicy, będących skutkiem przetrwałej infekcji HPV. W populacji polskiej zanotowano około trzykrotnie więcej przypadków raka szyjki macicy (17/100 000 – średnia dla Krakowa i Warszawy) aniżeli w krajach Europy Zachodniej. Wyniki te plasują Polskę na równej pozycji z niektórymi krajami Ameryki Południowej i Indii (120).

Wydaje się, że zanim szczepionka profilaktyczna zostanie podana danej osobie, wcześniej należy ustalić, czy nie jest ona nosicielem HPV. W takim przypadku nale-

żałoby przeprowadzić dokładniejsze badania, polegające m.in. na ustaleniu genotypu HPV oraz serostatusu osoby zakażonej. Idealnym rozwiązaniem, możliwym w niedalekiej przyszłości, będzie szczepienie profilaktyczne dzieci niezakażonych HPV oraz profilaktyczno-terapeutyczne osób już zakażonych danym typem HPV. Taka strategia umożliwi wyeliminowanie zakażeń wirusami brodawczaka w populacjach objętych programami szczepień.

8. Podsumowanie

Od czasu odkrycia wirusa HPV opisano występowanie około 200. różnych typów wirusa z czego dla blisko 100. poznano pełną sekwencję genomowego DNA. Wirusy te atakują nabłonek narządów płciowych oraz skórę nie tylko ludzi, ale także zwierząt. HPV powoduje zakażenia lokalne, a nie ogólnoustrojowe. Większość z nich ma charakter bezobjawowy i ustępuje samoistnie. Zakażenia przetrwałe są przyczyną zmian rozrostowych na skórze (brodawek) oraz mogą prowadzić do rozwoju raka szyjki macicy. Dzięki poznaniu sekwencji i organizacji genomu różnych typów HPV możliwe stało się wykrywanie zakażeń HPV w wymazach cytologicznych, jak również ich genotypowanie. Opracowano także swoiste testy do identyfikacji wirusów, oparte na metodzie hybrydyzacji kwasów nukleinowych oraz powielaniu fragmentów DNA wirusa za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Poznanie właściwości wirusowych białek oraz rozwój metod biotechnologicznych przyczyniły się także do opracowania i wprowadzenia do praktyki klinicznej poliwalentnych szczepionek przeciwko najbardziej onkogennym typom HPV. Zawierają one białka płaszcza najczęściej identyfikowanych typów wirusa HPV w jamie ustnej (typu -6 i -11) oraz nabłonku szyjki macicy (typy -16 i -18). Otrzymuje się je metodami biotechnologicznymi. Należy podkreślić, że szczepionki profilaktyczne niezawierające pełnych cząstek wirusa i wirusowego DNA, nie mogą wywoływać zakażenia.

Praca realizowana w ramach grantu MNiSzW 2198.

Literatura

1. Modis Y., Trus B. L., Harrison S. C., (2002), *EMBO J.*, 21(18), 4754-4762.
2. Buck C. B., Cheng N., Thompson C. D., Lowy D. R., Steven A. C., Schiller J. T., Trus B. L., (2008), *J. Virol.*, 82(11), 5190-5197.
3. Pereira R., Hitzeroth I. I., Rybicki E. P., (2009), *Arch. Virol.*, 154(2), 187-197.
4. Longworth M. S., Laimins L. A., (2004), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2), 362-372.
5. Fields B. N., Knipe D. M., Hawley P. M., (1996), *Fields Virology*, 3rd Ed., Lippincott- Rawen Publisher, Philadelphia, 65, 2045-2070.
6. zur Hausen H., (1996), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1228, 55-78.
7. Doorbar J., (2006), *Clinical Science*, 110, 525-541.
8. Doorbar J., (2005), *J. Clin.Virol.*, 32, s7-s15.
9. Zheng Z. M., Baker C. C., (2006), *Front Biosci.*, 11, 2286-2302.

