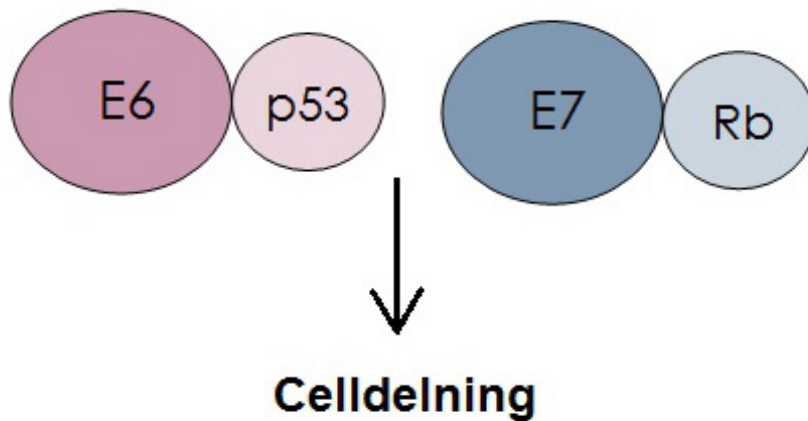




UPPSALA
UNIVERSITET

HPV-onkogenernas betydelse vid utveckling av livmoderhalscancer



Emmy Borgmästars

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

I ungefär 71 % av livmoderhalscancerfallen världen över har högrisk humant papillomvirus (HPV) påträffats, närmare bestämt typerna 16 och 18. Även andra högrisk HPV-typer har påträffats i vissa fall av livmoderhalscancer. HPV har ett ganska litet genom på 8 kb men innehåller de så viktiga onkogenerna *E6* och *E7* som uttrycks när en HPV-infektion förvandlas till livmoderhalscancer. Onkoproteinerna *E6* och *E7* binder till många faktorer som bidrar till en okontrollerad celltillväxt och därmed celledelning. Två av dessa faktorer är tumörsuppressorererna *p53* och *Retinoblastoma* protein som har en mycket viktig roll i cellen efter uppkomsten av exempelvis DNA-skador. Två vacciner finns idag mot att förebygga utveckling av livmoderhalscancer som orsakas av högrisk HPV-infektion. Det finns ett tvåvärdigt och ett fyrvärdigt vaccin och tillsammans skyddar de mot högrisk HPV-typerna 6, 11, 16 och 18. Vaccinerna består av viruslika partiklar och designas utifrån det virala kapsidproteinet *L1*. En ny metod för att bota livmoderhalscancer vore att utveckla läkemedel som kan inhibera *E6* och *E7*'s aktivitet, antingen på transkriptions- eller post-transkriptionsnivå. Inhibering av *E6* och *E7* har i flera studier haft en hämmande effekt på celltillväxten. I framtiden kan vi kanske använda denna väg för att bota livmoderhalscancer, det som återstår att göras är att finna de mest effektiva vektorerna för att få in inhibitorerna till målcellerna.

Inledning

Globalt sett drabbar livmoderhalscancer ungefär en halv miljon kvinnor och dödar ungefär 275 000 kvinnor varje år (WHO/ICO 2010). De flesta fallen finns i utvecklingsländerna. Samma rapport visar att man i 71 % av fallen har hittat förekomst av HPV (humant papillomvirus) typerna 16 och 18. Hittills har 120 olika HPV-typer identifierats (Bernard *et al.* 2010). Klassificeringen av typerna i studien gjordes på det sättet att om nukleotidsekvensen i *L1* genen, som kodar för det större kapsidproteinet, skiljde med mer än 10 % från varandra så räknades de som olika HPV-typer. HPV är ett virus som har ett genom på 8 kb (Murray *et al.* 2005a) och kan delas in i två klasser; hög- och lågrisk HPV-typer. Till högrisk HPV-typer hör de virus som kan ge upphov till utvecklingen av livmoderhalscancer. Till den klassen hör HPV-typerna 16 och 18. Lågrisk HPV-typer, såsom HPV-typerna 6 och 11, har inte kapacitet att öka risken för utvecklandet av livmoderhalscancer.

Efter en HPV-infektion är det många faktorer som bidrar till utvecklandet av livmoderhalscancer. Det som är gemensamt för högrisk HPV är att de innehåller gener som blivit klassade som onkogener. Dessa är *E5*, *E6* och *E7*, där *E* står för tidiga gener (eng. early genes) (Münger *et al.* 1989a, Chen & Mounts 1990). Onkoproteinerna i högrisk HPV kan ge upphov till okontrollerbar celledelning genom att binda till tumörsuppressorererna *p53*, tumörprotein 53, respektive *Rb*, *retinoblastoma* protein, och inaktivera eller degradera dem (Dyson *et al.* 1989, Scheffner *et al.* 1990, Huibregtse *et al.* 1991). *E6* och *E7* finns även i lågrisk HPV-typer, men man har inte kunnat påvisa att de kan inducera nedbrytning av tumörsuppressorer i de fallen. Dessutom binder oftast *E6* och *E7* från lågrisk HPV-typer till tumörsuppressorererna med lägre affinitet än *E6* och *E7* från högrisk HPV-typer (Münger *et al.* 1989b, Lechner *et al.* 1994).

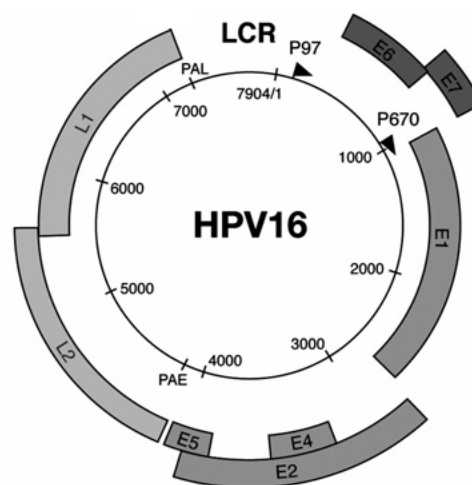
Två vacciner har hittills tagits fram mot både högrisk och lågrisk HPV-typer. Dessa är *Cervarix* som skyddar mot HPV-typerna 16 och 18 och *Gardasil* som skyddar mot HPV-typerna 6, 11, 16 och 18 (GlaxoSmithKline 2011, Merck Sharp & Dohme Corporation 2011). Båda vaccinerna innehåller renat *L1* protein från HPV-typerna som vaccinet skyddar mot och bildar viruslika partiklar (VLPs). Vaccinerna är typspecifika (Rose *et al.* 1994, White *et al.* 1998),

vilket är en nackdel med dem eftersom man har hittat förekomsten av minst 15 olika högrisk HPV-typer i fall av livmoderhalscancer, det vill säga inte bara HPV-typerna 16 och 18 (Muñoz *et al.* 2003). I flera studier föreslår man att inhibering av vissa faktorer som bidrar till utvecklandet av livmoderhalscancer skulle kunna vara en metod för den framtida läkemedelsutvecklingen (Darnell *et al.* 2007, Jiansong *et al.* 2012). Inhibering av E6 och E7 verkar ändå vara den mest effektiva eftersom man har visat att nivåerna av Rb och p53 kan återupptas vid inhibering av uttrycket av dessa virala onkogener samt att åldrande och programmerad celledöd (apoptos) ökade i livmoderhalscancer cellerna (Goodwin & DiMaio 2000).

