

Mechanizm kancerogenezy zachodzący w komórkach nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy zakażonych przewlekłe onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego

Mechanism of the cancerogenesis in cervix paraepidermal epithelium cells with chronic infection of oncogenic types of *human papilloma virus*

Kędzia Witold¹, Goździcka-Józefiak Anna²

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu.

² Zakład Wirusologii Molekularnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie

Rodzina wirusów papilloma złożona jest z dużej liczby typów różniących się od siebie, z których każdy związany jest z charakterystycznymi zmianami zlokalizowanymi w nabłonku.

Każdy ze zidentyfikowanych typów wirusów papilloma odznacza się wysoką specyficznością lokalizacji zakażenia i zmian chorobowych jakie wywołuje.

Zakażenie HPV typami 6 i 11 jest najczęściej związane z rozwojem łagodnych zmian określanymi jako kłykciny.

Obecność HPV 16 i 18 bardzo często współistnieje z dysplazją szyjki macicy i progresją nowotworową.

Genom wirusa papilloma tworzy kolistą podwójną nić DNA. Poszczególne otwarte ramki odczytu zlokalizowane są tylko na jednej nici DNA. Kodująca nić DNA zawiera od 8 do 10 otwartych ramek odczytu, które biorą udział w translacji. Spośród nich tylko 6 do 8 otwartych ramek odczytu odpowiada za syntezę wczesnych białek wirusowych, a 2 ramki biorą udział w powstawaniu białek późnych.

Udział HPV 16 i 18 w powstawaniu raka szyjki macicy jest dzisiaj niekwestionowany. Możliwy jest udział wirusów papilloma w powstawaniu innych nowotworów.

Słowa kluczowe: **papillomaviridae – chorobotwórczość / nowotwory szyjki macicy – profilaktyka / zakażenia papillomawirusowe – diagnostyka / zakażenie papillomawirusowe – powikłania / rak – profilaktyka /**

Adres do korespondencji:

Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
e-mail: witold.kedzia@poczta.fm

Otrzymano: 10.07.2006
Zaakceptowano do druku: 10.08.2007

Kędzia W, et al.

Abstract

The human papillomavirus family is composed of a large number of different and variably related types, each of which is associated with a characteristic set of epithelial lesions.

Each of the many identified types of human papillomavirus have shown considerable specificity of different anatomical sites and different characteristic lesions.

HPV 6 and 11 are frequently associated with benign condylomas, while HPV 16 and 18 are associated with malignant progression and cervical cancer. The genome of papillomaviruses is composed of a circular double stranded DNA. Various open reading frames (ORFs) are located on only one DNA strand. The coding strand contains from 8 to 10 translational ORFs. Among them, only 6 to 8 were designated as early and 2 as late.

The role of HPVs 16 and 18 in uterine cervix carcinoma has been well-documented, but their contribution to carcinogenesis of other neoplasias is still questionable.

Key words: **papillomavirus infections – complications / uterine cervical neoplasms – virology / cervical intraepithelial neoplasia – virology / risk factors / uterine cervical neoplasms – genetocs / uterine cervical neoplasms – physiopathology /**

Wstęp

Ludzkie wirusy brodawczaka (*Human papillomavirus*, HPV) są uważane za jeden z głównych czynników biorących udział w etiologii raka szyjki macicy.

HPV należą do rodziny *Papovaviridae* i wykazują tropizm do komórek nabłonkowych skóry i błon śluzowych człowieka oraz różnych gatunków zwierząt. Jest to związane z obecnością na powierzchni komórki specyficznych białek, które pełnią rolę swoistych wirusowych receptorów i występowaniem w komórce określonych czynników białkowych, biorących udział w regulacji replikacji cząstek wirusowych. Sugeruje się, że receptorami dla wirusa HPV mogą być integryny ze szczególnym wskazaniem na kompleks α -6, β -1, β -4 [2, 4].

Wirusy brodawczaka zakażają warstwę podstawną komórek nabłonkowych, a pełny ich cykl życiowy zachodzi tylko w zróżnicowanych keratynocytach. Znanych jest przeszło 100 typów HPV, które charakteryzują się dużą specyficznością wobec gospodarza. Ponad 20 typów HPV wykazuje tropizm do komórek nabłonka narządów płciowych ludzi.

Wirusy te możemy podzielić na trzy grupy: o niskim potencjale onkogennym (HPV 6, 11, 42, 43, 44), średnim potencjale onkogennym (HPV 26, 53, 66) i wysokim potencjale onkogennym (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82). Wirusy HPV obdarzone wysokim potencjałem onkogennym znajdują się głównie w komórkach raka szyjki macicy, pochwy, niektórych rakach sromu jak również w części raków odbytu i nowotworach głowy i szyi [6].

Genom wirusów brodawczaka

Wiriony HPV charakteryzuje symetria ikozaedrałna o średnicy 55nm. Genom ich stanowi dwuniciowy DNA zbudowany z około 8 tpz., zorganizowany podobnie u wszystkich typów PV (*papilloma virus*). Na jednej z nici DNA można wyróżnić dwa regiony kodujące; wczesny (E) i późny (L), które są przedzielone odcinkiem niekodującym, pełniącym funkcje regulatorowe (LCR *long control region* lub URR *upstream regulatory region*). Drugi krótki odcinek nie kodujący SNR (*short non-coding region*) znajduje się pomiędzy ramką odczytu ORF 5 (*open reading frame*) a ORFL 2.

