

Udział wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) w etiopatogenezie nowotworów głowy i szyi

The role of human papillomavirus (HPV) in etiopathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma

KAMAL MORSHED

Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej AM w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) jest małym wirusem DNA wykazującym szczególnie powinowactwo do nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego skórę i błony śluzowe. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że infekcja śluzówkowymi typami HPV może odgrywać rolę w łagodnych i złośliwych procesach nowotworowych głowy i szyi. Celem pracy było omówienie udziału wirusa HPV w transformacji nowotworowej oraz występowania wirusa HPV w nowotworach płaskonabłonkowych głowy i szyi o różnej lokalizacji.

Otolaryngologia, 2004, 3(3), 91-96

Słowa kluczowe: wirus brodawczaka ludzkiego (HPV), nowotwory płaskonabłonkowe głowy i szyi, infekcje śluzówkowe

Human papillomavirus (HPV) is a small DNA virus showing an affinity to the stratified squamous epithelium found on the mucosa and skin. The latest studies suggest HPV infection involvement in benign and malignant lesions of the head and neck. HPV infection is thought to be one of the causative factors in the development of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). The author discusses the role of HPV in neoplastic transformation and its incidence in squamous cell carcinoma of head and neck.

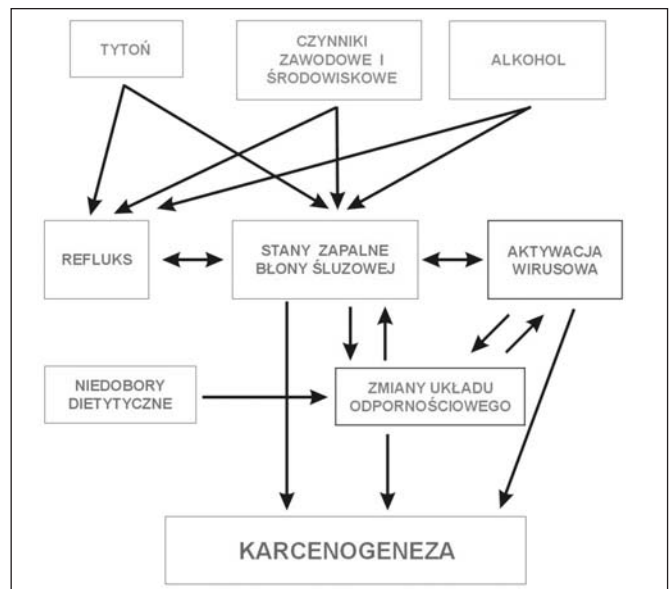
Otolaryngologia, 2004, 3(3), 91-96

Key words: human papillomavirus (HPV), head and neck squamous cell carcinoma, mucosal infections

Kancerogeneza jest złożonym procesem, w którego rozwoju odgrywają rolę różne czynniki (ryc. 1). W piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się doniesienia o współdziałaniu wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) w powstawaniu nowotworów. Do chwili obecnej związek między obecnością wysoce onkogennych typów HPV 16 i 18, a nowotworową transformacją komórek najlepiej poznano w patologii dróg moczowo-płciowych człowieka, a w szczególności szyjki macicy [1,2,3,4]. Związek pomiędzy transformacją nowotworową a obecnością wysoce onkogennych typów wirusa HPV został udowodniony w rozwoju raka płaskonabłonkowego szyjki macicy [1-3,5].

Występowanie zakażeń wirusem HPV w nowotworach górnych dróg oddechowych

Wielu autorów sugeruje, że zakażenie wirusem HPV może odgrywać dużą rolę w rozwoju łagodnych i złośliwych nowotworów górnych dróg oddechowych u człowieka. W literaturze spotyka się różne dane dotyczące roli HPV w powstawaniu nowotworów głowy i szyi. Fragmenty wirusa wykrywano u 22–83% chorych z rakiem głowy i szyi [6-11]. Wyniki pochodzą z badań



Ryc. 1. Model wieloczynnikowy karcenogenezy nowotworów głowy i szyi

wykonywanych metodą jakościową, na niewielkich grupach, co utrudnia ostateczną ocenę udziału wirusa w etiopatogenezie nowotworów głowy i szyi.