Onkoproteinerna E6 och E7 bidrar till en ökad okontrollerbar celltillväxt genom att interagera med ett flertal olika cellulära faktorer. Syftet med min uppsats är att redovisa hur interaktionerna E6-p53, E6-E6-AP och E7-Rb i celler infekterade av högrisk HPV-typerna 16 och 18 bidrar till risken för att utveckla livmoderhalscancer. Kan man använda denna kunskap för att utveckla nya läkemedel mot livmoderhalscancer?

Högrisk HPV – gener

HPV är ett dubbelsträngat DNA virus med ett litet genom på 8 kb (Murray *et al.* 2005). Det finns 8 gener i HPV-typerna 16 och 18, 6 stycken så kallade tidiga gener och 2 stycken så kallade sena gener (Figur 1). DNA från HPV finns i infekterade celler som antingen episomer, det vill säga fria DNA-molekyler, eller integrerade i värdcellens DNA (Cooper *et al.* 1991). De tidiga generna är de som uttrycks tidigt efter en HPV-integrering. I samband med HPV-integrering försvinner E2, E4 och E5 (Schwarz *et al.* 1985). I en studie utförd av Romanczuk och Howley (1992) visade man att när E1 och E2 slås ut vid HPV-integrering så leder detta till en ökad celledning och celltillväxt. Proteinet som kodas av E2 har även visats kunna inhibera celltillväxt (Dowhanick *et al.* 1995). E1 är viktig för HPV replikering (Ustav & Stenlund 1991). E6 och E7 är två av de tidiga generna som anses vara mycket viktiga för att undvika cellcykelstopp och apoptos. Uttrycket av E6 och E7 kontrolleras av promotorn P97 och de har blivit klassificerade som onkogener (Smotkin & Wettstein 1986, Münger *et al.* 1989a). Onkogener är gener som kan öka risken för att utveckla cancer. Produkten som kodas av E5 räknas också som ett onkoprotein, men i denna uppsats tas endast E6 och E7 upp (Chen & Mounts 1990). De sena generna, L1 och L2, uttrycks sent efter en HPV-infektion. L1 och L2 kodar för de större respektive de mindre kapsidproteinerna. Det är kapsiden som cellen känner igen och därför har L1 proteinerna använts för utvecklandet av vaccin i form av VLPs (GlaxoSmithKline 2011, Merck Sharp & Dohme Corporation 2011).



Figur 1. Gener i HPV-typ 16. E1, E2, E4, E5, E6 och E7 hör till de tidiga generna. L1 och L2 hör till de sena generna. LCR står för 'long control region' och kodar inte för något protein. Reproducerad med tillstånd, från John Doorbar, 2006, *Clinical Science*, **110**, 525-541 © the Biochemical Society.

Onkogener i högrisk HPV

Till onkogenerna i högrisk HPV räknas *E5*, *E6* och *E7*, varav de två viktigaste vid utvecklandet av livmoderhalscancer är *E6* och *E7* (Münger *et al.* 1989a, Chen & Mounts 1990). Dessa två har blivit klassade som onkogener eftersom de kan orsaka genom instabilitet i högrisk HPV-infekterade celler för att de påverkar nivån av tumörsuppressorer i cellen. På grund av interaktionen mellan onkoproteinerna och tumörsuppressorer ökar risken för okontrollerbar celldelning och då även risken för att utveckla cancer.

Tumörsuppressorerans uppgift i cellen är att ansvara för kontrollpunkter i cellcykeln, reparera skadat DNA samt inducera apoptos när DNA-skador som uppstått inte kan repareras. Två välkända tumörsuppressorer är Rb och p53. I många fall av cancer har man hittat muterat p53 eller Rb som inte fungerar (Klug *et al.* 2007a). *E6* kan binda till tumörsuppressorn p53 som reglerar gener och ansvarar för att inducera apoptos samt stoppa cellcykeln för att inducera reparering av skadat DNA (Werness *et al.* 1990, Klug *et al.* 2007a). *E6* kan påverka nivån av p53 (Scheffner *et al.* 1990, Werness *et al.* 1990). Två exempel på dessa vägar är när *E6* binder till ett komplex som kallas E6-AP (*E6* associerat protein) och p53 (Huibregtse *et al.* 1991), vilket leder till nedbrytning av p53, samt när *E6* binder direkt till p53 (Lechner & Laimins 1994). *E7* kan binda till Rb som räknas som en tumörsuppressor eftersom den ansvarar för kontrollpunkten G1/S i cellcykeln (Dyson *et al.* 1989, Klug *et al.* 2007a). *E6* och *E7* från högrisk HPV binder inte bara till p53 respektive Rb, de kan även interagera med ett antal andra komponenter i värdcellen. Dessa interaktioner bidrar på olika sätt till den ökade celltillväxten och onkoproteinerna från högrisk HPV-typer kan interagera med dessa faktorer antingen direkt eller indirekt. I tabell 1 tas några exempel upp på de komponenterna och i denna uppsats redovisas endast *E6*-p53, *E6*-*E6*-AP och *E7*-Rb interaktionerna.

Tabell 1. Onkoproteinerna *E6* och *E7* från högrisk HPV och exempel på komponenter de kan interagera med.

