

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE**

Željka BOGOVAC

**OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC  
NEKODIRAJOČEGA PODROČJA GENOMA HUMANEGA  
VIRUSA PAPILOMA HPV-6**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Željka BOGOVAC

**OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC NEKODIRAJOČEGA  
PODROČJA GENOMA HUMANEGA VIRUSA PAPILOMA HPV-6**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF LCR VARIANTS OF HUMAN  
PAPILLOMAVIRUS HPV-6**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko aidsa in hepatitisov in molekularno mikrobiologijo Inštituta za mikrobiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Maria Poljaka, dr. med, za somentorja dr. Boštjana Kocjana, univ. dipl. mikrobiol in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Somentor: dr. Boštjan Kocjan, univ. dipl. mikrobiol.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: dr. Boštjan Kocjan, univ. dipl. mikrobiol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Željka Bogovac

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 578.7 + 578.5 + 578.2 (043) = 163.6
- KG virusi/humani virus papiloma/HPV-6/podtipske različice/LCR/URR/PCR/  
molekularne tehnike/sekveniranje/ genitalne bradavice/kondilomi/karcinogeneza
- AV BOGOVAC, Željka
- SA POLJAK, Mario (mentor)/KOCJAN, Boštjan (somentor)/SEME, Katja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije
- LI 2008
- IN **OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC NEKODIRAJOČEGA  
PODROČJA GENOMA HUMANEGA VIRUSA PAPILOMA HPV-6**
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 60 str., 1 pregl., 10 sl., 91 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Humani virusi papiloma (HPV) okužijo bazalne celice večskladnega ploščatega epitelijskega tkiva in povzročajo različne benigne in maligne spremembe kože in sluznic. Nizkorizičen genotip HPV-6 v glavnem povzroča nastanek benignih genitalnih bradavic (GB), redkeje tudi papilomov grla. Zaradi šibkega onkogenega potenciala ga le v izjemnih primerih povezujemo z nastankom raka materničnega vratu. V nalogi smo opredelili podtipsko različnost nekodirajočega genomskega področja LCR pri 40 slovenskih izolatih HPV-6, osamljenih iz GB. Naloga je vključevala pomnoževanje DNA izolatov HPV-6 s PCR, kvalitativno in kvantitativno dokazovanje pridelkov PCR, njihovo čiščenje in avtomatsko določevanje njihovega nukleotidnega zaporedja. Opredelili smo 13 različic LCR HPV-6, med katerimi smo 2 opredelili prvič. Različice LCR HPV-6, ki smo jih opredelili v naši raziskavi, smo filogenetsko uvrstili med predhodno opisane različice LCR izolatov HPV-6, osamljene v različnih geografskih področjih po celem svetu. Pri tem nismo dokazali združevanja izolatov v skupine glede na geografsko ali etnično pripadnost njihovih gostiteljev. Ugotovili smo, da je večina izolatov HPV-6, osamljenih iz GB, podobnih ne-prototipskim različicam HPV-6, zato sklepamo o večji patogenosti teh različic v primerjavi s prototipskimi. V raziskavi smo dokazali tudi nekaj nepravilnosti v nukleotidnih zaporedjih izolatov HPV-6, objavljenih v spletnih genskih bankah.

## KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.7 + 578.5 + 578.2 (043) = 163.6
- CX human papillomavirus /HPV-6/LCR varinats/prototype/URR/PCR/molecular methods/sequencing/genital warts/condylomata acuminata/ carcinogenesis
- AU BOGOVAC, Željka
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/KOCJAN, Boštjan (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2008
- TI **CHARACTERIZATION OF LCR VARIANTS OF HUMAN PAPILOMAVIRUS HPV-6**
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 60 p., 1 tab., 10 fig., 91 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Human papillomaviruses (HPV) infect basal cells of squamous epithelia which results in formation of various benign and malign lesions on skin and mucosa. The low-risk genotype HPV-6 is mainly involved with development of benign genital warts (GW) and sometimes laryngeal papilloma. Thus due to its low oncogenic potential, HPV-6 is rarely found in cervical carcinoma. In our research we determined varinats of genotype HPV-6 according to the long control region (LCR) of the genome in 40 isolates HPV-6, obtained from the genital warts of the same number of Slovene male patients. We used PCR to amplify the HPV-6 DNA and gel electrophoresis to detect the PCR products. After purification of the PCR products we performed a sequencing reaction and determined nucleotide sequence of LCR. We characterised 13 LCR variants, two of which we described for the first time. The comparison of our LCR variants with previously described showed no geographic clustering of mutations, because several variants from different parts of the world were found to be identical or related forms. We estimated that the majority of isolates HPV-6, obtained from GW, resembles non-prototype variants HPV-6 and therefore we concluded about their greater pathological risk when compared to the prototype variants HPV-6. Furthermore we demonstrated some irregularities in nucleotide sequences of the isolates of HPV-6, published in gene banks on the web.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV) .....	3
<b>2.1.1 Zgradba in morfologija HPV .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Organizacija genoma.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Razvrščanje in pregled evolucije HPV .....</b>	<b>7</b>
2.1.3.1 Razvrščanje HPV .....	7
2.1.3.2 Odkritje in evolucija HPV .....	8
<b>2.1.4 Razvrščanje genotipov HPV .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.5 Razmnoževanje HPV – produktivna okužba.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.6 Patogeneza oz. karcinogeneza HPV – abortivna okužba.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.7 Podtipske različice HPV in njihov patogenetski pomen .....</b>	<b>15</b>
2.1.7.1 Pomen mutacij v beljakovinah E6 in E7 .....	15
2.1.7.2 Pomen mutacij v beljakovini E2.....	16
2.1.7.3 Pomen mutacij v beljakovinah L1 in L2 .....	16
2.1.7.4 Pomen mutacij v nekodirajočem področju LCR .....	16
<b>2.1.8 Podtipske različice HPV-6 in njihov patogenetski pomen .....</b>	<b>17</b>
2.1.8.1 Odkritje in razvrščanje HPV-6 .....	17
2.1.8.2 Epidemiologija okužb s HPV-6.....	17
2.1.8.3 Podtipske različice HPV-6.....	18
2.1.8.4 Problem referenčnega izolata .....	19
<b>2.1.9 Diagnostika okužb s HPV .....</b>	<b>20</b>
2.1.9.1 Hibridizacijske metode .....	21

2.1.9.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin .....	22
2.1.9.2.1 Verižna reakcija s polimerazo .....	22
2.1.9.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....	23
2.1.9.2.3 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem .....	23
2.1.9.2.4 Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA.....	24
2.1.9.3 Metode za dokazovanje oz. opredeljevanje pridelkov PCR .....	24
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>26</b>
3.1 MATERIAL .....	26
3.2 METODE .....	26
<b>3.2.1 Izdelava oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje LCR HPV-6.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2 Pomnoževanje genomskega področja LCR.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3 Dokazovanje pridelkov PCR .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.4. Določanje nukleotidnega zaporedja in opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6 .....</b>	<b>29</b>
3.2.4.1 Čiščenje pridelkov PCR .....	29
3.2.4.2 Določanje koncentracije pridelkov PCR .....	30
3.2.4.3 Sekvenčna reakcija .....	31
3.2.4.4 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije.....	31
3.2.4.5 Avtomatsko določanje in analiza nukleotidnega zaporedja ter opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6 .....	33
3.2.4.5.1 Določanje nukleotidnega zaporedja v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Medicinske fakultete v Ljubljani .....	33
3.2.4.5.2 Določanje nukleotidnega zaporedja pri podjetju Macrogen (Seul, Koreja).....	33
3.2.4.5.3 Analiza nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic.....	34
<b>3.2.5 Filogenetska uvrstitev različic LCR HPV-6.....</b>	<b>35</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1 Pomnoževanje LCR HPV-6 .....	36
4.2 Določanje nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic HPV-6.....	36

<b>4.2.1 Določanje nukleotidnega zaporedja v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Medicinske fakultete v Ljubljani.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja v podjetju Macrogen.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.3 Podtipe različice LCR HPV-6.....</b>	<b>38</b>
4.3 Filogenetska uvrstitev različic LCR HPV-6.....	41
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>44</b>
5.1 RAZPRAVA.....	44
<b>5.1.1 Pomnoževanje LCR HPV-6.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2 Določanje nukleotidnega zaporedja in opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.3 Opredelitev podtipskih različic HPV-6.....</b>	<b>44</b>
5.2 SKLEPI.....	47
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>48</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>49</b>
<b>8 ZAHVALA</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja OZ za pomnoževanje genomskega področja LCR HPV-6.....	27
---	----

## KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija genoma genotipa HPV-16 (Poljak in sod., 2005) .....	3
Slika 2: Organizacija genomskega področja LCR (Apt in sod., 1996; Chan in sod., 1989; Gloss in sod., 1989; Offord in Beard, 1990). .....	7
Slika 3: Filogenetski prikaz sorodnosti 118 virusov papiloma (de Villiers in sod., 2004). ..	9
Slika 4: Virusni cikel v različnih slojih diferencirajočega epidermisa (Doorbar, 2006).....	12
Slika 5: Shema in princip delovanja čiščenja pridelkov sekvenčne reakcije .....	32
Slika 6: Fotografija elektroforeznega gela 10 nanesenih pridelkov PCR.....	36
Slika 7: Upadanje signala .....	37
Slika 8: Podtipske različice LCR HPV-6, opredeljene pri 40 slovenskih izolatih HPV-6..	40
Slika 9: 94 bp dolgo nukleotidno zaporedje znotraj genomskega področja LCR .....	41
Slika 10: Primerjava podtipskih različic LCR HPV-6. ....	42