Obecność wirusa HPV typu 6 i 11 w brodawczakach krtani została potwierdzona przez wielu autorów zarówno u dorosłych, jak i w brodawczakach młodzieńcych [12]. W raku brodawczakowym (*carcinoma verrucosum*) Flis i wsp. [9] stwierdzili obecność HPV 16 i 18 u 45% grupy 29 chorych. W badaniach własnych stosując metodę PCR w grupie 20 chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani stwierdziliśmy obecność wirusa HPV typu 16 i 18 u 35% chorych. HPV 16 występował u 25%, a HPV 18 u 20% chorych [10]. Arndt i wsp. [13] analizowali obecność wirusa HPV w grupie 150 chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani. Stwierdzili oni zakażenie HPV w raku głośni u 65% chorych, w tym HPV 16 – u 35,8%, a obecność obu typów 16 i 18 u 15% chorych. HPV występował u 14,5% chorych z rakiem nadgłośniaowym, w tym typ 16 u 4,9%, a oba typy 16 i 18 u 2,4%. Częste występowanie HPV typów 16 i 18 w raku krtani przedstawił także Garcia-Milian i wsp. [11] wykazując obecność HPV typu 16 i 18 u 48,5% osób z grupy 33 analizowanych chorych. Stwierdził częstsze występowanie HPV 16 niż HPV 18. Zbliżone wyniki badań podał Venuti i wsp. [14], którzy wykazali obecność obu wysoko-onkogennych typów u 43% chorych z rakiem krtani.

Zakażenie wirusem HPV przenoszone drogą płciową, zwłaszcza u osób prowadzących intensywne życie seksualne, zostało potwierdzone w nowotworach jamy ustnej i części ustnej gardła. Smith i wsp. [15] stosując metodę PCR stwierdzili występowanie HPV wysokiego ryzyka u 20% chorych z rakiem jamy ustnej i części ustnej gardła, w tym typ 16 stwierdzono u 87%, typ 18 u 3%, a typ 33 u 11%.

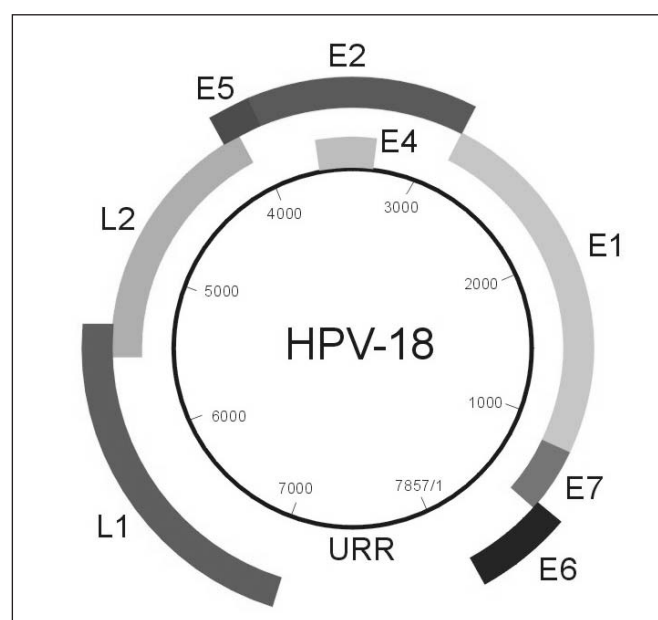
Istotnie statystycznie częstsze występowanie HPV w raku jamy ustnej niż w prawidłowej błonie śluzowej wykazał Zhang i wsp. [16]. Stwierdzili oni obecność HPV-16 i 18 w 74% próbkach raka jamy ustnej i w 55% próbek prawidłowej błony śluzowej. Nie wykazali natomiast związku pomiędzy obecnością HPV 16 i 18 a różnymi czynnikami ryzyka, takimi jak palenie papierosów, nadużywanie alkoholu, lokalizacja guza, stopień zróżnicowania histopatologicznego lub cecha TNM. Badanie wielośrodkowe prowadzone na dużej grupie 1670 chorych z rakiem jamy ustnej i części ustnej gardła i 1732 osób z grupy kontrolnej, wykazało obecność wirusa HPV u 3,9% chorych z rakiem jamy ustnej, natomiast w grupie chorych z rakiem części ustnej gardła wirus HPV stwierdzono u 18,3% chorych. Większość prowadzonych badań określających obecność wirusowego DNA w analizowanej tkance odnosiła się do obecności pojedynczych lub kilku typów HPV. Stosując metody SPF10 PCR (*short PCR fragment*) i INNO-LiPA (*Line probe assay*) pozwalających na określenie jednorazowo 25 typów HPV, obecność HPV stwierdzono u 61% chorych z nowotworami głowy i szyi, w tym HPV 16 występował u 37% chorych, a u 22% stwierdzono kilka typów HPV.