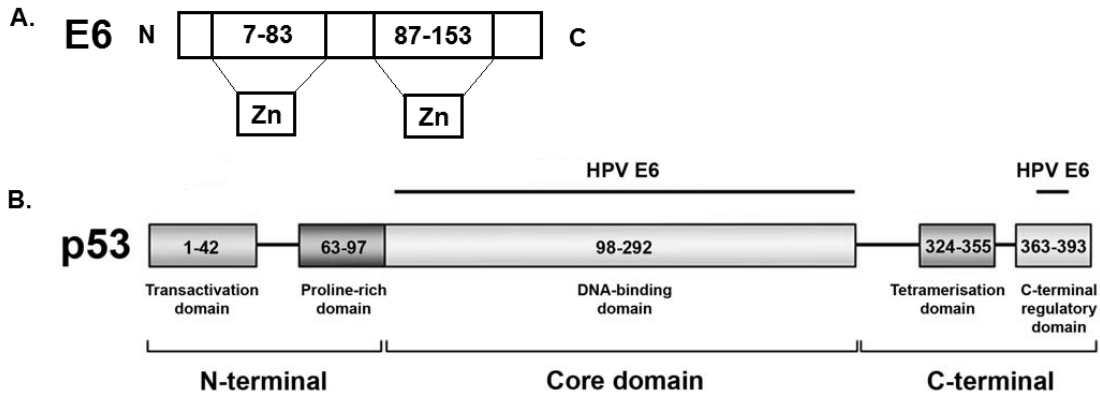
Onkoprotein	Komponent	Referens
E6	p53	Werness <i>et al.</i> 1990
	E6-AP	Huibregtse <i>et al.</i> 1991
	CBP/p300	Zimmermann <i>et al.</i> 1999
	ADA3	Kumar <i>et al.</i> 2002
	TNFR1	Filippova <i>et al.</i> 2002
	FADD	Filippova <i>et al.</i> 2004
	procaspas 8	Garnett <i>et al.</i> 2006
	BAK	Thomas <i>et al.</i> 1998
E7	Rb	Dyson <i>et al.</i> 1989
	HDACs	Brehm <i>et al.</i> 1999
	E2F6	McLaughlin-Drubin <i>et al.</i> 2008
	CDK2	Nguyen & Münger 2008
	p21 ^{Cip1}	Jones <i>et al.</i> 1997
	γ -tubulin	Nguyen <i>et al.</i> 2007
	p600	Huh <i>et al.</i> 2005
	IRF1	Park <i>et al.</i> 2000

E6 binder till p53

Proteinet E6 varierar till storleken mellan 15,8 – 19,2 kDa (kilodalton, måttenhet för massan av proteiner och molekyler) och mellan 138 – 159 aminosyror för olika HPV-typer (Daf *et al.* 2010). E6 kodas av genen med samma namn och som tidigare nämnts hör E6 till de tidiga generna i HPV:s genom. I HPV-typ 18 visade Cole & Danos (1987) att E6 troligtvis har uppstått från en duplikation av en region på 99 bp DNA. Denna region har en struktur som visar på möjlighet till att binda till nukleinsyror, eftersom det finns två stycken konserverade så kallade zink-bindningsmotiv innehållande fyra cystein (Cys) aminosyror (Cys-X-X-Cys-29X-Cys-X-X-Cys), där X står för varierande aminosyra (Figur 2A). Zinkfinger domänen i E6 är viktiga för nedbrytningen av p53 eftersom de hjälper till att stabilisera E6 proteinet (Lipari *et al.* 2001). Studier som har gjorts på HPV-typ 16 visade att E6 består av två substruktur domäner med ett zinkfinger motiv i varje domän (Lipari *et al.* 2001, Nominé *et al.* 2003). Enligt Lipari *et al.* (2001) kan denna information tillämpas på alla andra högrisk HPV-typer också eftersom det finns en signifikant homologi mellan E6 proteiner från olika högrisk HPV-typer. E6 kan delas in i två regioner utgående från de två zinkbindande motiven. Den ena regionen är aminosyrorna 7-83 och den andra består av sekvensen 87-153 (Nominé *et al.* 2003).

p53 och dess bindningsställen

Tumörsuppressorn p53 har en stor roll i celler där DNA-skador uppkommit och mutationer i denna gen har påträffats i många fall av cancer (Klug *et al.* 2007a). Vanligtvis är nivån av p53 låg i celler, men DNA-skador gör att nivån av p53 höjs. Tumörsuppressorn reglerar många olika gener och kan inducera celcykelstopp för att DNA-skadorna ska kunna repareras eller programmerad celldöd om DNA-skadorna inte kan repareras. Li & Coffino (1996) visade i sin studie att det finns två bindningsställen till E6 i p53. Det ena är i C-terminalen och det andra är i kärndomänen (Figur 2B). Betydelsen av bindningsstället i C-terminalen var länge oviss, men Camus *et al.* (2007) föreslår i deras studie att den skulle kunna ha en stor roll vid nedbrytning av p53 via en ubikvitin-oberoende väg. Bindningsstället i p53:s kärndomän och dess konformation föreslås av några studier vara viktig vid nedbrytningen av p53 (Bernard *et al.* 2011, Gu *et al.* 2001). Bernard *et al.* (2011) gjorde en studie där man jämförde vildtyp p53 och muterat p53 vad gäller E6-inducerad nedbrytning av p53. Detta gjordes både *in vivo* och *in vitro*. Alla mutationer gav inte skydd mot nedbrytning inducerad av E6. De mutationer som gav upphov till förändringar i konformationen av p53:s kärndomän gav däremot skydd mot nedbrytning. Resultaten från denna studie indikerar således att konformationen antingen är en viktig parameter för nedbrytningen eller att den har betydelse vid bindningen till E6. Regionen i p53 som är viktig vid den E6-inducerade nedbrytningen är i kärndomänen, Gu *et al.* (2001) visade mer specifikt att aminosyresekvensen 112-290 i p53 är bindningsstället som komplexet E6-E6-AP binder till.



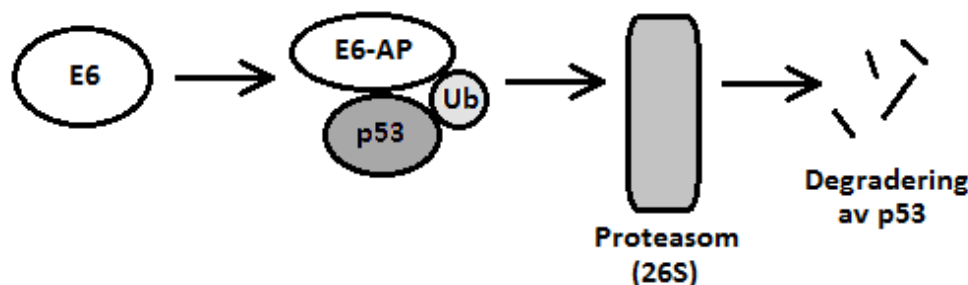
Figur 2. (A). Onkoproteinet E6 och dess zinkbindande motiv. De två zinkbindande motiven består av en aminosyresekvens på Cys-X-X-Cys-29X-Cys-X-X-Cys. De zink-bindande motiven finns mellan regionerna 7-83 och 87-153. (B). p53 och dess bindningsställen till HPV E6. Ett bindningsställe finns i kärndomänen (aminozyror 98 – 292) och det andra i C-terminalen (363 – 393). Modifierad från Bernard *et al.* (2011).