Zlokalizowane są w nim prawdopodobnie sekwencje promotorowe, których aktywność jest regulowana przez czynniki białkowe pojawiające się w trakcie różnicowania keratynocytów oraz sygnał poli A dla transkryptów genów wczesnych. W regionie wczesnym występują otwarte ramki odczytu (ORF) kodujące białka odpowiedzialne za replikację wirusa oraz transformację komórek gospodarza. W dalszej części artykułu omówimy najważniejsze z punktu widzenia kancerogeny białka wirusowe. (Rycina 1).

Białko wirusowe E1

Produktem ORF E1 jest białko jądrowe o masie cząsteczkowej od 68 do 72 kD, odpowiedzialne za replikację wirusowego DNA i utrzymanie go w formie episomalnej. Proteina ta jest fosforylowana na obu końcach i tworzy kompleksy z wirusowym białkiem E2TA, co umożliwia jej specyficzne wiązanie się z DNA.

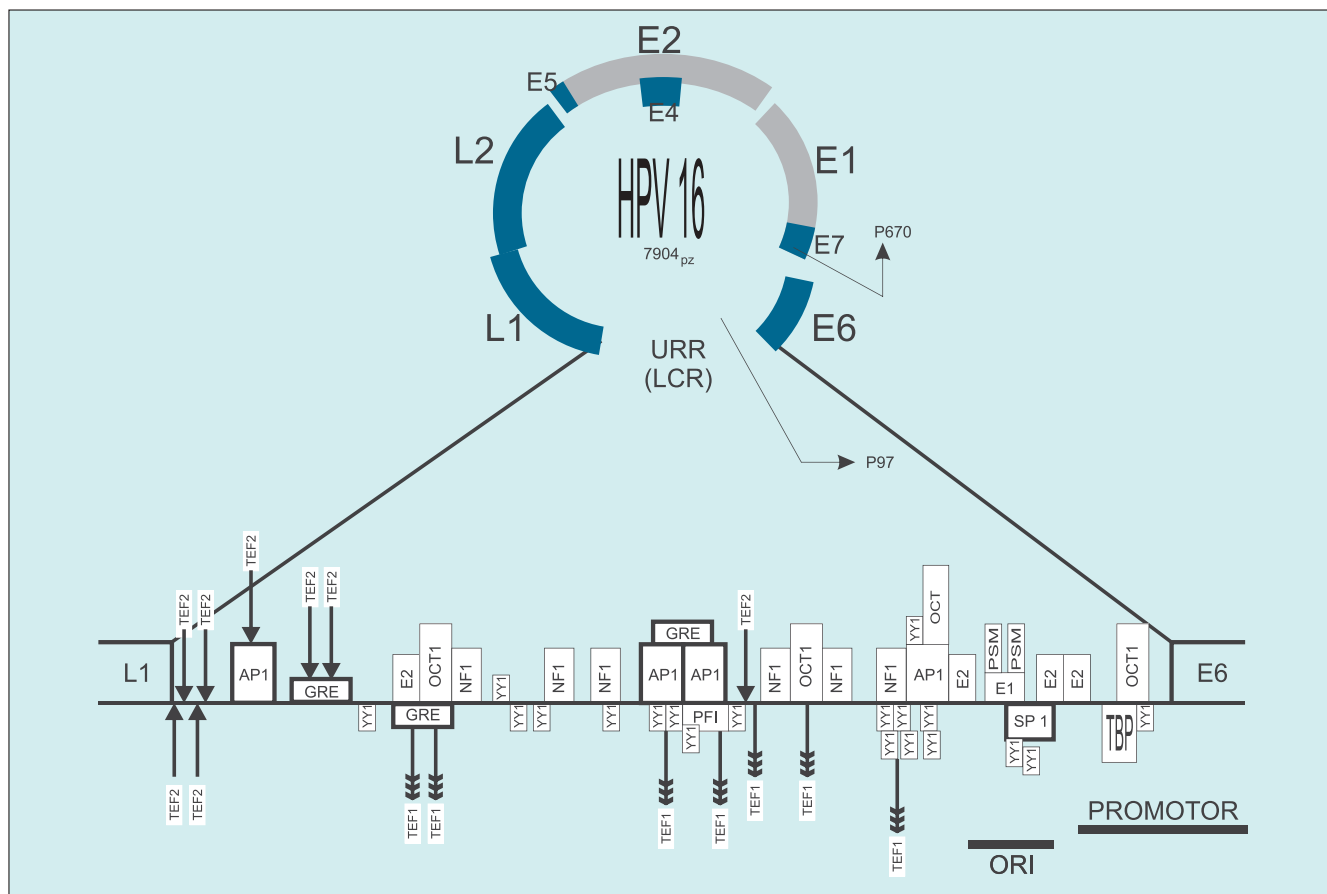
Białko wirusowe E2

Produktem ORF E2 są trzy białka jądrowe o masach cząsteczkowych 28, 31 i 48 kD, które pełnią zasadnicze funkcje w regulacji transkrypcji i replikacji wirusowego DNA. Wiążą się one z sekwencjami DNA o strukturze ACCGn4 CGT, zlokalizowanymi w rejonie regulatorowym pełniąc zarazem rolę aktywatora lub represora transkrypcji wirusowych genów. W strukturze białka o masie 48 kD (E2TA) wyróżnić można następujące domeny:

1. Domenę odpowiedzialną za jego funkcję transaktywacyjną, zlokalizowaną w rejonie N końca cząsteczki (aminowym). Domena ta bierze udział w dimeryzacji cząsteczek i wiązaniu z DNA na końcu karboksylowym.
2. Domenę łączącą, którą stanowi rejon łączący opisane powyżej struktury wirionu.