Badania te wykazały także obecność różnych form infekcji wirusem HPV. Obecności zintegrowanego DNA wirusa z DNA gospodarza stwierdzono u 48% chorych z dodatnim HPV 16, forma episomalna występowała u 35% chorych, a forma mieszana u 17% chorych [17]. Uważa się, że w raku migdałków podniebiennych ekspozycja na zakażenie wirusem HPV jest większa niż w przypadku innych narządów górnych dróg oddechowych ze względu na możliwości wnikania wirusa do warstwy podstawnej nabłonka. W miarę dojrzewania wirus pojawia się w warstwie powierzchniowej. Obecności wirusa HPV w raku migdałków podniebiennych stwierdzono u około 45% chorych [18,19].

Wielu autorów stwierdza obecność DNA wirusa HPV w przerzutowych węzłach chłonnych z regionu głowy i szyi. Hoshikawa i wsp. [20] stwierdzili występowanie HPV u 17,64%, a Begum i wsp. [21] u 32% chorych z przerzutami do węzłów chłonnych szyi, w tym u 71% chorych z HPV wykrytym w węzłach chłonnych ognisko pierwotne znajdowało się w części ustnej gardła.

Właściwości wirusa HPV

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) jest pozbawionym otoczki wirusem DNA o ikosaedralnej symetrii, wielkości około 55nm. Genom wirusa stanowi podwójna kolistą cząsteczkę DNA o długości około 8000 par zasad. Obejmuje on dwa regiony kodujące wczesny (*early* – E) i późny (*late* – L), rozdzielone regionem regulatorowym (*long control region* – LCR), znanym również jako URR (*Upstream Regulatory Region*) (ryc. 2). Wszystkie geny wirusa znajdują się na jednej



Ryc. 2. Schemat budowy wirusa HPV typu 18. URR i LCR – region regulatorowy, E – region wczesny i L – region późny

nici DNA, która jest aktywna transkrypcyjnie. Geny te skupione są w tzw. otwarte ramki odczytu (*open reading form* – ORF) [3,22]. Wirusy HPV stanowią bardzo liczną grupę wirusów, w której 85 typów ma całkowicie, a około 120 typów częściowo rozpoznaną sekwencją nukleotydową [3].

Zakażenie wirusem HPV przenoszone jest przez kontakty seksualne, zwłaszcza u młodych kobiet lub przez kontakty ustno-płciowe powodując infekcje jamy ustnej, gardła i krtani [23,24]. Opisano także infekcje przenoszone przez narzędzia medyczne oraz promienie lasera [25,26]. Infekcja wirusem HPV jest ułatwiona w wyniku kontaktu zainfekowanego materiału zakaźnego ze zmacerowanym bądź uszkodzonym nabłonkiem płaskim błony śluzowej.

Wirusy HPV wykazują szczególne powinowactwo do nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego skórę i błony śluzowe, gdzie ich pełny cykl rozwojowy może zachodzić jedynie w różnicujących się komórkach nabłonkowych [6,27]. W warstwie podstawnej i przy-
podstawnej błony śluzowej, w dzielących się komórkach nabłonka, jako pierwsze ulegają ekspresji wczesne białka wirusowe. Pozwala to na zwielokrotnienie materiału wirusowego podczas podziału komórkowego w postaci ekstrachromosomalnej lub zintegrowanej z genomem gospodarza. Ten charakterystyczny tropizm pozwolił podzielić wszystkie HPV na dwie grupy: HPV skórne i śluzowe, w których z kolei wyodrębniono następujące jego typy:

1. o niskim potencjale onkogenym, tj. 6, 11, 42, 43, 44,
2. o umiarkowanym potencjale onkogenym, tj. 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,
3. o dużym potencjale onkogenym, tj. 16, 18.