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK	amino kislina
ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija
ddH <sub>2</sub> O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EGF-R	receptor epidermalnega ravnega dejavnika, vpleten v sintezo DNA in celično proliferacijo (angl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ER	celični organel endoplazmatski retikulum
EV	bolezen <i>epidermodysplasia verruciformis</i>
E2F	skupina beljakovin z vlogo prepisovalnih dejavnikov
FDA	ameriška uprava za hrano in zdravila (angl. <i>Food and Drug Administration</i> )
GA	celični organel golgijev aparat
GB	genitalne bradavice, <i>condylomata acuminata</i>
HPV	humani virusi papiloma
IFN	interferon – protein imunskega sistema
kDa	kilodalton – enota za merjenje atomske oz. molekulske mase
LAMP	z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA (angl. <i>loop-mediated isothermal amplification of DNA</i> )
LCR	nekodirajoče področje genoma pri virusih papiloma z regulatorno vlogo (angl. <i>long control region</i> )
MHC II	molekule histokompatibilnostnega kompleksa II
mRNA	virusna sporočilna RNA (angl. <i>messenger RNA</i> )
MV	maternični vrat
NASBA	pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem oz. metoda za dokazovanje sporočilne RNA (angl. <i>nucleic acid sequence based amplification</i> )
ori	mesto začetka podvojevanja genoma (angl. <i>origin of replication</i> )
OZ	oligonukleotidni začetnik
PCR	verižna reakcija z polimerazo

PDGF $\beta$ -R	verižni receptor ravnega dejavnika $\beta$ , ki stimulira proliferacijo celic (angl. <i>platelet-derived growth factor-<math>\beta</math> receptor</i> )
PG	papilomi grla
PV	virusi papiloma
pRb	retinoblastni protein
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RMV	rak materničnega vratu
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	število obratov na minuto (angl. <i>rotations per minute</i> )
RT-PCR	verižna reakcija z polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time PCR</i> )
URR	nekodirajoče področje genoma pri virusih papiloma z regulatorno vlogo (angl. <i>upstream regulatory region</i> )
UV	ultravijolična svetloba

## 1 UVOD

Humani virusi papiloma (HPV) so izjemno heterogena skupina virusov z DNA, saj po trenutnih ocenah obstaja več kot 200 različnih genotipov HPV. Opredeljevanje oz. genotipizacija novih izolatov HPV je klinično pomembna, saj so virusni genotipi značilno povezani z nastankom sprememb na kožnem ali sluzničnem epiteliju (Bernard, 2005).

Do danes je popolnoma opredeljenih 118 genotipov virusov papiloma (PV), ki se znotraj družine *Papillomaviridae* združujejo v vrste in rodove (de Villiers in sod., 2004). Največji in klinično najpomembnejši je rod alfa, kamor so uvrščeni visokorizični in nizkorizični genotipi HPV, povezani z nastankom različnih sluzničnih in kožnih sprememb – anogenitalnih karcinomov in bradavic, papilomov grla ter navadnih kožnih bradavic (Bernard in sod., 2006). Med visokorizičnimi genotipi HPV v populaciji prevladujeta HPV-16 in HPV-18, ki sta najpogosteje povezana z rakom materničnega vratu. Poleg njiju sta v rodu alfa pomembna tudi HPV-6 in HPV-11, ki povzročata nastanek benignih sprememb, t.j. genitalnih bradavic in papilomov grla. Le izjemoma ju najdemo tudi pri osebah z malignimi spremembami ploščatoceličnega epitela, zato ju opredeljujemo kot nizkorizična genotipa HPV (Poljak in sod., 2005).

Genotipi HPV izražajo tkivno specifičnost in so povezani z razvojem specifičnih bolezni. Vendar se bolezen, značilna za okužbo z določenim genotipom HPV, ne razvije pri vseh okuženih oz. se posledice okužbe z istim genotipom HPV med posamezniki razlikujejo. Te ugotovitve so privedle do domneve, da znotraj posameznega genotipa HPV obstajajo podtipske različice HPV, ki prispevajo k večji oz. manjši patogenosti virusa. Podtipske različice HPV so posledica sprememb v nukleotidnem zaporedju nekodirajočih ali kodirajočih področij genoma HPV (de Villiers in sod., 2004; Bernard, 2005; Bernard in sod., 2006). Nekodirajoče genomske področje LCR (angl. *long control region*) mutacije razmeroma pogosto prizadenejo, zato je to najbolj raznoliko področje v genomu HPV in zato tudi najbolj primerno za odkrivanje in raziskovanje podtipskih različic HPV (Chan in sod., 1992).

Z molekularno analizo različnih področij genoma HPV-6 je bilo dokazano, da obstajajo številne podtipske različice HPV-6 (v grobem jih delimo na prototipsko in ne-prototipske) in da genitalne bradavice povzročajo predvsem ne-prototipske različice (Krige in sod., 1997; Kovelman in sod., 1999; Caparrós-Wanderley in sod., 1999). V doslej najobsežnejši raziskavi na področju podtipске različnosti HPV-6, kjer je bilo vključenih 62 izolatov iz različnih geografskih področij (Afrika, Azija, Evropa, Severna in Južna Amerika), je bilo opredeljenih 19 različic genomskega področja LCR HPV-6. Pri tem niso opazili združevanja izolatov HPV-6 v filogenetske skupine glede na njihov etnični oziroma geografski izvor, kot je to značilno za nekatere druge genotipe HPV (Heinzel in sod., 1995).

### 1.1 NAMEN DELA

V raziskavi smo z molekularno analizo genomskega področja LCR želeli opredeliti podtipsko različnost 40 slovenskih izolatov HPV-6 in jih primerjati z že znanimi različicami HPV-6. Glede na podatke iz dostopne literature smo v raziskavo vključili doslej največje število izolatov HPV-6 iz enega geografskega področja.

Pričakovali smo, da bomo opredelili številne podtipske različice LCR HPV-6, med katerimi bo največ ne-prototipskih. Za večino izolatov HPV-6 smo predvidevali, da bodo podobni oziroma enaki predhodno opisanim različicam LCR HPV-6 (Heinzel in sod., 1995). Pričakovali smo, da bomo v okviru zajetih izolatov HPV-6 odkrili tudi nekaj novih različic LCR HPV-6.

## 2 PREGLED OBJAV

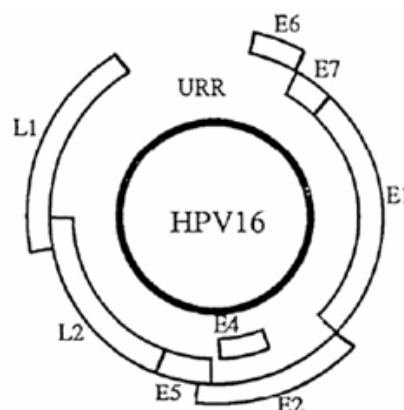
### 2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV)

#### 2.1.1 Zgradba in morfologija HPV

Humani virusi papiloma so zelo heterogena skupina DNA-virusov, uvrščenih v družino *Papillomaviridae*. So majhni, goli virusi z ikozaedrično kapsido, sestavljeno iz 72 morfoloških enot (kapsomer), ki predstavljajo veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino. Velika plaščna beljakovina ima povprečno molekulsko maso 54 kDa in predstavlja 80-90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Mala plaščna beljakovina je v povprečju velika 74-80 kDa in tvori preostali del beljakovin virusnega plašča. Premer virusov je približno 55 nm (Poljak in sod., 2005).

#### 2.1.2 Organizacija genoma

Genom HPV je krožno zaprta dvovertična molekula DNA, dolga približno 7500 – 8000 baznih parov (bp), sestavljena iz kodirajočih in nekodirajočih območij (Poljak in sod., 2005). Organizacija genoma HPV, prikazana na Sliki 1, je izdelana na podlagi genoma genotipa HPV-16, a je zaradi njegove konzervativne narave zelo podobna tudi pri vseh ostalih genotipih HPV (Stanley in sod., 2007).



Slika 1: Organizacija genoma genotipa HPV-16 (Poljak in sod., 2005)

Kodirajoče območje virusnega genoma, kjer najdemo 8 do 9 odprtih bralnih okvirjev, lahko razdelimo na zgodnje območje E (angl. *early*) z bralnimi okvirji zgodnjih genov *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7* ter pozno območje L (angl. *late*) z dvema bralnima okvirjema poznih genov *L2* in *L1*. Virusne beljakovine zgodnjega območja so potrebne za uravnavanje pomnoževanja virusnega genoma, izražanja virusnih genov in transformacije okuženih

celic, medtem ko sta beljakovini poznega območja strukturni beljakovini virusnega plašča (Doorbar, 2006; Stanley in sod., 2007).

Med vsemi geni zgodnjega območja sta najbolj raziskana gena *E6* in *E7*, ki nosita zapisa za poglavitni virusni onkobeljakovini (Poljak in sod., 2005; Doorbar, 2006). Beljakovini *E6* in *E7* se povezujeata s številnimi celičnimi beljakovinami in spreminjata ali popolnoma izničita njihovo delovanje ter tako motita normalno uravnavanje celičnega cikla oz. apoptozo. Ključni sta za transformacijo s HPV okuženih keratinocitov (Scheffner in sod., 1990; Davies in sod., 1993). Beljakovina *E6* z vezavo na celično beljakovino p53, ki velja za varuha humanega genoma, s pomočjo ubikvitinov povzroči njeno razgradnjo. *E7* se veže na retinoblastni protein (pRb) in tako negativno vpliva na uravnava celičnega cikla na prehodu iz celične faze G1 v fazo S (Stanley in sod., 2007).

Virusni beljakovini *E1* in *E2* imata dve pomembni vlogi: prva je v iniciaciji in uravnavanju podvojevanja virusne DNA, druga pa v uravnavanju izražanja virusnih genov. Tvorita stabilne komplekse, ki se vežejo na mesto ori v virusnem genomu, s čimer *E2* okrepi delovnje celičnih dejavnikov, nujnih za pomnoževanje HPV DNA (Doorbar, 2006).