Białka E2 o masie 28 i 31 (E2TR) mają skrócony w porównaniu do E2TA koniec aminowy i nie zawierają modułu transaktywującego. Białka te mogą jednak wiązać się z DNA jak również tworzyć heterodimery z E2TA, hamując w ten sposób jego działanie. Wykazano także, że samo białko E2TA

Mechanizm kancerogenezy zachodzący w komórkach nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy...



Rycina 1. Organizacja genomu wirusa HPV 16.

Na rycinie zaznaczono lokalizację sekwencji kodującej białka wczesne wirusa (E1, E2, E3, E4, E5, E6 i E7), białka późne (L1, L2), miejsca promotorowe (P97 i P670) oraz rejon regulatorowy (URR, LCR).

W regionie LCR występują miejsca odpowiedzialne za regulację replikacji wirusowego DNA (*ori*), miejsca promotorowe P97, elementy wiążące białka wirusowe oraz liczne komórkowe czynniki transkrypcyjne biorące udział w regulacji transkrypcji wirusowych genów.

(48 kD) wirusów atakujących narządy płciowe, wiążąc się z dwoma sekwencjami ACCGAAAACGGT zlokalizowanymi w sąsiedztwie ramki TATA promotora p97 i poprzez oddziaływanie na inne czynniki transkrypcyjne, może powodować represję transkrypcji wczesnych ramek odczytu E6 i E7.

Białko wirusowe E4

W rejonie kodującym ORF E2 HPV 16, zlokalizowana jest ORF E4. Ramka ta koduje białko wczesne, ulegając ekspresji w końcowym etapie cyklu życiowego wirusa. Jego rola nie jest do końca poznana. Proteina ta wiąże się z pośrednim typem włókienek keratyny, powodując zapadanie się cytoszkieletu komórkowego co ułatwia uwalnianie cząstek potomnych wirusa z komórek utrzymujących postać koilocytów.

Białko wirusowe E5

ORF E5 koduje hydrofobowe białko E5 o masie 7kD zbudowane z 44 aminokwasów. Białko to występuje w błonie komórkowej, gdzie poprzez oddziaływanie na receptory takie jak EGF, TGF α czy PDGF, może brać udział w deregulacji przekazywania sygnałów do komórki. E5 jest najmniejszym dotychczas poznany białkiem transformującym.

Białka wirusowe E6, E7 – obdarzone właściwościami onkogennymi

Produktami ORF E6 i ORF E7 są dwa inne białka wirusowe o właściwościach onkogennych. Białko E6 u różnych typów wirusów tworzy od 132 do 152 aminokwasów i występuje głównie w jądrze. Na jego końcu karboksylowym znajdują się dwa moduły o strukturze palców cynkowych, niezbędne dla jego stabilności.

Białko E6 wirusów o wysokim potencjale onkogennym (np. HPV 16), ma zdolność wiązania się z komórkowym białkiem p53 co prowadzi do degradacji p53. Produktem ORF E7 jest białko jądrowe, zbudowane z 98 aminokwasów. Koniec aminowy tego białka tworzą kolejno regiony o sekwencji podobnej do konserwatywnych rejonów CR1 i CR2 białka E1A adenowirusa i dużego antygenu LT wirusa SV40. Regiony te odpowiedzialne są za wiązanie białka jądrowego z komórkowym białkiem Rb.

Natomiast na końcu karboksylowym białka będącego produktem ORF E7, występuje moduł o strukturze palców cynkowych, który umożliwia wiązanie E7 z DNA. Białko to może destabilizować przebieg cyklu komórkowego oddziałując na inne białka takie jak pRB, p107 i p130.

Kędzia W, et al.