E6-p53

E6 från både högrisk och lågrisk HPV-typer kan binda direkt till DNA bindningsstället i p53 (Lechner *et al.* 1994). Dock binder E6 från högrisk HPV-typer med högre affinitet till p53 jämfört med E6 från lågrisk HPV-typer. Denna interaktion leder inte till nedbrytning av p53, men eftersom E6 binder till p53:s DNA bindningsställe kan inte p53 interagera med DNA och reglera gener. Huibregtse *et al.* (1991) upptäckte att interaktionen mellan E6, från HPV-typerna 16 och 18, och p53 främjas av ett ungefär 100 kDa stort cellulärt protein. Detta protein gav man namnet E6-AP och det fungerar som ett E3 ubiquitin-ligas. E3 ubiquitin-ligas är ett protein som tillsammans med E2 konjugerande enzym hjälper till att fästa ubiquitin molekyler till protein som skall brytas ner. Samma studie visade också att E6-AP inte självt kan binda till p53 utan kräver närvaro av E6 från högrisk HPV-typer.

Nedbrytningen av p53 kan ske både via en ubiquitin proteasom-väg och en ubiquitin-oberoende väg (Huibregtse *et al.* 1991, Camus *et al.* 2007). Vid degradering av p53 via ubiquitin proteasom-vägen binder först E6 & E6-AP in till p53 och bildar ett komplex (Figur 3). Efter detta binds ubiquitin-molekyler, ett protein på 76 aminosyror, till detta komplex och skickar p53 till en 26S proteasom. I proteasomen sker proteolysen, det vill säga att p53 bryts ner till peptider. Det har visat sig att denna process kan utföras endast av E6 från högrisk HPV-typer, eftersom E6 från lågrisk HPV-typer inte kan binda till kärndomänen i p53 som har visat sig vara essentiell för degraderingen via ubiquitin-proteasom vägen (Scheffner *et al.* 1990). E6 från lågrisk HPV-typer kan binda till E6-AP, men denna interaktion leder inte till nedbrytning av p53. Fram tills 2007 hade nedbrytningen av p53 påvisats endast *in vitro* vara beroende av ubiquitinering (Camus *et al.* 2007). Camus *et al.* utförde en studie (2007) *in vivo* där man visade att E6 kan inducera nedbrytning av p53 oberoende av ubiquitinering. Vid en sådan nedbrytning föreslår man att bindningsstället i C-terminalen i p53 skulle kunna spela en stor roll. Samma studie visade också att kombinationen av en ubiquitin-beroende och en ubiquitin-oberoende väg gav en mycket effektiv nedbrytning av p53. En E6 mutant som inte uppvisade ubiquitin ligerings-aktivitet visade också i en annan studie ha kapacitet att inducera degradering av p53 ändå (Nominé *et al.* 2006). Man föreslår då att E6 rekryterar andra cellulära faktorer för inducering av nedbrytningen av p53 eller andra ubiquitin-ligas. Av alla HPV-typer är det typ 16 som är mest frekvent i livmoderhalscancer (WHO/ICO 2010).

Globalt sett påvisades förekomsten av HPV-typ 16 i livmoderhalscancer i 54,4 % av fallen. Trots detta visade det sig i en studie gjord av Mesplède *et al.* (2012) att E6 från HPV-typ 16 inte var den variant som hade högst effekt vad gällde nedbrytning av p53.



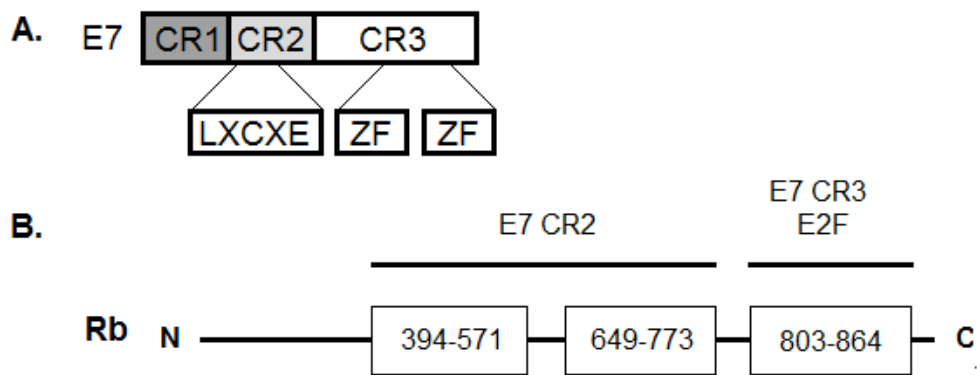
Figur 3. Schematisk bild över nedbrytning av p53 genom ubikvitin proteasom vägen. E6 binder till E6-AP och p53. Komplexet märks med ubikvitin molekyler (Ub) och p53 skickas till proteasomen (26S) som sedan degraderar p53.

E6 kan även binda till p73, som också är en tumörsuppressör, men den interaktionen leder inte till nedbrytning av p73 (Park *et al.* 2001). Tack vare denna information har man kunnat lokalisera regionen i p53 som är viktig för dess degradering genom att använda p73 som en negativ kontroll (Gu *et al.* 2001). Man undersökte detta och experimenterade med att föra in två olika regioner från kärndomänen i p53, aminosyror 92-112 och aminosyror 112-290, till p73. När man förde in regionen 112-290 kunde p73 binda till E6-E6-AP komplexet men detta ledde inte till nedbrytning av p73. När man tog bort regionen 92-112 i p53 kunde inte tumörsuppressorn degraderas. Dessa resultat stöder hypotesen att regionen 92-112 i p53 är essentiell för nedbrytning av p53 och att regionen 112-290 i p53 är viktig för bindningen till E6-E6-AP komplexet.