Beljakovina *E1* je helikaza, ATPaza in ATP-vezavni protein (Seo in sod., 1993; Park in sod., 1994; Stanley in sod., 2007). Povezava *E1* z N-terminalnim delom beljakovine *E2* okrepi pritrdjevanje *E1* na mesto ori v LCR, na katero se vežejo še beljakovine, potrebne za pomnoževanje celične DNA (npr. DNA polimeraza in  $\alpha$ -primaza). Komplex beljakovin *E1/E2* olajša iniciacijo pomnoževanja virusnega genoma. *E2* potem oddisocira od mesta ori, kar sproži sestavljanje beljakovine *E1* v dvojni heksamerni obroč (Doorbar, 2006; Stanley in sod., 2007).

Beljakovina *E2* je tudi prepisovalni dejavnik virusnih genov in se s C-terminalnim delom veže na palindromna mesta [AACCG(N<sub>4</sub>)CGGT] v nekodirajočem področju genoma HPV. Genotip HPV-16 ima 4 taka mesta, med katerimi se eden nahaja v bližini mesta ori (Doorbar, 2006). Vezava *E2* na mesto ori je kritična pri vzdrževanju nivoja izražanja onkogenov *E6* in *E7*; beljakovina *E2* namreč fizično ovira vezavo celičnih prepisovalnih dejavnikov (kot sta SP1 in TFIID), ki so nujni za prepisovanje onkogenov *E6* in *E7*



(Blachon in Demeret, 2003). Izražena v nizkih koncentracijah, beljakovina E2 deluje kot aktivator prepisovanja virusnih genov, ko pa se njena ekspresija poveča in preseže določen prag, pa deluje kot represor, saj se ga vse več veže na zaporedja DNA, kar zahteva odstranitev aktivatorja prepisovanja genov SP1 (Slika 2). Beljakovina E2 je pomembna tudi pri enkapsidaciji virusnega genoma (Doorbar, 2006; Stanley in sod., 2007).

Čeprav sta E1 in E2 ključni za pomnoževanje virusnega genoma, k temu še na neznan način prispevata tudi beljakovini E4 in E5 (Doorbar, 2006).

Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem pojasnjena. Znano je, da se beljakovina E4 kopiči v celici ves čas in da njena odsotnost zmoti pozne dogodke virusnega življenjskega kroga. Povzroča zaustavitev celičnega cikla v fazi G2 in deluje kot antagonist beljakovine E7, ki spodbuja celično proliferacijo. Ta vloga beljakovine E4 je značilna za mnoge genotipe HPV (HPV-16, HPV-11, HPV-18, HPV-1). Nedavne študije so pokazale, da se pri HPV-16 in HPV-18, beljakovina E4 povezuje tudi z E2, kar beljakovini E4 verjetno omogoča dodatne, še ne povsem pojasnjene mehanizme delovanja (Doorbar, 2006). Dokazano pa E4 tvori interakcije s beljakovinami citoskeleta in povzroči propad citokeratinske mreže. Okužena celica tako dobi značilen izgled koilocita, kar virus izkoristi za sestavljanje virusnih delcev in lažje izstopanje iz gostiteljske celice (Blachon in Demeret, 2003; Wilson in sod., 2005).

E5 je transmembranska beljakovina s šibko transformirajočo aktivnostjo in pozitivni uravnalec receptorjev rastnih dejavnikov. Mutante v beljakovini E5 izkazujejo nižjo raven pomnoževanja virusnega genoma v primerjavi z divjim tipom, saj se E5 verjetno vpleta tudi v celično signaliziranje (Yang in sod., 2003; Doorbar, 2006). Nekateri jo označujejo kot najmanjšo onkogeno beljakovino, saj je sestavljena iz le 83 aminokislin (AK). V rakavih celicah cerviksa je gen *E5* pogosto izbrisan, kar nakazuje, da beljakovina E5 verjetno ni ključna za vzdrževanje malignega stanja celice (Yang in sod., 2003). Zaradi izjemno hidrofobne narave je E5 sposobna zelo različnih beljakovinskih in lipidnih povezav. Poznamo tri tarče njenega delovanja: verižni receptor rastnega dejavnika  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ), receptor epidermalnega rastnega dejavnika (EGF-R) in 16 kDa velika podenota vakuolarne H<sup>+</sup>-ATPaze (Yang in sod., 2003). V raziskavi, objavljeni leta 2003,

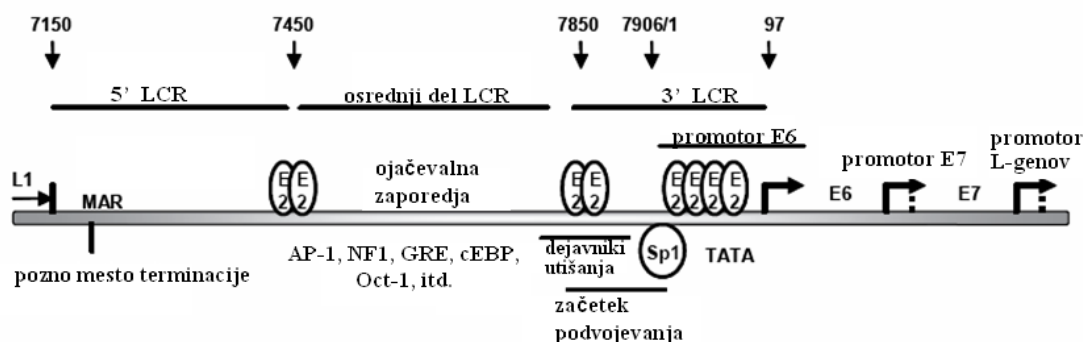
so Gieswein in sod. dokazali homodimere beljakovine E5 (dve beljakovini E5 se povežeta na C-terminalnem delu z disulfidnimi in vodikovimi vezmi), ki so nujni za aktivacijo PDGF $\beta$ -R v odsotnosti liganda. Na ta način E5 sproži transformacijo okuženih keratinocitov. E5 z vezavo na veliko podenoto vakuolarne H<sup>+</sup>-ATPaze ovira njeno aktivnost in s tem endocitotske prenose (ovira zakisanje endocitov). Poleg tega se vpleta v medcelične povezave oz. onesposoblja tesne stike. Glede na velikost in stopnjo hidrofobnosti se E5 nahaja na različnih mestih v celici – največkrat ob membrani (jedrni, membrani GA, ER ali drugih kompartmentov) (Gieswein in sod., 2003; Yang in sod., 2003; Doorbar, 2006). Posledica tega je lahko tudi oviranje metabolizma lipidov, o kateri poročajo v tovrstnih raziskavah (Gieswein in sod., 2003).

Poleg tega E5 HPV-16 zavira še dozorevanje molekul histokompatibilnostnega kompleksa II (MHC II) in s tem preprečuje prikaz virusnih antigenov na površini okužene celice. S tem onemogoči prepoznavo virusa s strani CD4<sup>+</sup> celic, ki posledično ne morejo delovati kot T-celice pomagalk in tudi ne kot citotoksične celice T (Zhang in sod., 2003).

Območje poznih genov nosi zapise za strukturne beljakovine virusnega plašča – L1 in L2. Prepis gena *L1* je velika plaščna beljakovina, ki je primarni strukturni element – infektivni virioni vsebujejo 360 kopij beljakovine L1, organizirane v 72 kapsomer. Skupaj z genom *E1*, gen *L1* predstavlja najbolj ohranjen del genoma med različni HPV (zur Hausen, 1996). L2 molekula je manjša komponenta viriona in je ponavadi v središču pentavalentne kapsomere L1. Beljakovini L1 in L2 sta pomembni za kužnost virusa, njuno izražanje pa je možno le v popolnoma diferenciranih keratinocitih (Doorbar, 2006).

Nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*) ali URR (angl. *upstream regulatory region*) je 400 – 850 bp dolgo območje med genoma *L1* in *E6* in je bogato s promotorji in ojačevalnimi zaporedji (angl. *enhancers*). To področje virusnega genoma ne vsebuje zapisov za virusne beljakovine. Znotraj LCR so vezavna mesta številnih dejavnikov prepisovanja in mesto začetka podvojevanja virusnega genoma – mesto ori (angl. *origin of replication*) (Poljak in sod., 2005; Stanley in sod., 2007). Regulatorna zaporedja v LCR uravnavajo aktivnost promotorjev zgodnjih genov *E6* in *E7*. Vsi HPV v rodu alfa (Slika 3) imajo zelo ohranjeno strukturo promotorja *E6* (p97 pri HPV-16), ki omogoča prepisovanje *E6/E7* policistronske mRNA. Aktivira se z beljakovino SP1 (Apt in

sod., 1996) ali z drugimi celičnimi prepisovalnimi dejavniki, kot so AP-1, NF-1, KRF-1, Oct-1, YY-1 (Chan in sod., 1989; Gloss in sod., 1989; Offord in sod., 1990) (Slika 2). Organizacija področja LCR HPV je v grobem shematsko prikazana na Sliki 2.



Slika 2: Organizacija genomskega področja LCR in vezavna mesta nekaterih regulatornih dejavnikov znotraj genomskega področja LCR. Shema velja za genotipe HPV-6, 11, -16, -18 in -31, pri kožnih genotipih HPV in živalskih virusih papiloma pa je nekoliko drugačna. Številke označujejo nukleotidna mesta v genomu (Apt in sod., 1996; Chan in sod., 1989; Gloss in sod., 1989; Offord in Beard, 1990).

Med genoma *E5* in *E2* se nahaja še drugo nekodirajoče zaporedje, a njegova vloga zaenkrat še ni znana (McGlennen, 2000).

## 2.1.3 Razvrščanje in pregled evolucije HPV

### 2.1.3.1 Razvrščanje HPV

HPV predstavljajo izjemno raznoliko skupino DNA-virusov, ki jih na osnovi skladnosti nukleotidnih zaporedij razvrščamo v različne virusne genotipe. Do danes je bilo odkritih več kot 200 različnih genotipov HPV. Opredeljevanje genotipov HPV je klinično pomembno, saj so HPV posebni v tem, da genotipi virusa izkazujejo tkivno specifičnost in etiološko povezanost z razvojem različnih benignih in malignih sprememb epitela kože in sluznic (Bernard, 2005).