Infekcyjne cząsteczki potomne wirusa wytwarzane są tylko w pełni zróżnicowanych kreatynocytach. W cyklu litycznym wirusów rozróżniamy dwa okresy: wczesny i późny. W okresie wczesnym zachodzi przyłączenie wironów do komórki gospodarza, penetracja i uwolnienie genomu wirusa do wnętrza komórki. W dalszym etapie okresu wczesnego dochodzi do częściowej ekspresji wirusowej informacji genetycznej, jak również derepresji, niektórych regulatorowych układów gospodarza, co może prowadzić do modyfikacji składników komórkowych lub wirusowych umożliwiających powielanie wirusowego genomu. Okres późny rozpoczyna się pojawieniem w komórce wirusowych genomów potomnych. W tym okresie zachodzi synteza wirusowych białek strukturalnych i wytworzenie dojrzałych wironów [22].

Białka regionu wczesnego (E) odpowiedzialne są za wirusową transkrypcję i replikację wirusowego DNA oraz właściwości w procesie transformacji komórkowej, zaś białka regionu późnego (L) to proteiny strukturalne wirusowego kapsydu [28]. Najważniejsze białko kapsedowe jest kodowane w regionie L1 ORF, natomiast w regionie L2 ORF są kodowane białka dodatkowe dla komponentu strukturalnego kapsydu wirusowego, które

mają być odpowiedzialne za antygenowość i specyficzną reaktywność w odniesieniu do surowicy odpornościowej [29].

Patogeneza procesu nowotworowego z udziałem HPV

Pomiędzy pierwotną infekcją HPV a rozwojem śród-nabłonkowej patologii oraz inwazyjnego raka upływa zwykle okres kilkudziesięciu lat (średnio 20-30 lat). Naukowcy badający patologię zakażenia HPV zgodnie twierdzą, że proces nowotworowy może być wy tłumaczony jedynie obecnością samej infekcji wirusowej.

Infekcja HPV, chociaż konieczna do unieśmiertelnienia komórek, nie jest wystarczająca dla powstania nowotworu złośliwego. Aby nastąpił rozwój nowotworu, muszą dodatkowo wystąpić mutacje w kilku genach kontrolujących wzrost komórki. Większość komórek pierwotnie zainfekowanych zawiera DNA wirusa głównie w formie episomalnej, podczas gdy w zmianach nowotworowych stwierdza się DNA wirusa zintegrowanego z DNA komórkowym [30]. Jeżeli jednakże dojdzie do uszkodzenia jego ramek odczytu E1 lub E2, wirusowy DNA może zintegrować się z genomem gospodarza [29,31]. Pełny cykl rozwojowy wirusa i wytwarzanie cząstek potomnych zachodzi tylko w dojrzałych keratynocytach, w których DNA HPV może zintegrować się z genomem gospodarza [32].

Onkoproteiny E6 i E7 HPV odpowiedzialne są za unieśmiertelnienie ludzkich keratynocytów dróg moczowo-płciowych, choć ostatnie doniesienia sugerują podobną ich rolę w stosunku do komórek nabłonka drzewa oskrzelowego, śródbłonka naczyń, komórek gruczołu krokowego czy jajnika [2]. Te onkogenne białka, poprzez oddziaływanie i inaktywację supresorowych protein Rb i p53, ingerują w cykl komórkowy, sprzyjając pojawieniu się niestabilności chromosomowej już we wczesnej fazie immortalizacji. Ekspresja białek E6 i E7 jest wstępnym warunkiem umożliwiającym stałą stymulację wzrostu komórek z opóźnieniem ich końcowego zróżnicowania. Poziom ekspresji tych wirusowych onkoprotein jest różny w zależności od stopnia zaawansowania procesu chorobowego i właściwości onkogennych wirusów. Ilość produktu genów E6 i E7 w zakażeniu wirusami z grupy wysokiego ryzyka onkogennego jest początkowo efektywnie kontrolowana przez systemy komórkowej regulacji. W miarę postępu choroby, indukowane przez wirusowe onkoproteiny mutacje, zaburzające funkcje różnych komórkowych genów modyfikujących razem z zewnętrznymi czynnikami predysponującymi do rozwoju raka, zwiększają ekspresję E6 i E7. Przyczynia się to do złośliwej transformacji komórki [33,34].