Białka wirusowe L1, L2-strukturalne

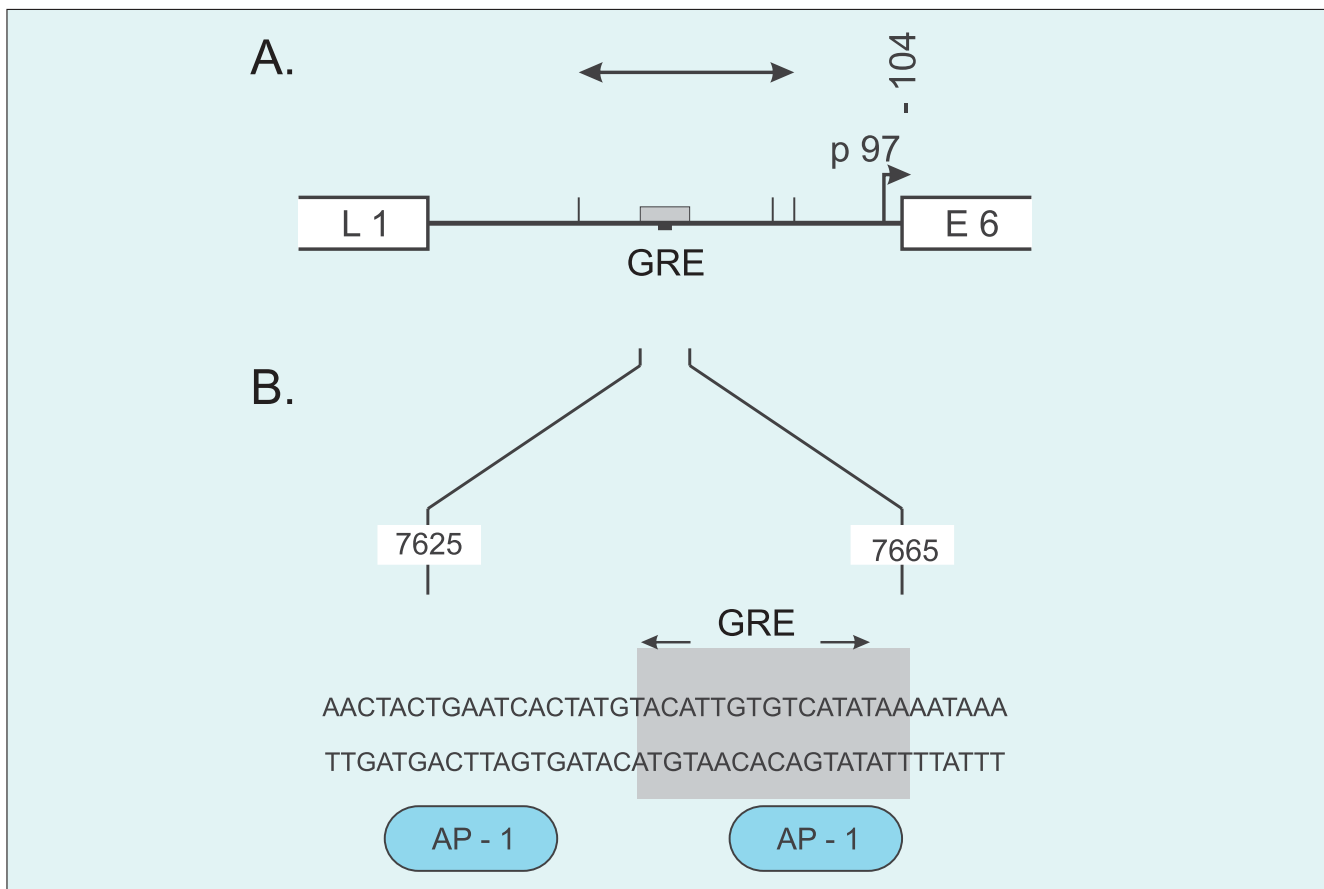
Produktami ORF L1 i ORF L2 są dwa białka strukturalne wirusa; L1 i L2. Do ich syntezy dochodzi tylko w zróżnicowanych keratynocytach. L1 ma masę cząsteczkową 56 kD i należy do najbardziej zachowawczych białek wirusa *Papilloma*. Białko L2 o masie cząsteczkowej 76 kD jest mniej zachowawcze. Proteiny te tworzą kapsyd wirusa HPV.

Długi region regulatorowy LCR

Pomiędzy otwartymi ramkami odczytu E6 i L1 w genomie wszystkich wirusów *Papilloma* znajduje się długi, niekodujący region regulatorowy LCR (*long control region*), zawierający odcinki bogate w AT, miejsce promotorowe dla polimerazy RNA II (p 97) oraz liczne elementy wiążące dla białek wirusowych i komórkowych pełniących funkcje regulatorów transkrypcji i replikacji wirusowego materiału genetycznego. W LCR można także wyróżnić odcinki zaangażowane w oddziaływanie na białka macierzy komórkowej i nukleosomy.

Regulacja promotora p97 jest procesem złożonym, w którym biorą udział liczne czynniki transkrypcyjne wywierające zarówno efekt pozytywny jak i negatywny na ekspresję genów wirusowych. Pozytywnymi efektorami transkrypcji ORF E6 i E7 są np. czynniki transkrypcyjne takie jak; Ap1, NF1, Oct 1, Sp1, TEF1, GRE, PEF-1. Natomiast negatywnymi efektorami transkrypcji są E2 i YY1, PSM-BP.

Z rejonem promotora, odpowiedzialnym za regulację transkrypcji genów wczesnych, pokrywa się odcinek częściowo odpowiedzialny za replikację (tzw. *ori*). W regionie LCR zidentyfikowano miejsca wiązania dla komórkowych czynników transkrypcyjnych takich jak: Ap1, Sp1, NF1, GRE, PVE-TEF-2, TEF1, oraz kilka elementów o strukturze ACCN6GGT, które wiążą wirusowe białko E2. Poza tym, analiza mutacyjna wykazała obecność 224 nukleotydowego wzmacniacza transkrypcji (*enhancera*), zależnego od czynników białkowych występujących w keratynocytach. U wirusów wykazujących powinowactwo do błon śluzowych narządów płciowych w pozycji 7709-7716, znajduje się 8 nukleotydowy odcinek o sekwencji TTGGCTTT. Sekwencje komplementarne do tego oktameru (AANCCAAA), występują w rejonach promotorowych kilku genów ludzkich takich jak; cytokeratyny, inwolukryny. Geny te są specyficznie transkrybowane w keratynocytach. Bliskie sąsiedztwo, jak również nakładanie się w LCR sekwencji miejsc wiążących czynniki białkowe wskazuje, że białka te działają na zasadzie kooperacji lub kompetycji. I tak np. stwierdzono, że aktywność NF1 jest zależna od czynników Ap1 czy Sp1. Sp1 wiąże się z miejscami bogatymi w pary GC. Białko to oddziałuje głównie na czynnik transkrypcyjny TFIID. Może także tworzyć kompleksy z wirusowym białkiem E2 zwiększając jego wiązanie z DNA. W regionie enhancerowym HPV 16 występuje również tzw. element GRE, zdolny do wiązania glikokortykoidów. (Rycina 2).