Kot nov genotip HPV opredelimo vsak izolat HPV, ki se v nukleotidnem zaporedju gena *L1* v manj kot 90 % sklada z nukleotidnimi zaporedji gena *L1* vseh uradno priznanih genotipov HPV. V primeru, ko je neskladnost v genu *L1* med 2 in 10 %, je to virusni podtip. Kadar je odstopanje nekega nukleotidnega zaporedja od referenčnega izolata istega genotipa HPV manjše od 2 % za kodirajoča (*L1*) oz. za 5 % za nekodirajoča (LCR) področja genoma HPV, opredelimo novi virus kot podtipsko različico enakega genotipa

HPV. Genotipi HPV so oštevilčeni po vrstnem redu osamitve in ne po njihovih bioloških lastnostih ali medsebojni sorodnosti (de Villiers in sod., 2004).

Opredeljevanje in priznavanje novih genotipov HPV poteka po konvencionalni metodi kloniranja genoma izolata HPV v plazmidne vektorje, čemur sledi določanje nukleotidnega zaporedja oz. značilnih bralnih okvirjev. S PCR pridobljena genomska zaporedja potencialno novih genotipov HPV imajo poleg oznake *HPV* in zaporedne številke še oznako *cand* (npr. *candHPV-86*) (de Villiers in sod., 2004).

#### 2.1.3.2 Odkritje in evolucija HPV

Odkritje HPV sega v začetek 20. stoletja, ko so prvič poročali o prenosu kožnih bradavic z intradermalno inokulacijo brezceličnih filtratov (Ciuffo, 1907), leta 1949 pa so z elektronsko mikroskopijo prvič dokazali virusne delce v tkivnih vzorcih kožnih bradavic (Strauss in sod., 1949). Pomemben korak v razvrščanju HPV je bila vzpostavitev povezave med okužbo s HPV in razvojem raka materničnega vratu (RMV) (zur Hausen, 1976), a je kmalu sledilo spoznanje, da navadne kožne bradavice ne napredujejo v maligno stanje. To je pripeljalo do delitve HPV na kožne in sluznične ter na posled na visokorizične in nizkorizične genotipe HPV (de Villiers in sod., 2004).

HPV so se razvijali z enako hitrostjo, kot je potekal razvoj genoma njihovega gostitelja, *Homo sapiens*. Mutacije in rekombinacije virusnega genoma so izredno redke (de Villiers in sod., 2004). Ena sama točkovna mutacija v določenem filogenetsko ovrednotenem genomskem predelu predstavlja najmanj 12.000 let evolucije (Ong in sod., 1993). Od razvoja *H. sapiens* pa do danes so se genomi HPV spremenili le za približno 2 %. Tako človeštvo verjetno ni nikoli obstajalo brez okužb s HPV in z njimi povezanimi boleznimi (Bernard, 2005; Bernard in sod., 2006). Glede na vzporedno evolucijo človeka in virusov papiloma (PV) lahko sklepamo, da HPV, prav tako kot človeška vrsta, najverjetneje izvirajo iz Afrike, kjer so bili sodeč po raziskavah genomskega področja LCR HPV, najmanj 200.000 do 1.000.000 let izolirani od ostalih celin (Bernard in sod., 2006).

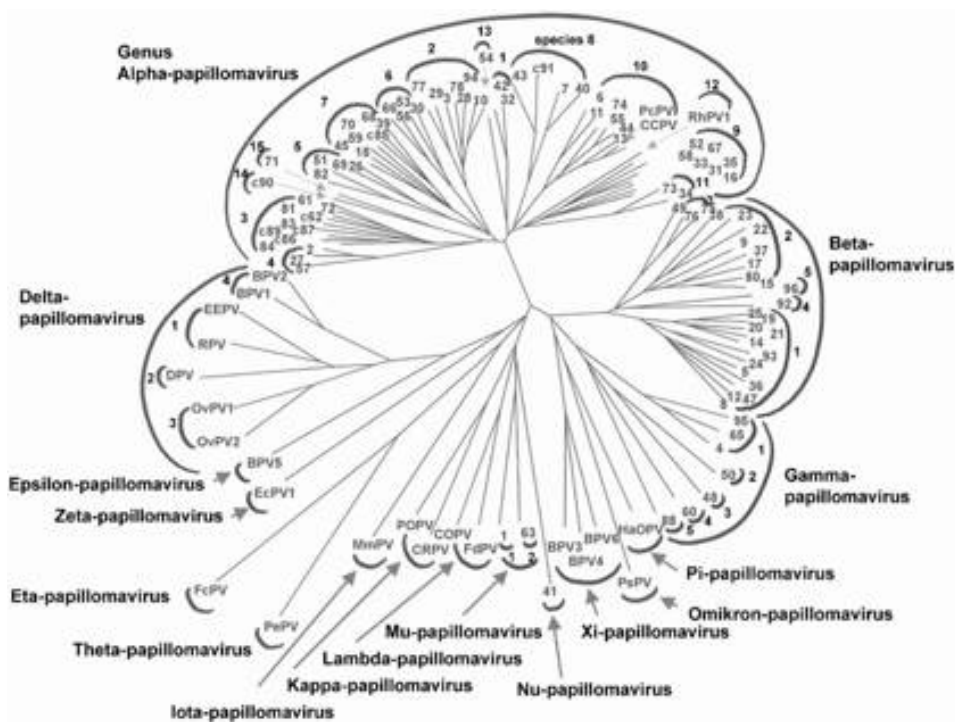
Posledica stroge koevolucije HPV z gostiteljem je izjemna ohranjenost genomov, kar je značilno za večino do sedaj raziskovanih genotipov HPV (npr. HPV-6 in HPV-11). Izjemi sta visokorizična genotipa HPV-16 in HPV-18, ki se v primerjavi z ostalimi HPV

spreminjata hitreje – genetske različice njihovih genomov so z ostalimi HPV značilno razporejene po posameznih geografskih področjih oz. etničnih skupinah (Ong in sod., 1993; Bernard in sod., 2006). Nasprotno npr. genotipa HPV-6 in HPV-11 ne izkazuje etničnega ali geografskega izvora svojega gostitelja, zato so enake različice njihovih genomov naključno porazdeljene po celem svetu (Heinzel in sod., 1995; Bernard in sod., 2006).

### 2.1.4 Razvrščanje genotipov HPV

Genotipe HPV in papiloma viruse (PV) živalskega izvora uvrščamo v družino *Papillomaviridae* oz. 44 virusnih vrst, razvrščenih v 16 rodovih, ki so poimenovani z grškimi črkami od alfa do pi. Različni rodovi PV so si med seboj podobni v manj kot 60 % nukleotidnega zaporedja gena *L1*. Vrste znotraj rodov so si medsebojno podobne v 60-70 % nukleotidnega zaporedja gena *L1*, genotipi znotraj vrst pa so si enaki v 71-89 % nukleotidne sekvence gena *L1* (de Villiers in sod., 2004).

Sorodstvene povezave 118 popolnoma opredeljenih in uradno priznanih PV (94 genotipov HPV in 24 PV, osamljenih pri ostalih sesalcih in pticah), so prikazane na Sliki 3.



Slika 3: Filogenetski prikaz sorodnosti 118 virusov papiloma (de Villiers in sod., 2004).

HPV uvrščamo, skupaj še z nekaterimi opičjimi PV, v pet rodov (alfa, beta, gama, mu in nu), medtem ko v ostale rodove uvrščamo različne druge živalske PV. Največji in klinično najbolj pomemben je rod alfa, kamor so uvrščeni HPV, povezani z nastankom sluzničnih in kožnih sprememb – anogenitalnih karcinomov (npr. HPV-16 in HPV-18), anogenitalnih bradavic in papilomov grla (npr. HPV-6 in HPV-11) ter navadnih kožnih bradavic (npr. HPV-2) (Bernard in sod., 2006). V rodu alfa se genotipi HPV združujejo v 15 vrst. V vrstah 5, 6, 7 in 9 je uvrščenih 13 t.i. visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68), povezanih z nastankom cervikalne intraepitelijske neoplazije najvišje stopnje (CIN-III) in RMV. Med njimi v populaciji žensk prevladujeta HPV-16 in HPV-18, ki sta odgovorna za več kot 70 % vseh primerov RMV (Muñoz in sod., 2004). Klinično pomembna predstavnika rodu alfa sta tudi nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11, poglavitna povzročitelja genitalnih bradavic in papilomov grla (de Villiers in sod., 2004; Bernard, 2005; Doorbar, 2006).

Rod beta (5 vrst) združuje HPV, povezane z nastankom različnih benignih in malignih sprememb kože pri imunsko oslabljenih bolnikih in pri bolnikih z genetsko dedovano kožno boleznijo *epidermodysplasia verruciformis* (EV). Pri ljudeh brez genetskih osnov je okužba z virusi rodu beta najpogosteje asimptomatska. Genotipi HPV, uvrščeni v rodove gama (5 vrst), mu (2 vrsti) in nu (1 vrsta), povzročajo različne benigne spremembe na koži, ki ne napredujejo v maligno (de Villiers in sod., 2004; Bernard, 2005; Doorbar, 2006).