10. Sanclemente G., Gill D. K., (2002), *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 16(3), 231-240.
11. Chong T., Apt D., Gloss B., Isa M., Bernarda H. U., (1991), *J. Virol.*, 65, 5933-5943.
12. O'Connor M., Chan S. Y., Bernard H. U., (1995), *Human Papillomaviruses compedium*, Ed. Myers G., 21-40, Los Alamos USA, National Laboratory Press.
13. Butz K., Hoppe-Seyler F., (1993), *J. Virol.*, 67, 6476-6486.
14. Ishiji T., Lace M. J., Parkkinen S., Anderson R. D., Haugen T. H., Cripe T. P., Xiao J. H., Davidson I., Chambon P., Tirek L. P., (1992), *EMBO J.*, 11, 2271-2281.
15. Kyo S., Klumpp D. J., Inoue M., Kanaya T., Laimnis L. A., (1997), *J. Gen. Virol.*, 78, 401-411.
16. O'Conner M., Bernard H. U., (1995), *Virology*, 207, 77-88.
17. Wilson V. G., West M., Woytek K., Rangasamy D., (2002), *Virus Genes*, 24(3), 275-290.
18. Wilson R., Fehrmann F., Laimins L. A., (2005), *J. Virol.*, 79(11), 6732-6740.
19. You J., Croyle J. L., Nishimura A., Ozato K., Howley P. M., (2004), *Cell*, 117(3), 349-360.
20. Young T. W., Mei F. C., Rosen D. G., Yang G., Li N., Liu J., Cheng X., (2007), *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 294-304.
21. Sverdrup F., Myers G., (1997), *Human Papillomaviruses compedium*, Ed. Myers G., 37-53, Los Alamos USA, National Laboratory Press.
22. Hughes F. J., Romanos M. A., (1993), *Nucl. Acid. Res.*, 21, 5817-5823.
23. Muller F., Giroglou T., Sapp M., (1997), *J. Gen. Virol.*, 78, 911-915.
24. Chiang C. M., Ustav M., Stenlund A., Ho T. F., Broker T. R., Chow L. T., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5799-5803.
25. Demertet C., Desaintes M., Yaniv M., Thierry F., (1997), *J. Virol.*, 71, 9343-9349.
26. Yang L., Yam H., Cheng-Chew S., Wong S., Loog E., Chew E., (1997), *Anticancer Res.*, 17, 342-348.
27. Pereira R., Hitzeroth I. I., Rybicki E. P., (2009), *Arch. Virol.*, 154(2), 187-197.
28. Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K., Kirnbauer R., (2003), *J. Virol.*, 77(24), 13125-13135.