Rycina 2.

A. Struktura jednego z elementów wiążących receptor dla hormonów glukokortykoidowych (GRE) w rejonie regulatorowym DNA HPV 16.
B. Sekwencja nukleotydów rejonu GRE. W pobliżu GRE znajdują się sekwencje wiążące dla AP1.

Mechanizm kancerogenezy zachodzący w komórkach nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy...

Element ten jest aktywnym enhancerem w odpowiedzi na estrogen. Receptory dla hormonów steroidowych ułatwiają prawdopodobnie tworzenie kompleksu pre-inicjującego transkrypcję oraz stabilizują wiązanie specyficznych czynników białkowych niezbędnych dla transkrypcji określonych genów. Ponadto w LCR wirusów HPV zidentyfikowano kilka miejsc wiązania dla jądrowego czynnika ekspresji interleukiny-6 (NF-IL6) oraz białka YY1. Czynniki YY1 hamuje transkrypcję wirusowych genów. Wykazano, że mutacje w miejscach wiążących YY1 zwiększają aktywność wirusowego promotora p97. Represorem transkrypcji są także czynniki białkowe wiążące się z elementem PSM, którego sekwencja pokrywa się z miejscem replikacji *ori*. Poza wymienionymi czynnikami komórkowymi, głównym regulatorem transkrypcji wirusowych genów są białka wirusowe E2 (E2TR). Aktywacja transkrypcji jaka zachodzi przy udziale białka E2 zależy od ilości miejsc wiążących to białko, od ich lokalizacji w stosunku do promotora. I tak np. jeżeli miejsce takie występuje w odległości mniejszej niż 10 nukleotydów od promotora, białko to może być represorem transkrypcji. Jako represor działają także skrócone formy białka E2 (E2TR), które kompetycyjnie wiążą się do miejsc wiązania białka E2TA.

Białka wirusowe E1 i E2 oraz miejsce *ori* są również niezbędne do replikacji wirusowego DNA. Przerwanie ramki ORF-E1 lub ORF-E2 jakie zachodzi podczas integracji wirusa do genomu gospodarza powoduje zahamowanie ich ekspresji i niekontrolowaną syntezę dwóch białek onkogennych E6 i E7 [7].

Rola HPV w etiologii raka szyjki macicy

Wiele danych zarówno eksperymentalnych jak i klinicznych wskazuje na ścisły związek pomiędzy infekcją HPV, a rozwojem raka szyjki macicy. Infekcja wirusowa może wyprzedzać w czasie rozwój nowotworu. Jak długi będzie to okres, jest to uzależnione od szeregu czynników. Na pewno ma na to wpływ typ wirusa, czas trwania infekcji, obecność dodatkowych koinfekcji, ewentualne zaburzenia gospodarki hormonalnej, mutacje w genomie. W procesie tym ważną rolę odgrywają także czynniki egzogenne oddziałujące ze środowiska, wieloletnia hormonalna antykoncepcja lub sterydoterapia, wieloletnie palenie tytoniu, wiek nosiciela czy jego kondycja immunologiczna oraz współistniejące schorzenia mające wpływ na stan ogólny osoby zakażonej np. zaawansowana choroba nowotworowa, zakażenie HIV i inne. Powstawanie nowotworu jest procesem wieloetapowym i wieloczynnikowym. Uwzględniając rolę onkogennych wirusów brodawczaka ludzkiego całość zmian rozpoczyna się od zakażenia wirusem głębokich warstw błony śluzowej szyjki macicy. (Rycina 3, 4, 5).

Aby do tego doszło niezbędne są mikro-uszkodzenia śluzówki pochwy i szyjki macicy odsłaniające komórki warstwy bazalnej, które bogate są w receptory dla nabłonkowego czynnika wzrostu oraz jak już wspomniano powyżej wyposażone są w receptory dla HPV czyli integryny. Wyróżniamy dwie postacie obecności genomu wirusa HPV w obrębie keratynocyta: postać episomalną i zintegrowaną. Postać episomalna genomu HPV występuje w nieodróżnianej komórce nabłonka wielowarstwowego płaskiego i najczęściej przybiera formę struktur nukleosomalnych.