### **2.1.5 Razmnoževanje HPV – produktivna okužba**

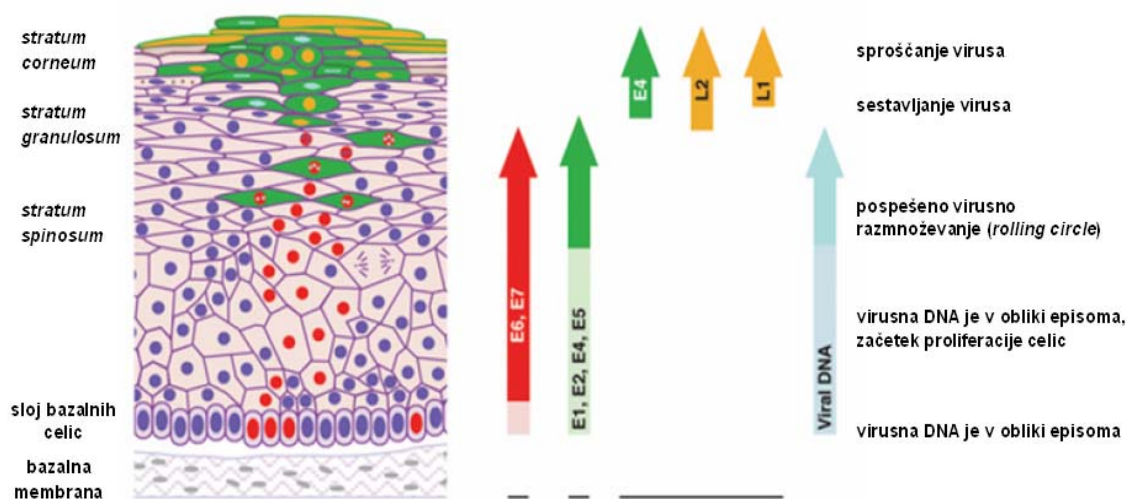
V življenjskem krogu HPV si še danes ne znamo razložiti vseh dogodkov, saj *in vitro* opazovanje virusnega cikla v celičnih kulturah ni možno (Stanley in sod., 2007).

HPV vstopijo v telo na mestu poškodbe kože in sluznice ter okužijo bazalne celice večskladnega ploščatoceličnega epitelijskega. Najverjetneje so za vezavo in sprejem virusa v celico ključni heparan-sulfatni proteoglikani na površini celice. Za učinkovito okužbo so potrebni še sekundarni receptorji –  $\alpha 6$  integrini. HPV vstopa v celico relativno počasi. Pri HPV-16 gre za klatrinsko endocitozo, ni pa to značilno za vse genotipe HPV. V poznih endosomih in lizosomih se delci HPV razgradijo, L2 pa omogoči potovanje virusne DNA v jedro celice. Virusni genom je v celicah bazalnega sloja v episomalni obliki, kar nadzorujeta beljakovini E1 in E2. Takrat je celica v S-fazi in DNA HPV se podvaja

skladno s celično DNA. Vloga beljakovine E2 pri vezavi episomov na mitotične kromosome je kritična za njihovo pravilno segregacijo in razporeditev genoma HPV v hčerinske celice. E2, ki je tudi prepisovalni dejavnik, regulira zgodnji virusni promotor (p97 pri HPV-16) in nadzoruje izražanje virusnih onkogenov (Doorbar, 2006).

V bazalnih celicah epitelija se genom HPV nahaja v majhnem številu kopij, približno 50 – 100 na celico (Stanley in sod., 2007). Ker nima zapisov za encime, potrebne za sintezo DNA, je pomnoževanje genoma HPV popolnoma odvisno od celičnih mehanizmov. Beljakovine zgodnjih virusnih genov *E5*, *E6* in *E7*, ki se v t.i. vegetativnem virusnem ciklu sintetizirajo v komajda zaznavnih količinah, stimulirajo bazalne celice k pospešenemu razmnoževanju. Na ta način se povečuje število okuženih celic (Doorbar, 2006). Okužene bazalne celice v fazi proliferacije potujejo v sloja *stratum spinosum* in *stratum granulosum* (trnasta in zrnata plast podkožnice), med tem pa se virusni genom neprestano razmnožuje (Slika 4). Nastopi faza diferenciacije, bazalne celice keratinocitov dozoriijo v spinozne celice in celični cikel se ustavi. Od tu naprej se genom HPV podvaja po principu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle*), tako da v celicah gostitelja nastaja ogromno število kopij virusnega genoma, vsaj 1000 na celico (Poljak in sod., 2005; Stanley in sod., 2007). Podatki nekaterih študij kažejo, da v keratinocitih, ki so v fazi diferenciacije, specifični diferenciacijski dejavniki pospešujejo prepisovanje virusnih genov (Collier in sod., 1998).

V končni fazi produktivnega cikla PV se pod vplivom celičnih prepisovalnih dejavnikov v popolnoma diferenciranih keratinocitih aktivirajo še promotorji poznih genov, katerih prepisi so beljakovine kapside (L1 in L2) (Poljak in sod., 2005). Velika (L1) in mala (L2) plaščna beljakovina se povezujeta preko hidrofobnih regij in tvorita povezave kapsomer (Doorbar, 2006). Sledi sestavljanje virusnih delcev v citoplazmi okuženih celic na površini epitelija, ki se značilno skrčijo in opazno spremenijo svoj izgled. Te celice imenujemo koilociti (Poljak in sod., 2005). Na koncu se virusi, verjetno s pomočjo beljakovin E4, ki porušijo keratinsko mrežo, sprostijo iz celic in se skupaj z odpadlimi površinskimi celicami epitelija sproščajo v okolje (Doorbar, 2006). Na Sliki 4 je prikazana produktivna okužba večskladnega ploščatoceličnega epitelija. Procesi v zgornjem sloju epitelija, ki vodijo v nastanek novih virusov, so pri visoko- in nizkorizičnih genotipih HPV podobni (Doorbar, 2006).



Slika 4: Virusni cikel v različnih slojih diferencirajočega epidermisa (Doorbar, 2006).

Razmnoževalni krog virusa je dolg. V najboljšem primeru traja okoli 3 tedne od okužbe do sprostitve virusa, saj je to čas, potreben za popolno diferenciacijo keratinocitov. Lahko pa traja tudi več mesecev (Stanley in sod., 2007).

### 2.1.6 Patogeneza oz. karcinogeneza HPV – abortivna okužba

Številni genotipi HPV povzročajo nastanek sprememb, ki ne vodijo v razvoj karcinoma. Med potovanjem okužene celice proti površini ploščatoceličnega epitelija sta čas izražanja virusnih genov in količina njihovih prepisov natančno nadzorovana. Genom virusa je v obliki episoma in se ves čas razmnožuje. Takrat govorimo produktivni okužbi s HPV (Doorbar, 2006).

Do razvoja karcinoma pogosto pride v primerih, kjer je manjša možnost produktivne okužbe, na primer, če se genotip HPV razmnožuje v sistemu, ki ni njegovo naravno okolje (Doorbar, 2006). Primer so PV CRPV (angl. *cotton tail rabbit PV*), ki v svojih naravnih gostiteljih – zajcih, imenovanih »cotton tail rabbits«, povzročajo nastanek produktivnih papilomov, v zajcih drugih vrst (npr. v domačih zajcih) pa nastanejo spremembe, ki ne podpirajo sinteze novih virusov. Take – abortivne okužbe pogosto vodijo v razvoj karcinoma. Podobno so lahko nizkorizični genotipi HPV, ki sicer povzročajo benigne



kožne bradavice (HPV-2 in HPV-4), v redkih primerih povezani z nastankom raka na sluznici (Doorbar, 2006).

Z nastankom rakavih sprememb so najpogosteje povezani visokorizični genotipi HPV. Okužba materničnega vratu z visokorizičnimi genotipi lahko poteka brez citoloških sprememb ali pa vodi v razvoj intraepitelijske neoplazije (CIN) različnih stopenj: nizko (CIN-I), srednjo (CIN-II) ali visoko (CIN-III). Dvajset odstotkov CIN-I napreduje v CIN-II in če ženska ni zdravljena, 30% le-teh v CIN-III. V slabi polovici primerov (40 %) se iz CIN-III lahko razvije RMV (Doorbar, 2006; Stanley in sod., 2007).

Visokorizični genotipi HPV lahko poleg MV okužijo tudi ostale predele anogenitalnega trakta: vagino, vulvo, penis, a se rak na teh področjih razvije le redko (0,001 %). V anusu moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, pa je incidenca s HPV povezanega raka večja – podobna incidenci RMV pri ženskah (0,035 %) (Bosch in de Sanjose, 2003). Virus na teh mestih najverjetneje lažje doseže bazalne celice, kot na mestih, ki so zaščitena s poroženelim slojem epitelija (npr. vulva) (Doorbar, 2006).

V spremembah CIN-I, ki jih lahko povzročajo tako visoko- kot tudi nizkorizični genotipi HPV, poteka izražanje virusnih genov podobno, kot med produktivno okužbo. V nasprotju je v spremembah CIN-III faza celične proliferacije obsežnejša, produktivni cikel življenjskega kroga virusa pa skoraj nezaznaven. Razvoj višjih stopenj CIN in RMV sta pogostejša pri ženskah, ki so več let ali desetletij okužene z visokorizičnimi genotipi HPV, saj le-ti preko beljakovin E6 in E7 neprestano spodbujajo vstop celic v fazo S in posledično celično proliferacijo. Odsotnost p53 in pRb zaradi delovanja E6 in E7 povzroči tudi kopičenje potencialno nevarnih mutacij, ki lahko privedejo do rakave preobrazbe celic, okuženih s HPV (Doorbar, 2006).

Leta 1991 so prvič predlagali model razvoja s HPV povzročene karcinoma (zur Hausen, 1991). Z manjšimi spremembami velja še danes (Poljak in sod., 2005).

V prvi stopnji visokorizični genotipi HPV okužijo ploščatocelični epitelij. V drugi fazi pride do vključitve virusne DNA v humani genom, kar je ključen dogodek pri razvoju karcinoma (npr. RMV). Krožno zaprta dvoverižna molekula DNA virusa HPV se skoraj vedno prekine v področju gena *E2*, ki zaradi tega postane nefunkcionalen. Ker je *E2*

pomemben negativen regulator izražanja virusnih onkogenov *E6* in *E7*, se ob izgubi njegove funkcije oba onkogeno začeta nenadzorovano izražati (Smotkin in Wettstein, 1986; Partridge in sod., 1999).