E7 binder till Rb

Proteinet E7 varierar mellan 9,5 - 12,8 kDa och mellan 86 - 104 aminosyror för olika HPV-typer (Daf *et al.* 2010). Den kodas av E7 och precis som i fallet med E6 tror man att genen uppstod från en duplikation av en region på 99 bp DNA (Cole & Danos 1987). E7 består av tre regioner: CR1, CR2 och CR3, där CR står för konserverad region (Figur 4A). I CR2 finns en LXCXE-region, där L står för aminosyran leucin, X för varierande aminosyra och E för aminosyran glutamat. Denna region har visat sig vara viktig för bindningen till Rb (Figur 4B) (Münger *et al.* 1989b). Adenovirus E1A proteiner kan också binda till Rb (Phelps *et al.* 1988, Whyte *et al.* 1989). CR1 och CR2 i adenovirus E1A har stora likheter med E7. Huang *et al.* (1990) visade i sin studie att två regioner i Rb är viktiga för bindningen till CR2 i Simian virus 40 (SV40) och adenovirus 5 E1A protein, nämligen aminosyror 394-571 och 649-773. Rb hör till de så kallade fickproteinerna (pocket proteins) och i de nämnda regionerna anses det vara fickan som E7 binder till genom aminosyresekvensen LXCXE. Eftersom dessa regioner är viktiga för bindning till CR2 i de två andra virusen menar man att dessa regioner är av betydelse för bindningen till HPV E7 onkoproteinet också på grund av de stora likheterna mellan CR2 i SV40, adenovirus E1A och E7 (Patrick *et al.* 1994). I CR3 finns två Cys-X-X-Cys motiv som är zink-bindande motiv (Phelps *et al.* 1988, McIntyre *et al.* 1993). De zinkbindande motiven är inte essentiella för bindningen till Rb, men spelar ändå en stor roll vid transformationen av celler. Genom att testa bindningen till olika Rb mutanter där man

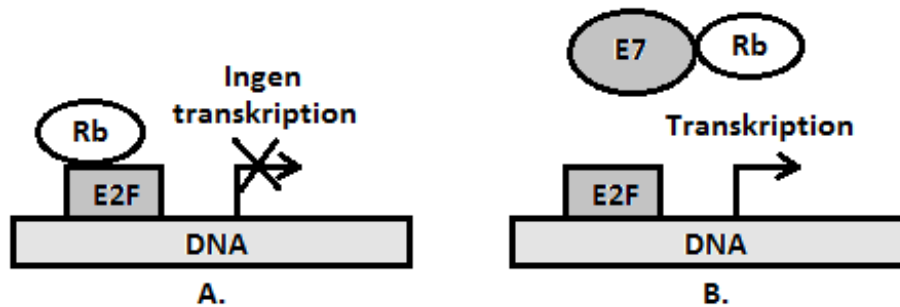
tog bort olika aminosyresekvenser kom man fram till att CR3 troligtvis binder till regionen med aminosyror 803-841 i Rb (Patrick *et al.* 1994).



Figur 4. (A). De tre konserverade regionerna i E7. I CR2 finns LXCXE som är viktig för bindningen till Rb. I CR3 finns två Cys-X-X-Cys, det vill säga två zinkbindande motiv. (B). N står för N-terminalen och C för C-terminalen. Regionerna 394-571 och 649-773 i Rb är viktiga för bindningen till E7 CR2. E2F binder till regionen 829-864. E7 CR3 binder till regionen 803-841.

E7-Rb

Rb är en tumörsuppressorer och precis som för p53 har muterade varianter av Rb påträffats i många cancerfall (Klug *et al.* 2007a). Rb ansvarar för kontrollpunkten G1/S i cellcykeln genom att binda till transkriptionsfaktorer i E2F-gruppen. Detta komplex i sin tur stoppar cellcykeln genom att förhindra transkription av gener som behövs för att cellcykeln ska fortgå. Rubin *et al.* (2005) visade att regionen på Rb som E2F binder till är mellan aminosyror 829–864 (Figur 4B). Vid en infektion av högrisk HPV-typer kan E7 binda till Rb (Dyson *et al.* 1989) och förhindra interaktionen mellan Rb och E2F (Chellappan *et al.* 1992). E7 från högrisk HPV-typer binder till Rb med högre affinitet än E7 från lågrisk HPV-typer (Münger *et al.* 1989b). Interaktionen E7-Rb leder till att E2F inte kan stoppa cellcykeln från att fortsätta (Figur 5). E7 inducerar också degradering av Rb genom proteasomal degradering (Darnell *et al.* 2007). I deras studie visade man att ett proteasom kallas calpain krävs för nedbrytningen av Rb. Man föreslår att E7 binder till calpain som i sin tur främjar klyvning av Rb. Det kluvna Rb (aminosyror 1-810) skickas sedan till proteasomen för nedbrytning. Denna klyvning kan orsaka dissocieringen mellan Rb och E2F eftersom Rb¹⁻⁸¹⁰ inte var kapabel till att inducera cellcykelstopp. Dessa resultat stöder teorin om att regionen som binder till E2F finns i C-terminalen på Rb (Figur 4B).



Figur 5. (A). När Rb är i komplex med E2F transkriberas inte generna som krävs för celledning. (B). När E7 binder till Rb så kan inte Rb binda till E2F, vilket leder till att gener som krävs för celledning transkriberas och cellcykeln fortsätter.

Läkemedelsutveckling

Idag finns två olika vacciner som skyddar mot infektion av olika HPV-typer. GlaxoSmithKline (2011) har utvecklat Cervarix som är ett tvåvärdigt vaccin och skyddar mot HPV-typerna 16 och 18. Cervarix består av VLPs som innehåller 20 µg renat L1 från de två HPV-typerna 16 och 18. Cervarix godkändes 2006 i Europa (Läkemedelsverket 2011). Gardasil är ett annat vaccin utvecklat av Merck Sharp & Dohme Corporation (2011). Detta vaccin är fyrvärdigt och skyddar mot infektion av fyra HPV-typer, nämligen 6, 11, 16 och 18. Vaccinet innehåller renat L1 (20 µg, 40 µg, 40 µg respektive 20 µg) från alla dessa fyra HPV-typer. Gardasil godkändes 2007 i Europa (Läkemedelsverket 2011). Båda dessa vacciner som vi har idag mot livmoderhalscancer har visat sig vara effektiva. Det finns flera studier där man utfört dubbla blindtest för att testa hur effektiva vaccinerna är. I en av dessa studier testade man Gardasil och kom fram till att det fyrvärdiga vaccinet kan ge skydd i upp till fem år (Olsson *et al.* 2007). Vaccinerna designas utifrån L1 proteiner från de nämnda HPV-typerna vilket leder till att vaccinerna är typspecifika, det vill säga de skyddar inte mot infektion av andra högrisk HPV-typer som kan orsaka livmoderhalscancer, exempelvis HPV-typ 33 (Rose *et al.* 1994, White *et al.* 1998).