Regulacja ekspresji wirusowych genów jest dość skomplikowana i podlega kontroli zarówno komórkowych, jak i wirusowych białek transkrypcyjnych. Najważniejszym

miejszem regulacji są specyficzne sekwencje w obszarze wirusowego LCR. Wirusowy DNA jest transkrybowany z udziałem komórkowej polimerazy w dwóch fazach. W pierwszej są transkrybowane geny wczesne (E), których produkty są niezbędne do replikacji wirusowego DNA, w drugiej natomiast, zwanej fazą późną (L) – geny których produkty stanowią białka strukturalne wirusa. Transkrypcja genów wczesnych i późnych rozpoczyna się w rejonie kontrolnym wirusa, zawierającym także miejsca inicjacji replikacji wirusowego DNA [35].

Skutkiem infekcji HPV jest zmiana w regulacji cyklu komórkowego prowadząca do utraty przez komórki kontroli nad jej proliferacją. Proces unieśmiertelnienia ludzkich keratynocytów jest związany z wirusowymi onkoproteinami E6 i E7. Powodują one infekcję i/lub degradują produkty komórkowych genów supresorowych p53 i pRb. Sprzyja to rozregulowaniu cyklu komórkowego oraz pojawieniu się niestabilności chromosomalnej, w wyniku czego dochodzi do złośliwej transformacji komórek [29,36,37].

W badaniach na liniach komórkowych w długotrwałej hodowli linii unieśmiertelnionych przez typy 16 i 18 HPV początkowo bez cech złośliwości z czasem obserwowano pojawienie się złośliwych podlinii. Badania te podkreślają potencjalną onkogenność tych wirusów związaną głównie z ekspresją genów E6/E7, których produkty wykazano we wszystkich unieśmiertelnionych liniach [38,39]. W prawidłowych komórkach uszkodzenie DNA prowadzi do aktywacji p53 i zatrzymania cyklu komórkowego przed rozpoczęciem syntezy DNA. W obecności białka E6 działanie p53 jest zniesione [40,41].

Oba białka występujące w onkogennych typach HPV współdziałają w procesie nieśmiertelności i transformacji komórek [42,43]. Białko E7 tych wirusów jest zdolne do dokonania transformacji w komórkach pochodzących z linii komórkowej [44]. Podobnie białko E6 wykazuje niezależne działanie onkogenne powodujące nieśmiertelność ludzkich komórek nabłonkowych [45]. Geny E6 i E7 kodują białko stymulujące wzrost, szczególnie specyficznych typów E6 i E7 dotyczące progresji wzrostu nowotworu złośliwego [46].

Większość obserwacji dotyczących funkcji białka E6 wykazało związek i współdziałanie z onkogenami ras [47] oraz białka p53 w powstawaniu nieśmiertelności komórek [48,49]. Badania eksperymentalne wykazują, że jednym z głównych mechanizmów działania E6 HPV jest hamowanie aktywności białka p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym i ważnym regulatorem cyklu komórkowego [50]. Białko E6 tworzy stabilny kompleks z produktem genu p53 [51]. Kompleks ten ulega ubikwityni-

zacji w proteosomach. Tym samym stężenie białka p53 w komórce obniża się niekorzystnie [48]. Odpowiednie stężenie białka p53 w komórce jest niezbędne do regulacji proliferacji, wzrostu i różnicowania się komórek [49]. Działania p53 są skutecznie hamowane dopiero po degradacji tego białka. Inaktywacja genu p53 przez mutacje punktowe lub onkogenne białko E6, znosząc p53-zależną regulację cyklu podziałowego komórki ułatwia komórce jej wzrost, zwiększa częstość występowania spontanicznych mutacji i przyczynia się do utrwalenia niestabilności chromosomowej w komórkach zarażonych przez HPV wysokiego ryzyka. Jednak degradacja p53 przez E6 nie jest jedyną funkcją tych onkoprotein wirusa. Wzajemnie oddziaływanie między E6 i p53 najwyraźniej wystarcza do zniesienia takich funkcji p53, jak przyłączenie się do DNA, transaktywacja, transrepcja i transkrypcja [52,53].