*E6* visokorizičnih genotipov HPV se veže s celično tumor-supresorsko beljakovino p53 in preko ubikvitinskega proteolitičnega sistema v celici sproži njeno razgradnjo. p53 normalno uravnava prepisovanje celičnih beljakovin, ki uravnavajo celični cikel na prehodu iz faze G1 v fazo S oz. iz faze G2 v fazo M (Longworth in Laimins, 2004; Steenberg in sod., 2005). Beljakovina p53 ima vlogo varuha celičnega genoma in v primeru okvare oz. poškodbe celične DNA, p53 ustavi celični cikel, dokler popravljalni mehanizmi poškodb ne popravijo. Te poškodbe lahko nastanejo kot posledica normalnega celičnega razmnoževanja in/ali zaradi izpostavitve celične DNA raznim fizikalnim ali kemijskim agensom (UV žarkom, metabolitom tobaka, toksičnim kemikalijam idr.). V primeru preobsežnih oz. nepopravljivih poškodb genoma, p53 sproži samouničenje celice oz. apoptozo (Scheffner in sod., 1990; 1993). *E6* torej z vezavo na p53 prepreči popravljanje napak v humanem genomu in tako omogoča delitev celic s poškodovano DNA, kar v končni fazi lahko privede do njihove maligne transformacije (Gu in sod., 1994).

Poleg beljakovine *E6* ima v karcinogenezi visokorizičnih HPV pomembno vlogo tudi beljakovina *E7*. Molekularno ozadje njene destabilizacije celičnega genoma še ni povsem jasno. Znano je, da se povezuje s celičnimi beljakovinami pRb, p107 in p130 ter močno pospeši celično proliferacijo. Ta povezava je pri visokorizičnih trdnejša in stabilnejša, kot pri nizkorizičnih genotipih HPV. Raziskave so pokazale, da imajo beljakovine *E7* nizkorizičnih genotipov HPV zaradi šibkejše afinitete do pRb zmanjšan učinek transformacije *in vitro*. *E7* visokorizičnih HPV povzroči proteolitično razgradnjo pRb (Storey in sod., 1988; Munger in sod., 1989; Doorbar, 2006). Beljakovina pRb v normalnih razmerah v celici z vezavo na dejavnike prepisovanja E2F deluje kot njihov zaviralec. Ti dejavniki se aktivirajo šele na prehodu iz faze G1 v fazo S in so pomembni za prepisovanje številnih gostiteljskih genov. Vezava *E7* na pRb sprosti prepisovalne dejavnike E2F, kar vodi v nekontrolirano nadaljevanje celičnega cikla (Munger in Howley, 2002).

Večina okužb s HPV mine spontano, pri približno 15 % žensk, okuženih z visokorizičnimi genotipi HPV, pa pride do perzistentne okužbe, ki predstavlja veliko tveganje za razvoj malignih sprememb anogenitalnega trakta. Za vzpostavitev perzistence se mora virus ves čas učinkovito izmikati imunskemu odzivu gostitelja. HPV se ne prenaša po krvi in ne povzroči vnetja, zato se med njegovim ciklom razmnoževanja sprosti zelo malo pro-inflamatornih citokinov, ki aktivirajo dendritične celice. Posledično v ploščatoceličnem epiteliju ne pride do imunskega odziva (Stanley in sod., 2007).

Tako kot večina virusov imajo tudi HPV različne mehanizme zaviranja delovanja interferonov (IFN). E6 in E7 visokorizičnih HPV se direktno vpletata v signalizacijsko pot IFN. Študije s pomočjo mikromrež so pokazale, da HPV-16 spremeni izražanje genov, ki gostitelju omogočajo imunski odziv in rezistenco na okužbo s HPV (Stanley in sod., 2007).

### **2.1.7 Podtipske različice HPV in njihov patogenetski pomen**

Genotipi HPV izkazujejo tkivno specifičnost in so povezani z razvojem značilnih bolezenskih sprememb v tarčnem epitelu. Ker se bolezen, značilna za okužbo z določenim genotipom HPV, ne razvije pri vseh okuženih oz. se posledice okužbe z istim genotipom HPV pri posameznikih razlikujejo, se domneva, da se podtipske različice znotraj posameznega genotipa HPV razlikujejo po svojih bioloških lastnostih oz. patogenosti. Podtipske različice so posledica mutacij v nukleotidnem zaporedju nekodirajočih ali kodirajočih področij genoma HPV. Njihova patogenetska raznolikost je do sedaj najboljše preučena pri visokorizičnih genotipih HPV-16 in HPV-18 (Bernard in sod., 2006).

#### **2.1.7.1 Pomen mutacij v beljakovinah E6 in E7**

Raziskave evropskih različic HPV-16 in HPV-18 so pokazale, da lahko spremembe aminokislinskega zaporedja beljakovin E6 in E7 vplivajo na njihove transformacijske sposobnosti oz. spremenijo njihovo afiniteto do celičnih tumor-zavirajočih beljakovin p53 in pRb. Poleg tega lahko mutacije beljakovin E6 in E7 različno vplivajo na mnoge signalizacijske poti v celici (Stoppler in sod., 1996; Song in sod., 1997; Bernard in sod., 2006).

#### 2.1.7.2 Pomen mutacij v beljakovini E2

Spremembe v aminokislinskem zaporedju beljakovine E2 lahko spremenijo pritrjevanje E2 na vezavna mesta v področju LCR in s tem posredno vplivajo na izražanje virusnih onkogenov ter podvojevanje virusnega genoma. V eni sami raziskavi so tako pri evropski različici genotipa HPV-16 pokazali, da spremenjena aminokislinska zaporedja v E2 lahko vplivajo na povečano aktivnost promotorja gena *E6* (Bernard in sod., 2006).

#### 2.1.7.3 Pomen mutacij v beljakovinah L1 in L2

Spremembe aminokislinskega zaporedja beljakovin L1 in L2 lahko spremenijo antigenske lastnosti virusa oz. imunogenost in učinkovitost njegove vezave na celične receptorje. Spremenjene beljakovine L1 lahko ovirajo tudi sestavljanje virusov (Bernard in sod., 2006).

#### 2.1.7.4 Pomen mutacij v nekodirajočem področju LCR

Patogenetska različnost podtipskih različic HPV lahko izvira tudi iz mutacij v nekodirajočem področju LCR. Pri visokorizičnem genotipu HPV-16 so ugotovili, da mutacije v LCR spremenijo vezavna mesta dejavnikov prepisovanja, kar lahko vpliva na aktivnost promotorja *E6* oz. spremnjeno prepisovanje gena *E6*. Zaradi mutacij je lahko sprememljena tudi hitrost razmnoževanja virusa (Bernard in sod., 2006). Področje LCR mutacije razmeroma pogosto prizadenejo, zato je to najbolj variabilno področje v genomu HPV, in poleg genov *E6* in *E7* tudi najbolj primerno za odkrivanje in raziskovanje podtipskih različic HPV oz. določanje njihovih patogenetskih lastnosti. Hkratne spremembe v genomu HPV imajo lahko sinergističen učinek na patogenezo virusa (Chan in sod., 1992; Yamada in sod., 1995, Calleja-Macias in sod., 2005).

## 2.1.8 Podtipske različice HPV-6 in njihov patogenetski pomen

### 2.1.8.1 Odkritje in razvrščanje HPV-6

Genotip HPV-6 sta odkrila Gissmann in zur Hausen leta 1980 (Gissmann in zur Hausen, 1980). DNA HPV, osamljena iz vzorcev genitalnih bradavic, se je razlikovala od petih, takrat poznanih genotipov HPV. Novo odkriti virus sta poimenovala HPV-6.

Celotni genom virusa (dostopna koda v genskih bankah EMBL, DDBJ in NCBI: X02003) je bil opredeljen tri leta pozneje (Schwarz in sod. 1983), in sicer pri izolatu HPV-6b, ki so ga iz tkivnega vzorca genitalnih bradavic osamili de Villiersova in sod. (1981). HPV-6 ima za PV značilno organizacijo genoma in je sestavljen iz kodirajočega (E, L) in neokodirajočega območja (LCR). Kodirajoče območje genoma HPV-6 nosi zapise za 8 različnih genov: *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*, *L1* in *L2*. Ker je bil HPV-6b prvi popolnoma opredeljen izolat HPV-6, ga danes pojmuje kot referenčni oz. prototipski izolat genotipa HPV-6 (de Villiers et al., 2004).

Na podlagi filogenetskih analiz HPV-6, skupaj še s petimi genotipi PV (HPV-11, HPV-13, HPV-44, HPV-74 in opičijim PvPV), uvrščamo v rod virusov papiloma alfa, vrsta 10 (de Villiers in sod., 2004). Skupna lastnost vsem genotipom HPV vrste 10 je ta, da izkazujejo tropizem za večskladni ploščatocelični epitel sluznic. Na podlagi epidemioloških in molekularno-filogenetskih raziskav, HPV-6 uvrščamo med nizkorizične genotipe HPV z nizko zmožnostjo povzročanja malignih transformacij tarčnega epitela (Muñoz in sod., 2003; de Villiers in sod., 2004).

### 2.1.8.2 Epidemiologija okužb s HPV-6

Genotip HPV-6 je etiološko najpogosteje povezan z nastankom genitalnih bradavic in papilomov grla (Gale in sod., 1994, 1995; Gale, 2005). Glede na dostopne podatke iz literature najdemo HPV-6 v približno 70-80 % vseh genitalnih bradavic (Brown in sod., 1999; Potočnik in sod., 2007). Tudi v papilomih grla je med najpogosteje zastopanimi HPV genotip HPV-6 (Gale in sod., 1994; Gale, 2005; Gale in Zidar, 2006; Stamataki in sod., 2007).