Inhibering av E6 och E7

2006 tog Fire och Mello emot Nobelpriset i fysiologi eller medicin för deras studie av RNAi (RNA interference) i *Caenorhabditis elegans*. Studien publicerades 1994 (Fire *et al.* 1994). RNAi är den mekanism där man inhiberar genuttryck på post-transkriptionsnivå genom att reducera mRNA-nivåerna med hjälp av t.ex. siRNAs (small interfering RNAs) (Klug *et al.* 2007b). siRNA är dubbelsträngat RNA på en storlek av 20-25 nukleotider som kan användas för att förhindra uttryck av gener. Fire *et al.* (1998) visade att användning av dubbelsträngat RNA i deras studie var mer effektivt än enkelsträngat RNA. RNAi används inom många områden och även inom forskningen kring livmoderhalscancer. Genom att inhibera E6 och E7:s aktivitet med hjälp av siRNAs har man öppnat nya dörrar mot utvecklingen av läkemedel mot livmoderhalscancer (Rampias *et al.* 2009, Jiansong *et al.* 2012).

I flera studier har man visat att om man förhindrar bindning av onkogenerna E6 och E7 till tumörsuppressorererna så ökar åldrande och apoptos i livmoderhalscancer cellerna (Rampias *et al.* 2009, Jiansong *et al.* 2012). En förutsättning för att detta ska fungera är att de cellulära tumörsuppressor-vägarna är intakta trots den pågående okontrollerbara celledningen som uttrycket av E6 och E7 bidrar till. Resultaten i Goodwin & DiMaio (2000) studie indikerar att det faktiskt kan vara så. Nivåerna av p53 och Rb höjdes efter inaktivering av E6 och E7 i

så kallade HeLa celler (celler som har sitt ursprung från en patient med livmoderhalscancer). Detta skulle kunna vara en metod för att utveckla nya läkemedel. Med den här typen av läkemedel skulle man kunna stoppa uttryck av E6 och E7 och på så sätt minska risken för cancerutveckling även efter HPV-infektion.

Många studier har utförts där man testat inhibera E6 och E7:s aktivitet både på transkriptions- och post-transkriptionsnivå (Chang *et al.* 2010, Jiansong *et al.* 2012). Med transkriptionsnivå menas regleringen av produktionen av transkript, medan post-transkriptionsnivå handlar om reglering efter att transkriptet bildats. Darnell *et al.* (2005) visade att transkriptionen av E6 och E7 stoppades när nivån av Rb höjdes i HPV-typ 18-infekterade celler. Detta ledde i sin tur även till att flera proteiner som är mål för onkoproteinerna E6 och E7 återhämtades. Som tidigare nämnts utförs klyvningen av Rb till Rb¹⁻⁸¹⁰, och på samma gång första steget för nedbrytningen av Rb, av proteasomet calpain (Darnell *et al.* 2007). Därför föreslås i samma studie att inhibering av calpain också skulle kunna vara en metod för att i sin tur inhibera både E6 och E7:s aktivitet.

Jiansong *et al.* (2012) testade inhibering på transkriptionsnivå genom att inhibera E7 transkript och P97, promotorn som reglerar uttrycket av E6 och E7 (Smotkin & Wettstein 1986). Studien utfördes *in vivo* där man använde sig av siRNAs och resultatet av inhiberingen blev att induceringen av apoptos ökade märkbart i de infekterade livmoderhalscancer-cellerna. En tidigare studie tydde på samma slutsats där man inhiberade promotorn P97 *in vitro* (Hong *et al.* 2009). Inhiberingseffekten var relativt låg, 40 respektive 30 % för E6 och E7 mRNA. Eftersom designen av siRNA sker utifrån nukleotidsekvenserna från E6 och E7 blir dessa också väldigt typspecifika, precis som för vaccinerna. Chang *et al.* (2010) testade inhiberingen av E6 och E7 från både HPV-typerna 16 och 18. Där designade man olika siRNA för E6 och E7 från HPV-typerna 16 och 18. Deras siRNA visade sig ha minimal effekt på HPV-negativa celler.

Tillförseln av inhibitorer till målcellen

Inhibering av E6 och E7 har potential för att bli en mycket bra strategi för botandet av livmoderhalscancer (Chang *et al.* 2010, Jiansong *et al.* 2012), men man måste hitta sätt för att få in inhibitorerna i värdcellen. Hong *et al.* (2009) använde sig av liposomer för att få in siRNAs till målcellen. Liposomer är artificiellt framtagna lipidvesiklar som kan användas som vektor för exempelvis tillförsel av mediciner eller näringsämnen till celler. Deras resultat uppvisade en relativt låg effekt och man påstår att detta berodde på valet av vektor och att allt siRNA inte kunde ta sig in i cellkärnan. Eftersom siRNA:s uppgift i experimentet var att påverka promotorn P97 på transkriptionsnivå, så måste det ske i cellkärnan för att ge resultat på onkoprotein-nivåerna.

I en studie utförd av Gu *et al.* (2006) använde man sig av en lentiviral vektor för tillförseln av shRNA (short hairpin RNA) till högrisk HPV-positiva HeLa celler. shRNA är RNA som har en hairpin sväng och klyvs sedan till siRNA i målcellen. Lentivirus är en subfamilj till retrovirus och är associerade med neurologiska och immunhämmande sjukdomar (Murray *et al.* 2005b). Lentivirala vektorer har den fördelen att de kan infektera både delande och icke-delande celler (Naldini *et al.* 1996). Studien utfördes, både *in vitro* och *in vivo*, för HPV-typ 18 och en låg dos shRNA ledde till åldrande av cellerna, medan en hög dos shRNA ledde till ökad apoptos i cellerna (Gu *et al.* 2006). Användningen av lentivirala vektorer visade sig vara mycket effektiv, eftersom man påstår att i princip 100 % av alla HeLa celler blev infekterade med vektorerna och att shRNA integrerades i värdcellernas genom. Detta gav således en långvarig inhibering av E6 och E7. Man påstår också att användningen av en lentiviral vektor

för detta ändamål är rätt så säkert, eftersom vektorn endast hade effekt på HeLa cellerna, medan de HPV-negativa livmoderhalscancer cellerna lämnades intakta. Dessutom innehåller inte dessa vektorer några virala gener. En annan möjlighet vore att slå ihop inhibitorer mot E6 och E7:s aktivitet med VLPs (Breitburd & Coursaget 1999). På så sätt skulle man kunna både minska den okontrollerade celltillväxten samt kunna bygga upp ett immunförsvar mot framtida infektioner av högrisk HPV-typer.