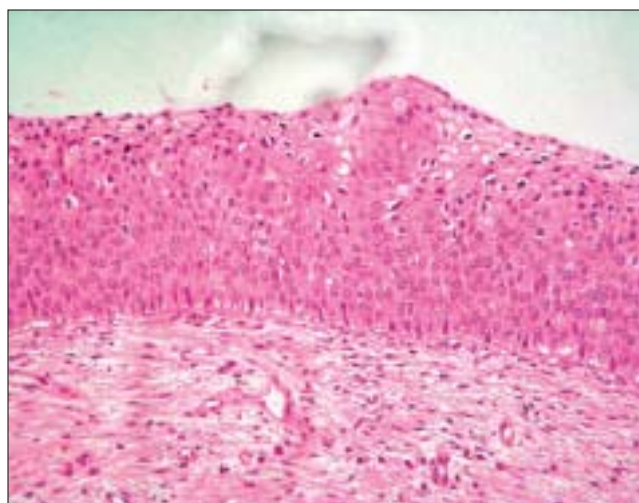
Pierwszą fazę obecności wirusa brodawczaka w obrębie keratynocyta charakteryzuje nasilona replikacja. Uchwytym diagnostycznie wykładnikiem tej fazy są charakterystyczne zmiany w morfologii keratynocyta, który przybiera postać tzw. koilocyta. Obraz kliniczny tej wczesnej fazy rozwoju zakażenia wirusowego interpretowany jest na podstawie cytologicznych i kolposkopowych cech zakażenia HPV prowadzących często wraz z upływem czasu obserwacji do sformułowania na podstawie wykonanej biopsji i badania patomorfologicznego rozpoznania śródnabłonkowej zmiany niskiego stopnia (CIN 1). Drugą fazą obecności HPV w obrębie keratynocyta jest inkorporacja wirusowego materiału genetycznego do genomu komórki gospodarza. Ten etap cyklu życiowego wirusa objawia się klinicznie stopniowym rozwojem zmian widocznych zarówno w obrazie cytologicznym jak i kolposkopowym zachodzących w morfologii keratynocyta, które wraz z upływem czasu obserwacji pozwalają po analizie materiału z biopsji zidentyfikować zmianę śródnabłonkową średniego lub wysokiego stopnia (CIN 2, CIN 3).

W dalszej części tekstu przedstawimy jakie zmiany molekularne wywołują obie fazy cyklu życiowego wirusa brodawczaka ludzkiego w keratynocycie na poszczególnych etapach tworzenia śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Punktem wyjścia zmian przednowotworowych i nowotworowych są mutacje w genach kontrolujących podziały komórkowe i ich różnicowanie. Do powstania raka nie wystarcza pojedyncza mutacja punktowa. Działanie onkogenne kilku karcinogenów kumuluje się w czasie powodując upośledzenie prawidłowego funkcjonowania od 3 do 5 genów.

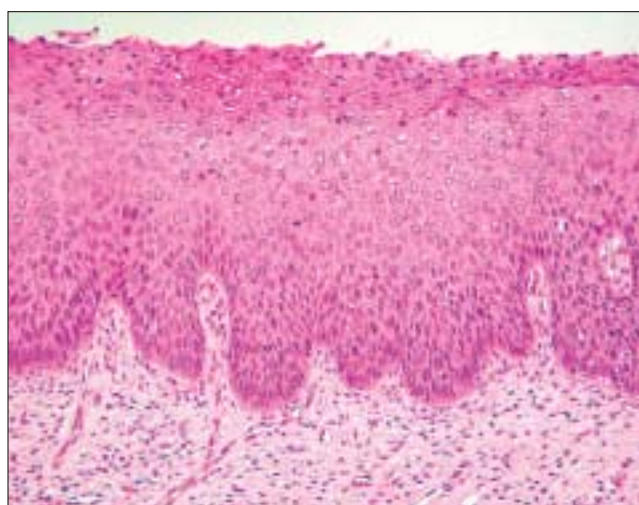
Istnieje kilka teorii tłumaczących złożony proces transformacji nowotworowej przy udziale wirusa HPV. Jedną z nich zakłada, że przerwanie ramki ORF E1 lub ORF E2, do jakiej dochodzi podczas integracji wirusa do genomu gospodarza powoduje zahamowanie ich ekspresji i niekontrolowaną syntezę dwóch białek onkogennych E6 i E7. Proteiny te mogą wchodzić w interakcje z dwoma regulatorami cyklu komórkowego p53 i RB, które są produktami genów supresji transformacji nowotworowej. Białko p53 jest zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, apoptozę oraz naprawę DNA [3]. W komórkach prawidłowych jego poziom jest bardzo niski, a ekspresja ściśle kontrolowana. W komórkach zainfekowanych HPV dochodzi do degradacji p53 przy udziale wirusowego białka E6. Białko E7 HPV 16 wiąże się natomiast z białkiem RB. Proteina ta w formie niesfosforylowanej tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, który działając jako aktywator transkrypcji genów komórkowych zaangażowanych w syntezę DNA powoduje przejście komórki do fazy S cyklu komórkowego. E7 może również tworzyć kompleksy z cyklinami (A, E, cdk 2), które regulują wejście komórki do fazy cyklu komórkowego S i G2/M. Transkrypcja genów E6/E7 jest także regulowana przez specyficzne czynniki Brn3a i Brn3b, występujące w keratynocytach. Białka te wiążą się z sekwencją ATGCAATT pełniąc odpowiednio funkcje aktywatora lub represora ekspresji wirusowych genów. Integracja wirusowego materiału genetycznego do komórki gospodarza może być również przyczyną:

- aktywacji protoonkogenu komórkowego,
- inaktywacji genów supresorowych,
- mutacji w protoonkogenach c-myc, H-ras.