### 2.1.8.3 Podtipske različice HPV-6

Leta 1981 so de Villiersova in sod. iz tkivnih vzorcev genitalnih bradavic osamili dva izolata HPV-6, ki so ju na osnovi restrikcijskih analiz njenega genoma opredelili kot dva različna podtipa HPV-6 (HPV-6a in HPV-6b). Tri leta kasneje so Schwarz in sod. (1983) določili celotno zaporedje genoma podtipa HPV-6b (X00203) in ga določili za predstavnika genotipa HPV-6. V nadaljnjih raziskavah so različni raziskovalci dokazali, da je HPV-6 izrazito polimorfen, saj so poleg HPV-6b in HPV-6a opredelili še dodatne podtipe HPV-6 (Mounts in sod., 1982; Gissmann in sod., 1983; Mounts in Kashima, 1984; Boshart in zur Hausen, 1986; Rando in sod., 1986; Brown in sod., 1993). Z uvedbo metode neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja je postalo jasno, da t.i. podtipi HPV-6 dejansko predstavljajo podtipske različice prvotno osamljenega (referenčnega) izolata HPV-6 (HPV-6b), in da bi bilo zato primernejše podtipe HPV-6 opredeljevati kot podtipske različice referenčnega izolata HPV-6b (Chan in sod., 1992). Poleg referenčnega izolata HPV-6 sta bila kasneje opredeljena še dva izolata HPV-6, HPV-6a (L41216) in njemu filogenetsko soroden izolat HPV-6vc (AF092932), ki so ju poimenovali ne-prototipski, podtipski različici HPV-6b (Hofmann in sod., 1995; Kovelman in sod., 1999). V raziskavi Heinzla in sod. (1995) so prvič dokazali, da podtipske različice genotipa HPV-6 tvorijo dve veliki genetski družini. V prvo, t.i. prototipsko družino HPV-6 (HPV-6B), je bil uvrščen referenčni izolat HPV-6b in njemu sorodne različice, medtem ko je bil v drugo, t.i. ne-prototipsko družino HPV-6 (HPV-6A), uvrščen v izolat HPV-6a in njemu sorodne različice. Navedena raziskava je temeljila na analizi genomskega področja LCR pri 62 izolatih HPV-6 iz sedmih držav (Brazilije, Nemčije, Indije, Italije, Japonske, ZDA oz. New Yorka in Senegala). Poleg delitve izolatov HPV-6 na dve skupini so raziskovalci dokazali še obstoj najmanj 19 različic genomskega področja LCR HPV-6 (Heinzel in sod., 1995), ki pa niso kazale filogenetskega združevanja izolatov v skupine glede na etnično ali geografsko pripadnost bolnikov.

V raziskavah, ki so sledile, so različni raziskovalci opredeljevali podtipske različice zgodnjih oz. poznih genov izolatov HPV-6, osamljenih večinoma iz genitalnih bradavic. Krige in sod. (1997) so z molekularno analizo skupnega zaporedja (angl. *consensus sequence*) genov *E1-E4*, *E6* in *E7* 13 izolatov HPV-6 potrdili predhodne ugotovitve, postavljene na osnovi restrikcijskih analiz genoma HPV-6 (Gissmann in sod., 1983; Brown

in sod., 1993), da v GB prevladujejo ne-prototipske različice HPV-6. V raziskavi Caparrós-Wanderleya in sod. (1999) so z analizo celotnega gena *L1* 17 izolatov HPV-6 opredelili 12 podtipskih različic HPV-6. Dve različici HPV-6 sta bili podobni referenčnemu izolatu HPV-6, medtem ko je bilo preostalih 10 različic podobnih ne-prototipskemu izolatu HPV-6a. V raziskavi Kovelmana in sod. (1999) so podtipsko različnost 12 izolatov HPV-6 ugotavljali z molekularno analizo genskih področij *E2*, *E6* in *E7*. Pri tem so dokazali po štiri podtipe različice za vsa tri analizirana področja genoma HPV-6. Podobno kot v predhodnih raziskavah, opravljenih na izolatih HPV-6 iz GB, so bile tudi tu najpogostejše ne-prototipske različice HPV-6 (8 od 12 izolatov HPV-6).

Dosedaj je bilo opravljenih izredno malo raziskav na področju genetske raznolikosti izolatov HPV-6, osamljenih iz papilomov grla. Ker je večina raziskovalcev opredeljevala podtipe različice le pri posamičnih izolatih HPV-6 (Grassmann in sod., 1996; Suzuki in sod., 1997) oz. je bil v določenih raziskavah vir preiskovanih izolatov HPV-6 slabo definiran (Heinzel in sod., 1995) ali pa so bile podtipe različice opredeljene le na osnovi restrikcijskih analiz genoma HPV-6 (Mounts in Kashima, 1982; 1984), tovrstnih raziskav nismo vključili v pregled podtipskih različic HPV-6 (Kocjan, 2007).

#### 2.1.8.4 Problem referenčnega izolata

Izolati HPV-6a, HPV-6b in HPV-6vc predstavljajo tri uradno priznane različice genotipa HPV-6, od katerih HPV-6b velja za referenčno. Medtem ko vse tri različice HPV-6 izkazujejo podobno organizacijo genoma, t.j. nosijo zapise za iste gene, ki se med seboj razlikujejo le v točkastih mutacijah, se v področju LCR - poleg točkastih mutacij – razlikujejo še po prisotnosti različnih nukleotidnih vstavkov oz. izpadov. Te razlike se odražajo v različnih dolžinah njihovih genomov, ki merijo 7902 bp (HPV-6b), 8010 bp (HPV-6a) in 8012 bp (HPV-6vc).

Boshart in zur Hausen (1986) sta v raziskavi, narejeni na osnovi restrikcijskih analiz genoma HPV-6, ugotovila, da se vsi v raziskavi opredeljeni podtipi HPV-6 (HPV-6a, HPV-6b in HPV-6d) razlikujejo od referenčnega izolata HPV-6 (X00203) po prisotnosti približno 120-bp dolgega nukleotidnega vstavka v področju LCR. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi mnogi drugi raziskovalci. Predpostavljeno je bilo, da je do izpada tega vstavka v genomu (zaporedju LCR) referenčnega izolata HPV-6 prišlo med samim

postopkom določevanja njegovega nukleotidnega zaporedja (Boshart in zur Hausen, 1986). Leta 1995 so Heinzl in sod. dokončno razrešili uganko dolžine genoma referenčnega izolata HPV-6. Pridobili so izvorni oz. referenčni izolat HPV-6, mu ponovno določili nukleotidno zaporedje LCR in v njem dokazali 94 bp dolg segment, ki manjka v objavljenem zaporedju LCR HPV-6b. Podobno kot Boshart in zur Hausen (1986) so tudi oni predpostavili, da je vzrok izpada 120 oz. 94 bp dolgega zaporedja v LCR referenčnega izolata HPV-6 napaka pri kloriranju v sisteme, ki vključujejo *E. coli* in da HPV-6b v naravi nikoli ni obstajal brez tega segmenta. Zato so predlagali, da se 94 bp dolgo nukleotidno zaporedje upošteva kot del referenčnega zaporedja LCR HPV-6. Pri tem so uvedli *de-novo* številčenje genomskih mest referenčnega izolata HPV-6: dolžina genoma HPV-6b (X00203), objavljena v spletnih genskih bankah, znaša 7902 bp oz. 7996 bp, če mu prištejemo 94 bp dolg odsek, za katerega vemo, da zagotovo obstaja. Tako LCR HPV-6b dejansko meri 806 bp, in ne 712 bp. Pričakovana dolžina LCR različice HPV-6a (L41216) znaša 820 bp in različice HPV-6vc (AF092932) 822 bp. Žal danes, 13 let pozneje, referenčno zaporedje HPV-6, dostopno v spletnih bazah podatkov, še vedno ne vključuje popravljenega zaporedja LCR.

### 2.1.9 Diagnostika okužb s HPV

Diagnoza okužbe s HPV se pogosto začne že s prepoznavno klinično sliko bolnikov, t.j. vidnimi papilomi ali kondilomi na različnih delih telesa. Le delno jo lahko potrdimo z opazovanjem značilnih citopatskih učinkov (koilocitozo) v okuženih epitelijskih celicah pod svetlobnim mikroskopom, dokazovanjem značilnih virusnih delcev z elektronskim mikroskopom ali dokazovanjem virusnih strukturnih beljakovin z uporabo monoklonskih in poliklonskih protiteles. Izolacija virusa v celičnih kulturah zaenkrat ni možna, saj se virus razmnožuje le v popolnoma diferenciranih keratinocitih. Zgoraj naštetе metode imenujemo tradicionalne metode dokazovanja okužbe s HPV. Ker je zanje značilna slaba občutljivost in ker ne ponujajo genotipizacije HPV, so se v diagnostiki okužb s HPV uveljavile le molekularne metode (Poljak in sod., 1998). Mednje uvrščamo:

- hibridizacijske metode,
- metode pomnoževanja nukleinskih kislin,
- metoda določevanja nukleotidnega zaporedja.



#### 2.1.9.1 Hibridizacijske metode

Hibridizacijske metode temeljijo na povezovanju (hibridizaciji) komplementarnih predelov tarčne DNA z označenimi lovki, ki so lahko DNA ali RNA. Najpogosteje so lovke označene z neradioaktivnimi označevalci, npr. fluorescentnimi barvili, biotinom ali digoksinom, redkeje so v uporabi radioaktivni označevalci, kot so  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ . Lovke so lahko značilne za določen genotip (genotipsko značilne lovke) ali za več genotipov (skupinsko značilne lovke). Stabilnost povezave med lovko in tarčno DNA je pogojena s stopnjo komplementarnosti oz. skladnosti nukleotidnih zaporedij med obema molekulama (Gravitt in Manos, 1993; Lizard in sod., 1998).