Diskussion

För att sammanfatta så är det många studier som verkar peka på samma slutsats: E6 och E7 är de absolut viktigaste onkoproteiner vid utvecklingen av livmoderhalscancer där en högrisk HPV-infektion är orsaken. Det har länge varit väl känt att E6 och E7 från både låg- och högrisk HPV-typer binder till och ibland degraderar tumörsuppressorer p53 respektive Rb (Dyson *et al.* 1989, Scheffner *et al.* 1990, Huibregtse *et al.* 1991). Tumörsuppressorerens uppgift i cellen är att inducera cellcykelstopp och apoptos vid uppkomsten av DNA-skador. I många cancerfall har mutationer i generna som kodar för dessa tumörsuppressorer hittats. Om tumörsuppressorer inte fungerar på grund av mutationer, eller att nivån av dessa sänks på grund av onkoproteiner, som gör att tumörsuppressorer inte fungerar normalt kan det leda till att cellerna fortsätter dela sig trots DNA-skadorna. Interaktionerna mellan onkoproteiner i högrisk HPV-typer och tumörsuppressorer leder därför till en ökad okontrollerbar celldelning och därför risken att utveckla cancer i livmoderhalsen. Detta faktum gör att E6 och E7 klassas som onkoproteiner. Det är dock inte bara dessa tumörsuppressorer som E6 och E7 binder till, de kan även binda till flera andra komponenter i värdcellen. Även dessa interaktioner leder till en ökad okontrollerbar celltillväxt.

I nuläget finns vacciner mot livmoderhalscancer i form av VLPs (viruslika partiklar), som målcellerna känner igen och ett immunsystem mot HPV kan byggas upp på det sättet (GlaxoSmithKline 2011, Merck Sharp & Dohme Corporation 2011). Även om många studier pekar på att vaccinerna är effektiva så finns det nackdelar med det här (Olsson *et al.* 2007). Vaccinerna innehåller renade L1 proteiner från högrisk HPV-typer som de är designade för och således fungerar VLPs totalt sett endast mot fyra HPV-typer; 6, 11, 16 och 18. Det finns dock fall där HPV DNA från andra högrisk HPV-typer påträffats och eftersom vaccinerna är typspecifika så ger de inget skydd mot dessa andra högrisk HPV-typer (Rose *et al.* 1994, White *et al.* 1998). Dessutom måste man givetvis, precis som med alla vaccin, vaccineras innan HPV-infektion för att ett immunskydd ska kunna byggas upp.

Studier har visat att om man inhiberar E6 och E7:s funktioner med hjälp av RNAi, så kan nivån av tumörsuppressorer p53 och Rb öka och leda till snabbare cellåldrande och ökad inducering av apoptos i cellerna (Chang *et al.* 2010, Jiansong *et al.* 2012). Detta faktum skulle man kunna ha som grund för utvecklandet av nya läkemedel. Detta skulle innebära fler fördelar än med dagens vaccin eftersom det skulle ge effekt även om man tog läkemedlet efter HPV-infektion. Troligtvis skulle dock inte detta tillvägagångssätt vara bättre än vaccinerna vad gäller typspecificiteten eftersom siRNAs designas utifrån nukleotidsekvenserna i E6 och E7 (Chang *et al.* 2010).

Ytterligare forskning krävs dock inom detta område men jag tror inte detta är någon omöjlighet i framtidens läkemedelsutveckling. Ett dilemma med det här är dock vilket tillvägagångssätt som skulle vara mest effektivt för att få in inhibitorerna i målcellerna. Hong *et al.* (2009) använde liposomer som vektor för siRNA till målcellerna och de menar att dessa inte är de bästa som vektorer eftersom det gav en relativt låg effekt på reducerandet av

den okontrollerade celltillväxten. Gu *et al.* (2006) slår ett slag för lentivirala vektorer. Lentivirala vektorer har den fördelen att de kan ta sig in i icke-delande såväl som delande celler samt att de inte innehåller virala gener (Naldini *et al.* 1996, Gu *et al.* 2006). Så gott som 100 % av HeLa cellerna i denna studie blev infekterade av de lentivirala vektorerna medan högrisk HPV-negativa celler hölls intakta. Breitbart & Coursaget (1999) föreslår även ett tredje sätt för tillförseln av inhibitorer till målcellen; att tillsätta inhibitorerna till VLPs. På så sätt skulle man få skydd för framtida högrisk HPV-infektioner men också reducera celltillväxten där en högrisk HPV-infektion redan skett.

Typspecifitet är ett stort genomgående problem i de olika tillvägagångssätten för botandet av livmoderhalscancer, både för RNAi och vacciner. I framtiden skulle man kunna utveckla ytterligare metoder för att bota livmoderhalscancer, exempelvis genom att interagera med de konserverade zinkfinger-domänerna i E6 och E7, eller CR2 i E7 som är viktiga för bindningen till tumörsuppressorer. Detta skulle kunna undgå problemet med typspecifitet eftersom så gott som alla högrisk (och till och med lågrisk) HPV innehåller dessa konserverade regioner. Jag tror att användningen av RNAi har en ljus framtid vad gäller botandet av livmoderhalscancer, det återstår bara att se just vilken vektor som skulle vara mest effektiv för tillförseln av inhibitorerna. Man lär säkert hitta fler alternativ i framtiden än de tre jag har tagit upp här (liposomer, lentiviral vektor och sammanföra med VLPs).

Slutsatsen är alltså – Ja, vi kan använda denna kunskap för att utveckla nya läkemedel. Genom denna uppsats har jag redovisat de viktigaste vägarna som ökar risken för att utveckla cancer. Man har vetat länge att interaktionerna E6-p53 och E7-Rb har kapaciteten att inducera transformation av celler och bidrar till en ökad celltillväxt. Utifrån denna kunskap har man i sin tur designat RNAi metoder för att komma åt uttrycket av dessa två onkogener och fått goda resultat.

Tack

Tack till the Biochemical Society för att ha gett mig tillstånd att använda figur 1 i min uppsats. Figur 2B är modifierad från Bernard X, Robinson P, Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, Deryckere F, Travé G, Orfanoudakis G. 2011. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *Plos One* **6**: e25376.
Stort tack till Lage Cerenius för bra handledning och goda råd. Jag vill även tacka Helen Kahsay och Jens Berndtsson för att ha gett mig värdefull återkoppling.

Referenser

- Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**: 70-79.
- Bernard X, Robinson P, Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, Deryckere F, Travé G, Orfanoudakis G. 2011. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *Plos One* **6**: e25376.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO Journal* **18**: 2449-2458.