29. Holmgren S. C., Patterson N. A., Ozburn M. A., Lambert P. F., (2005), *J. Virol.*, 79(7), 3938-3948.
30. Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P. Y., Coursaget P., (2003), *J. Virol.*, 77(6), 3846-3850.
31. Day P. M., Lowy D. R., Schiller J. T., (2003), *Virology*, 307(1), 1-11.
32. Bossis I., Roden R. B., Gambhira R., Yang R., Tagaya M., Howley P.M., Meneses P. I., (2005), *J. Virol.*, 79(11), 6723-6731.
33. Florin L., Becker K. A., Lambert C., Nowak T., Sapp C., Strand D., Streeck R. E., Sapp M., (2006), *J. Virol.*, 80(13), 6691-6696.
34. Lianosz V., Nguyen K. C., Meneses P. I., (2007), *J. Virol.*, 81(14), 7435-7448.
35. Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z., Kroemer G., (2008), *PLOS Pathogens*, 4, 1-16.
36. Munger K., Werness B., Dyson N., Phelps W., Harlow E., Howley P. M., (1989), *EMBO J.*, 8, 4099-4105.
37. Dyson N., Howley P. M., Munger K., Harlow E., (1989), *Science*, 243, 934-937.
38. Cheng S., Schmidt-Grimminger D., Murrant T., Broker T., Chow I., (1995), *Genes Dev.*, 8, 2335-2349.
39. Werenes B., Levine A. J., Howley P. M., (1990), *Science*, 248, 76-79.
40. Thompson D. A., Belimsky G., Chang T. H., Jones D. L., Schlegel R., Munger K., (1997), *Oncogene*, 15, 3025-3035.
41. Day P. M., Roden R. B., Lowy D. R., Schiller J. T., (1998), *J. Virol.*, 72(1), 142-150.
42. Swindle C. S., Zou N., van Tine B. A., Shaw G. M., Engler J. A., Chow L. T., (1998), *J. Virol.*, 73(2), 1001-1009.
43. Roden R. B., Day P. M., Bronzo B. K., Yutzy W. H., Yang Y., Lowy D. R., Schiller J.T., (2001), *J. Virol.*, 75(21), 10493-10497.
44. Pereira R., Hitzeroth I. I., Rybicki E. P., (2009), *Arch. Virol.*, 154(2), 187-197.
45. Wagner K. U., Krempler A., Qi Y., Park K., Henry M. D., Triplett A. A., Riedlinger G., Rucker E. B., Hennighausen L., (2003), *Mol. Cell. Biol.*, 23, 150-162.
46. Bodily J. M., Meyers C., (2005), *J. Virol.*, 79(6), 3309-3321.
47. Spink K. M., Laimins L. A., (2005), *J. Virol.*, 79(8), 4918-4926.
48. Krüppel U., Müller-Schiffmann A., Baldus S. E., Smola-Hess S., Steger G., (2008), *Virology*, 377(1), 151-159.