Białko E7 kodowane przez onkogenne typy HPV wiąże się z produktem genu RB (pRb) i pokrewnymi mu białkami p107 i p130. Powinowactwo wiązania białka E7 HPV wysokiego ryzyka do pRb jest w przybliżeniu 10 razy wyższe niż w przypadku białka E7 HPV niskiego ryzyka [37,54]. Wiązanie E7/pRb uwalnia czynnik transkrypcyjny E2F z kompleksu pRb, aktywując transkrypcję genów regulujących proliferację komórkową. Wiązanie czynnika E2F z promotorami genów zależnych od E2F prowadzi do pojawienia się w komórce wielu białek zaangażowanych w syntezę komórkowego DNA i wejścia komórki do fazy S cyklu komórkowego [55,56]. Kompleks pRb/E7 biorący udział w transformacji komórek, jest potrzebny tylko w przypadku obecności E6 i E7. Możliwe jest, że inne białka kodowane przez wirus, takie jak E5 mogą zastępować interakcję E7/pRb [57]. Większość autorów sugeruje jednak, że interakcja E7/pRb jest głównym mechanizmem unieśmiertelniania komórek zakażonych HPV [58].

Diagnostyka

Rozwój technik molekularnych pozwolił w ostatnim okresie na szybki postęp w diagnostyce wirusowej, zarówno w wykrywaniu obecności cząsteczek DNA wirusa, jak i rozpoznawaniu molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej. Pozwala to na wykrycie i analizę czynników prognostycznych, które w powiązaniu z danymi klinicznymi mogą mieć duże znaczenie w wyborze metody leczenia lub określeniu rokowania.

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych (KBN) projekt nr 3 P05C 062 24.