- Breitburd F, Coursaget P. 1999. Human papillomavirus vaccines. *Seminars in Cancer Biology* **9**: 431-445.
- Camus S, Menéndez S, Cheok CF, Stevenson LF, Laín S, Lane DP. 2007. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. *Oncogene* **26**: 4059-4070.
- Chang JTC, Kuo TF, Chen YJ, Chiu CC, Lu YC, Li HF, Shen CR, Cheng AJ. 2010. Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers. *Cancer Gene Therapy* **17**: 827-836.
- Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 4549-4553.
- Chen SL, Mounts P. 1990. Transforming activities of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *Journal of Virology* **64**: 3226-3233.
- Cole ST, Danos O. 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *Journal of Molecular Biology* **193**: 599-608.
- Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee J O'D. 1991. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridization. *Journal of Clinical Pathology* **44**: 990-996.
- Daf S, Jena L, Kumar S. 2010. Comparative phylogenetic analysis of E6 and E7 proteins of different 42 strains of HPV. *JK Science* **12**: 6-10.
- Darnell GA, Antalis TM, Rose BR, Suhrbier A. 2005. Silencing of integrated human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cells expressing serpinB2. *Journal of Virology* **79**: 4246-4256.
- Darnell GA, Schroder WA, Antalis TM, Lambley E, Major L, Gardner J, Birrell G, Cid-Arregui A, Suhrbier A. 2007. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37492-37500.
- Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *Journal of Virology* **69**: 7791-7799.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934-937.
- Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. 2002. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 21730-21739.
- Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. 2004. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 25729-25744.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **13**: 1915-1926.
- GlaxoSmithKline 2011. Full prescribing information. WWW-dokument 2011: http://us.gsk.com/products/assets/us_cervarix.pdf. Hämtad 2012-03-01.
- Goodwin EC, DiMaio D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12513-12518.

- Gu J, Rubin RM, Yuan Z-M. 2001. A sequence element of p53 that determines its susceptibility to viral oncoprotein-targeted degradation. *Oncogene* **20**: 3519-3527
- Gu W, Putral L, Hengst K, Minto K, Saunders Na, Leggatt G, McMillan NAJ. 2006. Inhibition of cervical cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Cancer Gene Therapy* **13**: 1023-1032.
- Hong D, Lu W, Ye F, Hu Y, Xie X. 2009. Gene silencing of HPV16 E6/E7 induced by promoter-targeting siRNA in SiHa cells. *British Journal of Cancer* **101**: 1798-1804.
- Huang S, Wang N-P, Tseng BY, Lee W-H, Lee EH-HP. 1990. Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO Journal* **9**: 1815-1822.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO Journal* **10**: 4129-4135.
- Jiansong Z, Chanjuan P, Baohua L, Fenfen W, Caiyun Z, Die H, Feng Y, Xiaodong C, Weiguo Lü, Xing X. 2012. Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Gynecologic Oncology* **124**: 296-302.
- Jones DL, Alani RM, Münger K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{Cip1}-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development* **11**: 2101-2111.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. 2007a. *Essentials of genetics*, 6:e uppl., ss. 357-375. Pearson Education, New Jersey.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. 2007b. *Essentials of genetics*, 6:e uppl., ss. 329-356. Pearson Education, New Jersey.
- Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE *et al.* 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Molecular and Cell Biology* **22**: 5801-5812.
- Lechner MS & Laimins LA. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *Journal of Virology* **68**: 4262-4273.
- Li X, Coffino P. 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of Virology* **70**: 4509-4516.
- Lipari F, McGibbon GA, Wardrop E, Cordingley MG. 2001. Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein. *Biochemistry* **40**: 1196-1204.
- Läkemedelsverket 2011. Vaccinering mot humant papillomavirus (HPV) med Gardasil och Cervarix. WWW-dokument 2011-11-14: <http://www.lakemedelsverket.se/hpv>. Hämtad 2012-02-29.
- McLaughlin-Drubin ME, Huh K-W, Münger K. 2008. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *Journal of Virology* **82**: 8695-8705.
- McIntyre MC, Frattini MG, Grossmann SR, Laimins LA. 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *Journal of Virology* **67**: 3142-3150.
- Merck Sharp & Dohme Corporation 2011. Full prescribing information. WWW-dokument 2011: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf. Hämtad 2012-03-01.
- Mesplède T, Gagnon D, Bergeron-Labrecque F, Azar I, Sénéchal H, Coutlée F, Archambault J. 2012. P53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *Journal of Virology* **86**: 94-107.

- Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. 1989a. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology* **63**: 4417-4421.
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. 1989b. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO Journal* **8**: 4099-4105.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* **348**: 518-527.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2005a. *Medical microbiology*, 5e uppl., ss. 523-531. Mosby, St Louis.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2005b. *Medical microbiology*, 5e uppl., ss. 657-673. Elsevier Mosby, Philadelphia.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.
- Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML, Münger K. 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component γ -tubulin. *Journal of Virology* **81**: 13533-13543.
- Nguyen CL, Münger K. 2008. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and E/CDK2 complexes. *Virology* **380**: 21-25.
- Nominé Y, Charbonnier S, Ristriani T, Stier G, Masson M, Cavusoglu N, Van Dorselaer A, Weiss E, Kieffer B, Travé G. 2003. Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain. *Biochemistry* **42**: 4909-4917.
- Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckère F, Sibling A-P, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E *et al.* 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular Cell* **21**: 665-678.
- Olsson S-E, Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Malm C, Iversen O-E, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G *et al.* 2007. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particles (VLP) vaccine. *Vaccine* **25**: 4931-4939.s
- Park J-S, Kim E-J, Kwon H-J, Hwang E-S, Namkoong S-E, Um S-J. 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6764-6769.
- Park J-S, Kim E-J, Lee J-Y, Sin H-S, Namkoong S-E, Um S-J. 2001. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *International Journal of Cancer* **91**: 822-827.
- Patrick DR, Oliff A, Heimbrook DC. 1994. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 6842-6850.
- Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**: 539-547.
- Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. 2009. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* **101**: 412-423.

- Romanczuk H & Howley PM. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3159-3163.
- Rose RC, Bonnez W, Darin C, McCance DJ, Reichman RC. 1994. Serological differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *Journal of General Virology* **75**: 2445-2449.
- Rubin SM, Gall A-L, Zheng N, Pavletich NP. 2005. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* **123**: 1093-1106.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-114.
- Smotkin D, Wettstein FO. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 4680-4684.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**: 229-234.
- Thomas M, Banks L. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**: 2943-2954.
- Ustav M, Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO Journal* **10**: 449-457.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**: 76-79.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010. Hämtad 2012-02-23.
- White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. 1998. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *Journal of Virology* **72**: 959-964.
- Whyte P, Williamson NM, Harlow E. 1989. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**: 67-75.
- Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of Virology* **73**: 6209-6219.