49. McPhillips M. G., Veerapraditsin T., Cumming S. A., Karali D., Milligan S. G., Boner W., Morgan I. M., Graham S. V., (2004), *J. Virol.*, 78(19), 10598-10605.
50. Cheunim T., Zhang J., Milligan S. G., McPhillips M. G., Graham S. V., (2008), *Virus Res.*, 131(2), 189-198.
51. Lai M. C., Teh B. H., Tarn W. Y., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274(17), 11832-11841.
52. Zheng Z. M., Baker C. C., (2006), *Front. Biosci.*, 11, 2286-2302.
53. Mole S., McFarlane M., Chuen-Im T., Milligan S. G., Millan D., Graham S. V., (2009), *J. Pathol.*, 219(3), 383-391.
54. Bell I., Martin A., Roberts S., (2007), *J. Virol.*, 81(11), 5437-5448.
55. Bodaghi S., Jia R., Zheng Z. M., (2009), 386(1), 32-43.
56. Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., (1999), *J. Pathol.*, 189(1), 12-19.
57. Goździcka-Józefiak A., Kwaśniewska A., (2009), *Właściwości onkogenne wirusa brodawczaka ludzkiego. Rak szyjki macicy*, PZWL, Warszawa, 17-30.
58. Madkan V. K., Coo-Norris R. H., Steadman M. C., Arora A., Mendoza N., Tyring S. K., (2007), *British Journal of Dermatology*, 157, 228-241.
59. Wang S. S., Gonzalez P., Yu K., Porras C., Li Q., Safaeian M., Rodriguez C., Sherman M. E., Bratti C., Schiffman M., Wacholder S., Burk R. D., Herrero R., Chanock S. J., Hildesheim A., (2010), *PLoS ONE*, 5(1), e8667-e8667.
60. Woodman C. B., Collins S. I., Young L. S., (2007), *Nat. Rev. Cancer.*, 7(1), 11-22.
61. Pett M., Coleman N., (2007), *J. Pathol.*, 212(4), 356-367.
62. Yugawa T., Kiyono T., (2009), *Rev. Med. Virol.*, 19(2), 97-113.
63. zur Hausen H., (2002), *Nat. Rev. Cancer.*, 2, 342-350.
64. Lee S., Glaunsinger B., Mantanovi F., Banks L., (2000), *J. Virol.*, 74, 9680-9693.
65. Craven S. E., Brecht D. S., (1998), *Cell*, 93, 495-498.
66. Gomperts S. N., (1996), *Cell*, 84, 659-662.
67. Lee S. S., Weiss R. S., Javier R. T., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6670-6675.
68. Nguyen M. L., Nguyen M. M., Lee D., Griep A. E., Lambert P. F., (2003), *J. Virol.*, 77, 6957-6964.
69. Proweller A., Wright A. C., Horng D., Cheng L., Lu M. M., Lepore J. J., Pear W. S., Parmacek M. S., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104(41), 16275-16280.
70. Proweller A., Tu L., Lepore J. J., (2006), *Cancer Res.*, 66, 7438-7444.
71. Proweller A., Pear W. S., Parmacek M. S., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280(10), 8994-9004.
72. Patel D., Huang S., Baglia L., McCance D., (1999), *EMBO J.*, 18, 5061-5072.
73. Ronco V., Karpova A. Y., Vidal M., Howley P. M., (1998), *Genes Dev.*, 12, 2061-2072.
74. Münger K., Baldwin A., Edwards K. M., Hayakawa H., Nguyen C. L., Owens M., Grace M., Huh K., (2004), *J. Virol.*, 78(21), 11451-11460.
75. Kumar A., Zhao Y., Meng G., Zeng M., Srinivasan S., Delmolino L. M., Gao Q., Dimri G., Weber G. F., Waze D. E., Band H., Band V., (2002), *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5801-5812.
76. Weintraub S. J., Chow K. N., Luo R. X., Zhang S. H., He S., Dean D. C., (1995), *Nature*, 375, 812-815.
77. Phelps W. C., Yee C. I., Munger K., Howley P. M., (1988), *Cell*, 53, 539-547.
78. Wang J. A., Sampath A., Raychaudhuri P., Bagchi S., (2001), *Oncogene*, 20, 4740-4749.
79. Hurford R. K., Cobrinik D., Lee M. H., Dyson N., (1997), *Genes Dev.*, 11, 1447-1463.
80. Jones D. L., Alani R. M., Munger K., (1997), *Genes Dev.*, 11, 2101-2110.
81. Zerfass-Thome K., Zweerschke W., Mannhardt B., Tindle R., Botz J. W., (1996), *Oncogene*, 13, 2323-2330.
82. Garnett T. O., Hughes P. J., (2006), *Arch. Virol.*, 151(12), 2321-2335.
83. Lehoux M., D'Abramo C. M., Archambault J., (2009), *Public Health Genomics.*, 12(5-6), 268-280.
84. Longworth M. S., Laimnis L. A., (2004), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 362-437.
85. Leechanachai P., Banks L., Moreau F., Matlashewski G., (1992), *Oncogene*, 7, 19-25.
86. Conrad-Stoppler M., Straight S. W., Tsao G., Sclegel R., McCance D. J., (1996), *Virology*, 223, 251-254.
87. Leptak C., Ramon y Cajal S., Kulke R., Horwitz B. H., Riese D. J., Dotto G. P., DiMaio D., (1991), *Virology*, 65, 7078-7083.