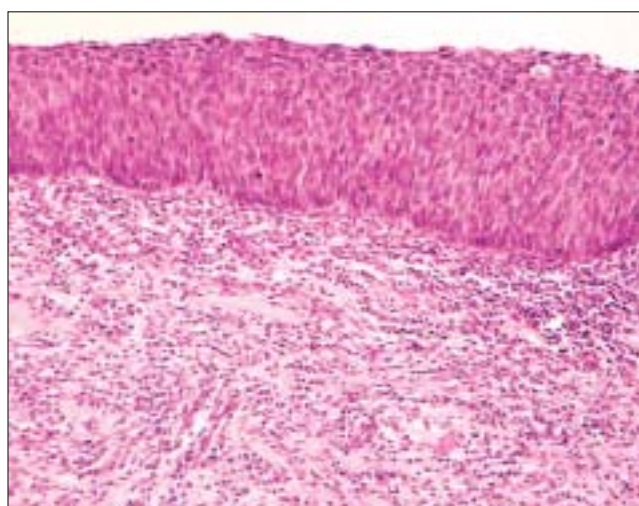
Kędzia W, et al.



Rycina 3. Obraz kolposkopowy oraz odpowiadający mu wycinek tkankowy przedstawiają odpowiednio śród nabłonkową neoplazję niskiego CIN 1, zmiany morfologii komórek zlokalizowane w warstwie bazalnej, koilocytoza w komórkach różnicującego się nabłonka paraepidermalnego.



Rycina 4. Obraz kolposkopowy oraz odpowiadający mu wycinek tkankowy przedstawiają odpowiednio śród nabłonkową neoplazję średniego stopnia CIN 2, zmiany morfologii komórek widoczne w 2/3 grubości nabłonka paraepidermalnego od strony błony podstawnej.



Rycina 5. Obraz kolposkopowy oraz odpowiadający mu wycinek tkankowy przedstawiają odpowiednio śród nabłonkową neoplazję wysokiego stopnia CIN 3, obejmującą całą grubość błony śluzowej.

Mechanizm kancerogenezy zachodzący w komórkach nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy...

Mutacje te mogą być przyczyną: nadekspresji białek, rearanżacji genomu lub amplifikacji. Obserwowano również utratę heterozygotyczności na chromosomach 3p, 6p, 11p, 18. Wirusy HPV mogą integrować do genomu komórkowego w jednej lub kilku kopiach. Włączone sekwencje wirusowe mają także wpływ na konformację chromatyny, powodując np. przesunięcie nukleosomów. Takie działanie sekwencji wirusowych zmienia dostępność DNA dla polimerazy RNA. Białka wirusowe poza tym, że wchodzi w reakcje z szeregiem czynników komórkowych, odgrywających ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, mogą także włączać się w sposób bezpośredni lub pośredni w regulację transkrypcji szeregu genów komórkowych. Wykazano, że białko E2 wirusa o masie 48 kDa aktywuje nieznacznie transkrypcję genów w genomie ssaków, pozbawionych nawet miejsc przeznaczonych do jego wiązania. Natomiast obecność nawet jednego elementu wiążącego zwiększa tempo transkrypcji 6-krotnie a dwóch elementów od 20 do 100-krotnie. Aktywność transkrypcyjna genów komórkowych przy udziale białka E2 wzrasta jeszcze bardziej w obecności aktywatorów transkrypcji np. białka Sp1. W komórkach zainfekowanych wirusem HPV16 stwierdzono nadekspresję receptora dla białka EGF (EGFR – *epidermal growth factor receptor*).

Za wzrost ekspresji odpowiedzialne są białka E6/E7, które zwiększają aktywność transkrypcyjną promotora EGFR od 3 do 5-krotnie. EGFR jest glikoproteiną błonową, która po związaniu liganda (białka EGF) ulega autofosforylacji. Sygnał ten jest następnie przekazywany do jądra komórkowego gdzie odpowiedzią na jego obecność jest synteza wielu białek komórkowych. EGF jest ważnym mitogenem dla komórek nabłonkowych szyjki macicy, a jego nadekspresję stwierdzono w komórkach licznych raków. Do normalnego funkcjonowania komórek nabłonkowych niezbędne są retinoidy. Ich niedobór prowadzi do neoplazji, która często cofa się po ich uzupełnieniu. Kwas retinowy jest zdolny do zahamowania syntezy EGFR [3].

Retinoidy działają poprzez specyficzne receptory jądrowe, do których należą również receptory dla:

- hormonów steroidowych,
- witaminy D3,
- hormonów tyreotropowych,
- glikokortykoidów.

Ich wpływ na aktywność transkrypcyjną genów wirusa HPV nie jest poznany. W szyjce macicy zidentyfikowano wszystkie receptory dla retinoidów; RAR alfa, RAR beta i RAR gama oraz RXR. Funkcjonują one w formie heterodimerów z RXR jak również oddziałują na inne czynniki transkrypcyjne w tym Ap1. Mogą także działać synergistycznie z receptorami dla witaminy D3. Wiadomo natomiast, że obniżonemu poziomowi retinoidów w surowicy towarzyszy zwiększona infekcja HPV. Na aktywność wirusów HPV ważny wpływ ma surowiczy poziom hormonów steroidowych. Znaczny wzrost częstości występowania infekcji wirusami brodawczaka ludzkiego obserwuje się u kobiet:

- z zaburzeniami gospodarki hormonalnej,
- w ciąży,
- podczas wieloletniej hormonalnej antykoncepcji.

W rejonie regulatorowym wirusa HPV 16 występuje element wiążący receptory dla glikokortykoidów (GR).