Piśmiennictwo

1. Ishiji T. Molecular mechanisms of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol* 2000; 27(2): 73-86.
2. Zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 12888(2): 55-78.
3. Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 690-698.
4. Zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 12888: F55-78.
5. Elliot P. Prognostic factors in cervical cancer: The first Chien-Tien Hsu memorial lecture. W: XIVth Asian and Ocean Congress of Obstetrics and Gynaecology, Manira. November 1993: 5-15.
6. Clayman GL, Stewart M., Weber RS i wsp. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 743-748.
7. Almadori G, Cadoni G, Cattani P i wsp. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1996; 32A(5): 783-788.
8. Atula S, Grenman R, Kujari H i wsp. Detection of human papillomavirus (HPV) in laryngeal carcinoma cell lines provides evidence for a heterogeneous population. *Eur J Cancer* 1999; 35(5): 825.
9. Fliiss DM, Noble-Topham SE, McLachlin CM i wsp. Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1994; 104: 146-152.
10. Morshed K, Stenzel A, Szymański M i wsp. Wykrywanie obecności wirusa brodawczaka ludzkiego HPV 16 i 18 w raku krtani z zastosowaniem metody PCR. *Otolaryngol Pol* 2001; 55: 29.
11. Garcia-Milian R, Hernandez H, Panade L i wsp. Detection and typing of human papillomavirus in benign and malignant tumours of laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol* 1998; 118: 754-758.
12. Lindberg H, Johansen L. The presence of human papillomavirus (HPV) In solitary adult laryngeal papillomas demonstrated by in-situ hybridization with sulphonated probes. *Clin Otolaryngol* 1990; 15: 367.
13. Amdt O, Brock J, Bauer i i wsp. Different human papillomavirus types in squamous cell cancer of the larynx. *Otolaryngol Pol* 1994; supl. 16: 31.
14. Venyti A, Manni V, Morello R i. wsp. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol* 2000; 60: 396-402.
15. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF i wsp. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108: 766-772.
16. Zhang ZY, Sdek P, Cao J i wsp. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 71-74.
17. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I i wsp. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003; 107: 401-406.
18. Mellin H, Friesland S, Auer G i wsp. Human papillomavirus and DNA ploidy in tonsillar cancer-correlation to prognosis. *Anticancer Res* 2003; 23: 2821-2828.
19. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U i wsp. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003; 192: 129-132.
20. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H i wsp. Detection of human Papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1990; 100: 647-650.
21. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA i wsp. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6469-6475.
22. Scheffner M, Wernes BA, Hubregtse JM i wsp. E6 oncoprotein encoded by human papillomaviruses typ 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
23. Fairley CK, Chen S, Tabrizi SN i wsp. The absence of genital human papillomavirus DNA in virginal women. *Int J STD AIDS* 1992; 3(6): 414-417.
24. Kashima HK, Shah F, Lyles A i wsp. A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 1992; 102(1): 9-13.
25. Garden JM, O'Banion MK, Shelnitz LS i wsp. Papillomavirus in the vapor of carbon dioxide laser-treated verrucae. *J Am Med Assoc* 1988; 259(8): 1199-1202.
26. Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. Carbon dioxide laser energy disperses human papillomavirus deoxyribonucleic acid onto treatment fields. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1271-1274.
27. Egawa K, Iftner A, Doorbar J i wsp. Synthesis of viral DNA and late capsid protein L1 in parabasal spinous cell layers of naturally occurring benign warts infected with human papillomavirus type 1. *Virology* 2000; 268(2): 281-293.
28. Poljak M, Gale N, Kambic V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl. 527: 66-69.
29. Doorbar J, Gallimore PH. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 1987; 61(9): 2793-2799.
30. Park JS, Hwang ES, Park SN i wsp. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1997; 65(1): 121-9.
31. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ i wsp. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185(1): 251-257.
32. Willey JC, Broussoud A, Sleemi A i wsp. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. *Cancer Res* 1991; 51(19): 5370-5377.
33. Stoler MH, Rhodes CHR, Whitbeck A i wsp. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992; 23: 117-128.
34. Knebel v Doeberitz M, Spitkovsky D, Ridder R. Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. *Verh Dtsch Ges Path* 1997; 81: 233-239.
35. Howley PM. The Viruses and Their Replication. (w) Fields Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (red.). 3-rd edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
36. Doyle DJ, Henderson LA, Lejeune FE i wsp. Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 1273-1276.
37. Dyson N, Howley PM, Munger K i wsp. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243(4893): 934-937.

38. Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP i wsp. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(2): 570-574.
39. Pecoraro G, Lee M, Morgan D, Defendi V. Evolution of in vitro transformation and tumorigenesis of HPV16 and HPV18 immortalized primary cervical epithelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138(1): 1-8.
40. Foster SA, Demers GW, Etscheid BG i wsp. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol* 1994; 68(9): 5698-5705.
41. Etscheid BG, Foster SA, Galloway DA. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology* 1994; 205(2): 583-585.
42. Munger K, Phelps WC, Bubb V i wsp. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63(10): 4417-4421.
43. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL i wsp. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8(12): 3905-3910.
44. Munger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155(1): 111-23.
45. Trask DK, Band V, Zajchowski DA i wsp. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(6): 2319-2323.
46. Mansur CP, Androphy EJ. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155(3): 323-345.
47. Storey A, Banks L. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* 1993; 8(4): 919-24.
48. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM I wsp. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63(6): 1129-1136.
49. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D i wsp. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.
50. Standbridge EJ. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Since* 1990; 247: 12-13.
51. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248(4951): 76-79.
52. Crook T, Fisher C, Masterson PJ i wsp. Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. *Oncogene* 1994; 9(4): 1225-1230.
53. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994; 68(7): 4262-4273.
54. Lam EW, Morris JD, Davies R i wsp. HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J* 1994; 3(4): 871-878.
55. Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 1990; 62(4): 659-669.
56. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC i wsp. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63(10): 4317-4324.
57. Melillo RM, Helin K, Lowy DR i wsp. Positive and negative regulation of cell proliferation by E2F-1: influence of protein level and human papillomavirus oncoproteins. *Mol Cell Biol* 1994; 14(12): 8241-8249.
58. Morris JD, Crook T, Bandara LR i wsp. Human papillomavirus type 16 E7 regulates E2F and contributes to mitogenic signalling. *Oncogene* 1993; 8(4): 893-898.