88. Thomsen P., van Deurs B., Norrild B., Kayser L., (2000), *Oncogen*, 19(52), 6023-6032.
89. Tsai T. C., Chen S. L., (2003), *Arch. Virol.*, 148(8), 1445-1453.
90. Kim S. W., Yang J. S., (2006), *Yonsei Med. J.*, 47(1), 1-14.
91. Hu L., Plafker K., Vorozhko V., Zuna R. E., Hanigan M. H., Gorbisky G. J., Plafker S. M., Angeletti P. C., Ceresa B. P., (2009), *Virology*, 384(1), 125-134.
92. Thomsen P., Larsson C., Ericson L. E., Sennerby L., Lausmaa J., Kasemo B., (1997), *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 8(11), 653-665.
93. Zhang B., Li P., Wang E., Brahmī Z., Dunn K.W., Blum J. S., Roman A., (2003), *Virology*, 310(1), 100-108.
94. Plak K., Kukwa W., Bartnik E., Golik P., Ścińska A., Krawczyk T., Czarnecka A. M., (2008), *Postępy Biochemii*, 54, 151-160.
95. Pietka G., Kukwa W., Bartnik E., Ścińska A., Czarnecka A. M., (2008), *Otolaryngol. Pol.*, 62(2), 158-164.
96. Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z., Kroemer G., (2008), *PLOS Pathogens*, 4, 1-16.
97. Lagunas-Martinez A., Madrid-Marina V., Gariglio P., (2009), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1805(1), 6-16.
98. Parella P., Seripa D., Matera M. G., Rabitti C., Rinaldi M., Mazzarelli P., (2003), *Cancer Letters*, 190, 73-77.
99. Chen D., Huiying Z., (2009), *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 135, 291-295.
100. Sharma H., Singh A., Sharma C., Sunesh K. J., Singh N., (2005), *Cancer Cell International*, 5, 34-39.
101. Ralph S. J., Neuzil J., (2009), *Mitochondria and Cancer*, Eds. Singh K. K., Costello L. C., 211-249, Springer Science, New York.
102. Raj K., Berguerand S., Southern S., Doorbar J., Beard P., (2004), *J. Virol.*, 78, 7199-7207.
103. Galluzzi L., Morselli E., Kepp O., Vitale I., Rigoni A., Vacchelli E., Michaud M., Zischka H., Castedo M., Kroemer G., (2010), *Mol. Aspects. Med.*, 31(1), 1-20.
104. Huang C. M., (2008), *Mayo Clin. Proc.*, 83, 701-706.
105. Bishop B., Dasgupta J., Klein M., Garcea R. L., Christensen N. D., Zhao R., Chen X. S. (2007), *J. Biol. Chem.*, 282, 31803-31811.
106. King L. A., Lévy-Bruhl D., O'Flanagan D., Bacci S., Lopalco P. L., Kudjawu Y., Salmaso S., (2008), *Euro Surveill.*, 13(33), 1-6.
107. Bosch F. X., Castellsagué X., de Sanjosé S., (2008), *Br. J. Cancer*, 98, 15-21.
108. de Sanjosé S., Alemany L., Castellsagué X., Bosch F. X., (2008), *Womens Health*, 4, 595-604.
109. Bernard H. U., Calleja-Macias I. E., Dunn S. T., (2006), *Int. J. Cancer*, 118, 1071-1076.
110. Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C. M., Moscicki A. B., Romanowski B., Roteli-Martins C. M., Jenkins D., Schuind A., Costa Clemens S. A., Dubin G., (2006), *Lancet*, 367, 1247-1255.
111. Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D. R., Schiller J. T., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12180-12184.
112. Chen X. S., Casini G., Harrison S. C., Garcea R. L., (2001), *J. Mol. Biol.*, 307, 173-182.
113. McNeil C., (2006), *J. Natl. Cancer Inst.*, 98(21), 1518-1520.
114. Trimble C. L., Frazer I. H., (2009), *Lancet Oncol.*, 10, 975-980.
115. Smith E. M., Swarnavel S., Ritchie J. M., Wang D., Haugen T. H., Turek L. P., (2007), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 26, 836-840.
116. Kurose K., Terai M., Soedarsono N., Rabello D., Nakajima Y., Burk R.D., Takagi M., (2004), *Oral Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.*, 98, 91-96.
117. Gilson M. L., (2008), *J. Adolescent. Health*, 43, 52-60.
118. National Cancer Institute, US National Institutes of Health. Human papillomaviruses and cancer: questions and answers. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheets/risk/HPV>. Accessed April 28, 2008.
119. Lévy-Bruhl D., Bousquet V., King L. A., O'Flanagan D., Bacci S., Lopalco P. L., Salmaso S., (2009), *Eur. J. Cancer*, 45, 2709-2713.
120. Bardin A., Vaccarella S., Clifford G. M., Lissowska J., Rekosz M., Bobkiewicz P., Kupryjanczyk J., Krynicki R., Jonska-Gmyrek J., Danska-Bidzinska A., Snijders P. J. F., Meijer C. J. L. M., Zatonski W., Franceschi S., (2008), *Eur. J. Cancer.*, 44, 557-564.