Receptory te w nieobecności liganda występują w kompleksie z białkami szoku termicznego Hsp90. Przyłączenie liganda (hormonu) powoduje odłączenie białka szoku termicznego i związanie aktywnego receptora z elementem GRE w DNA co prowadzi do aktywacji transkrypcji określonych genów. Kompleksy takie mogą również zmieniać strukturę chromatyny co sprzyja wiązaniu z DNA czynnika NF1 i ma wpływ na aktywność Oct1/2. Glikokortykoidy modulują poziom aktywności czynników komórkowych odpowiedzialnych za wzrost poziomu białek E6/E7. W sytuacji gdy są nieobecne, na enhancer wirusowy oddziałują prawdopodobnie inne kompleksy utworzone przez różne czynniki transkrypcyjne np. AP-1. AP-1 jest heterodimerem złożonym z dwóch białek protoonkogennych cJun i cFos. W komórkach szyjki macicy generalnie obserwuje się niski poziom receptorów dla glikokortykoidów. Keratynocyty wydzielają także endoteliny: ET1, ET2, ET3. Peptydy te biorą między innymi udział w regulacji proliferacji limfocytów i syntezie pigmentu. Ich działanie odbywa się poprzez specyficzne receptory należące do rodziny białek G. Receptor ETa wiąże silnie ET1 i ET2 i słabiej ET3. Receptor Etb jest mniej specyficzny niż ETa. W komórkach transformowanych przez HPV obserwowano znaczny wzrost poziomu ETa.

Ważny wpływ na przebieg procesu nowotworowego mogą mieć także infekcje współistniejące z HPV, np. zakażenie wirusem HSV czy Chlamydie. Infekcjom tym towarzyszy wydzielanie wolnych rodników, które dodatkowo działają destabilizująco na DNA. Obecność wirusa w komórce może także sprawić, że jest ona bardziej wrażliwa na działanie karcinogenów.

Niewiele jest danych dotyczących funkcjonowania systemu immunologicznego u osób zainfekowanych HPV. Dotychczas prowadzone badania wykazały zmniejszenie się liczby komórek prezentujących antygeny, komórek Langerhansa, wzmożoną ekspresję MHC-II, które zamiast stymulować odpowiedź immunologiczną indukują tolerancję na obecność HPV. Odnotowano także spadek liczby śródnabłonkowych limfocytów T oraz zmiany w stosunku subpopulacji limfocytów CD4 do limfocytów CD8 z przewagą CD8 w śródnabłonkowych neoplazjach i CD4 w rakach.

Na aktywność onkogeną wirusa HPV ma również wpływ struktura jego genomu. Wiele dowodów wskazuje, że progresja śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy w kierunku powstania inwazyjnego raka płaskonabłonkowego jest bardziej dynamiczna gdy dochodzi do infekcji onkogennymi typami HPV dodatkowo obciążonymi mutacjami w genie E6 i E7 [8].

Podobnie gdy mutacje dotyczą miejsc wiążących białka, które są odpowiedzialne za represję transkrypcji wirusowych genów: YY1 i PSM. Do represji transkrypcji zdolny jest tylko dimer PSM-BP, wiążący się z dwoma blisko siebie zlokalizowanymi elementami wiążącymi. W przypadku gdy dostępny jest tylko jeden z elementów wiążących, białko pozostaje nieaktywne.

Badania prowadzone przez Schmidt i wsp. wykazały występowanie szeregu form wirusa HPV 16 w rakach szyjki zawierających liczne zmiany w sekwencjach wiążących białko YY1, które miały wpływ na formowanie się kompleksów odpowiedzialnych za regulację transkrypcji wirusowych genów [5].

Kędzia W, et al.

Udział infekcji wirusem HPV16 i innych typów wysoko-onkogennych w transformacji nowotworowej udokumentowano nie tylko dla szyjki macicy, ale również dla raka płaskonabłonkowego sromu i pochwy. Wysoka korelacja współistnienia infekcji HPV z powstaniem raka szyjki macicy stwarza możliwość wykorzystania zakażenia wirusowego jako swoistego markera określającego ryzyko rozwoju procesu nowotworowego [1].

Piśmiennictwo

1. Baay M, Duk K, Groenier M, [et al.]. Relation between HPV 16 serology and clinicopathological data in cervical carcinoma patients: prognostic value of anti-E6 and/or anti E7 antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 1997, 44, 211-217.
2. Evander M, Frazer I, Payne E, [et al.]. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997, 71, 2449-2456.
3. Kędzia W, Schmidt M, Frankowski A, [et al.]. Immunohistochemical assay of p53, cyclin D1, c-erbB2, EGFR and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancers. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002, 40, 37-41.
4. Kędzia W, Schmidt M, Jasiński P, [et al.]. Integryna alfa-6 w rakach płaskonabłonkowych szyjki macicy HPV 16/18 pozytywnych i negatywnych. *Ginekol Pol.* 2001, 72, 207-211.
5. Schmidt M, Kędzia W, Goździcka-Józefiak A, [et al.]. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol.* 2001, 23, 65-77.
6. Snijders P, Steenbergen R, Heideman D, [et al.]. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concept and clinical implications. *J Pathol.* 2006, 208, 152-164.
7. Steenbergen R, de Wilde J, Wilting S, [et al.]. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.* 2005, 32, suppl 1, S25-S33.
8. Zehbe I, Wilander E, Delius H, [et al.]. Human papilloma-16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998, 58, 829-83333.