Znanih je več različnih hibridizacijskih metod. Hibridizacija po Southernu, njena različica *dot-blot*, hibridizacija *in situ* in tekočinska hibridizacija so ene izmed najpogostejše uporabljenih metod za dokazovanje HPV DNA. Razen tekočinske hibridizacije so vse preveč zamudne in premalo občutljive za uporabo v rutinski diagnostiki. Edini test za dokazovanje okužbe s HPV, ki je odobren s strani FDA (angl. *Food and Drug Administration*), se imenuje Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (hc2) (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA). Temelji na tekočinski hibridizaciji in je namenjen rutinski rabi. Vsebuje dva kompleta RNA lovka: enega, ki prepozna 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68) in drugega, ki prepozna 5 nizkorizičnih (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43, HPV-44) genotipov HPV. Hibridizacijski kompleksi lovka in tarčne DNA nastanejo prosto v tekočini in se vežejo na poliklonska protitelesa, vezana na netopni nosilec. Hibride lovka in tarčne DNA dokažemo s pomočjo z alkalno fosfatazo označenih protiteles proti hibridom RNA/DNA in kemiluminiscentnim substratom. Jakost oddane svetlobe kemiluminiscentnega substrata merimo z luminometrom in jo izražamo v relativnih svetlobnih enotah. Jakost oddane svetlobe je sorazmerna količini vezanih hibridov, s tem pa tudi količini HPV DNA v določenem kliničnem vzorcu (Poljak in sod., 1999). Test hc2 ne omogoča natančnega določevanja genotipa HPV. V primerjavi s PCR je manj občutljiv, a bolj specifičen in ima v primerjavi s PCR večjo pozitivno napovedno vrednost za CIN-III (Poljak in sod., 2002; Seme in sod., 2006).

## 2.1.9.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin

### 2.1.9.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo – PCR (angl. *polymerase chain reaction*) je trenutno najobčutljivejša metoda za dokazovanje okužb s HPV. Temelji na *in vitro* pomnoževanju genomskega odseka, značilnega za določen mikroorganizem, ki se s 25 – 40-kratnim ponavljanjem treh temperaturnih ciklov pomnoži do nivoja zaznavanja. Temperaturni cikli sestojijo iz zaporedne denaturacije osamljene DNA, vezave oligonukleotidnih začetnikov (OZ) na matrico in sinteze nove komplementarne DNA v območju med levim in desnim OZ. Vsaka novo sintetizirana kopija odseka DNA v naslednji ponovitvi temperaturnih ciklov služi kot matrica. Tako se značilni odseki genoma pomnožujejo in eksponentno kopičijo (Poljak in sod., 1994).

Izbira OZ ima eno najpomembnejših vlog v optimizaciji PCR, saj določa del genoma, ki se bo pomnožil. Za pomnoževanje HPV lahko izbiramo med dvema različnima vrstama OZ – za pomnoževanje zaporedja DNA, ki je specifično za posamezen genotip HPV (genotipsko značilni OZ) ali pa za pomnoževanje zaporedja DNA, ki je skupno večim genotipom (skupinsko značilni OZ). V rutinski diagnostiki okužb s HPV so slednji napogostejši, saj omogočajo dokazovanje več genotipov HPV hkrati v eni sami reakciji PCR. Tako se za dokazovanje klinično najbolj pomembnih genotipov HPV iz rodu alfa največkrat uporabljajo skupinsko značilni OZ MY09/MY11 (PGMY09/PGMY11), GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450-, 150-, 65-bp dolg odsek močno ohranjenega virusnega gena L1 (de Roda in sod., 1995; Kleter in sod., 1998; 1999; Gravitt in sod., 2000; Coutlée in sod., 2002), in pa skupinsko značilni OZ CPI/IIg, ki pomnožujejo 188-bp dolg odsek gena E1 (Tieben in sod., 1993). Pomnoževanju DNA HPV sledi dokazovanje in določanje specifičnosti pridelkov PCR oz. genotipizacija HPV.

Nedavno je bilo razvitih kar nekaj komercialnih testov za dokaz okužbe s HPV. Med njimi je trenutno najpomembnejši AMPLICOR<sup>®</sup> HPV Test (Roche Diagnostics, Basel, Švica), ki temelji na encimsko oligonukleotidnem testu in s katerim je mogoče dokazati 13 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68). V reakciji PCR, z OZ, ki so označeni z biotinom, pomnožujemo pribl. 165 bp dolgo

nukleotidno območje znotraj gena *L1*. Pridelke reakcije PCR inkubiramo z značilnimi lovkami v mikrotitrskih ploščicah, pri čemer pride do hibridizacije med lovkami in komplementarnimi področji pridelkov PCR. Slednje dokažemo z dodatkom konjugata avidin - hrenove peroksidaze, ki se veže na biotin, in kromogenega substrata, rezultat pa odčitamo spektrofotometrično. Pomanjkljivost tega testa je v tem, da ne omogoča neposredne genotipizacije HPV (Poljak in sod., 1996; Sandri in sod., 2006).

#### 2.1.9.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času – RT-PCR (angl. *real time PCR*) je nadgrajena kvalitativna ali kvantitativna različica klasične metode PCR, ki med samim pomnoževanjem tarčne DNA podaja informacijo o specifičnosti in, v primeru kvantitativne različice, tudi o količini pridelkov PCR oz. številu kopij tarčne DNA. Zaznavanje virusne DNA temelji na uporabi OZ in fluorescentno označenih lovk. V praksi najpogosteje uporabljamo genotipsko značilne OZ in lovke, s katerimi dokazujemo posamezne genotipe HPV (Lindh in sod., 2007). Kemikalije, potrebne za RT-PCR, so precej drage, zato lahko izdelamo različico hkratne RT-PCR (angl. *multiplex RT-PCR*), ki omogoča hkratno pomnoževanje in specifično zaznavanje več različnih genotipov HPV (Tucker in sod., 2001). LightCycler Instrument v2.0<sup>®</sup> (Roche Diagnostics) je računalniško vodena aparaturna, ki omogoča zaznavanje pridelkov PCR v realnem času. V eni sami reakciji RT-PCR omogoča spremljanje specifičnega pomnoževanja do 4 različnih genotipov HPV.

#### 2.1.9.2.3 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem

Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem – NASBA (angl. *nucleic acid sequence based amplification*) je metoda za dokazovanje sporočilne RNA (mRNA) nekaterih genotipov HPV. Komercialno dostopen test je razvilo podjetje NorChip (Klokkarstua, Norveška), imenuje se PreTect<sup>®</sup> HPV-Proof Test, s katerim je moč opredeliti mRNA *E6* in *E7* petih visokorizičnih genotipov HPV: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45.

#### 2.1.9.2.4 Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA

Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje – LAMP (angl. *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*) je nova metoda za pomnoževanje DNA. Vključuje 4 OZ in encim DNA polimerazo, ki hitro in specifično pomnožuje izbrane odseke DNA do velikosti 300 bp (Notomi in sod., 2000). Pridelki LAMP so različno dolge večkratne ponovitve tarčnega odseka DNA, povezane z zankami, ki nastajajo na koncih tarčne DNA med procesom pomnoževanja. Specifičnost pridelkov lahko preverimo z restrikcijsko analizo. Metoda je bila razvita tudi za dokazovanje DNA HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18, a zaenkrat še ni razširjena ali komercialno dostopna (Hagiwara in sod., 2007).

#### 2.1.9.3 Metode za dokazovanje oz. opredeljevanje pridelkov PCR

i) Pridelke PCR navadno dokažemo z elektroforezo v gelu oz. jih primerjamo z velikostmi standardnih delcev DNA, ločenih v enakih razmerah elektroforeze. Specifičnost te metode je nizka in se praviloma uporablja le za potrditev uspešno izvedene reakcije PCR pred genotipizacijo z drugimi metodami.

ii) Drugi način opredeljevanja pridelkov PCR je določanje njihovega polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (angl. *restriction fragment length polymorphism – RFLP*). Pri tej metodi pridelke PCR izpostavimo delovanju restrikcijskih encimov (endonukleaz) in nastale vzorce razgradnje primerjamo s standardi oz. teoretično določenimi vzorci razgradnje pričakovanih odsekov DNA. Za opredelitev genotipov HPV je opisanih več različic metode RFLP. Med njimi se najpogosteje uporablja metoda, ki temelji na razgradnji skupinsko značilnih pridelkov MY09/11 (PGMY09/11) in s katero je mogoče opredeliti 44 različnih genotipov HPV. Največja pomanjkljivost te metode je zastarelost baze podatkov o standardih za posamezen genotip HPV oz. bi jo bilo potrebno zaradi polimorfizma posameznih nukleotidov na mestih delovanja restrikcijskih encimov (angl. *single nucleotide polymorphism*) obnoviti in dopolniti z novimi vzorci razgradnje pridelkov PCR (Bernard in sod., 1994; Seme in sod., 2006).

iii) Za dokazovanje pridelkov PCR oz. genotipizacijo HPV lahko uporabimo tudi hibridizacijske metode, in sicer:

- reverzni *dot-blot*, ki temelji na prenosu pridelkov PCR na najlonsko membrano s pomočjo vakuumu, čemur sledi hibridizacija z genotipsko značilnimi lovkami;
- reverzni *line-blot*, pri katerem so genotipsko značilne lovke nanosene na nitrocelulozno membrano v obliki jasnih trakov. Lovke hibridizirajo s komplementarnimi odseki pridelkov PCR, po nanosu le-teh na membrano. Metoda omogoča analizo velikega števila vzorcev in opredeljevanje širokega spektra genotipov HPV. Komercialno dostopna testa sta INNO-LiPa HPV genotyping Extra (version 0) (Innogenetics, Gent, Belgija), ki opredeli 27 različnih genotipov HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74 in 82), in Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics), ki opredeli vsaj 37 različnih genotipov alfa-HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, sub82, 83, 84 in 89) (Molijn in sod, 2005; ).

iv) Edini način, s katerim lahko dokončno opredelimo genotip HPV, je metoda določanja nukleotidnega zaporedja. Ta metoda poleg tega omogoča natančno analizo virusnih nukleotidnih zaporedij, odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic in opredelitev novih genotipov HPV. Metoda ni primerna za neposredno opredeljevanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR, pridobljenih s pomnoževanjem HPV DNA s skupinsko značilnimi OZ. Zaradi velikega deleža mešanih okužb, t.j. prisotnosti več različnih genotipov HPV v enem kliničnem vzorcu, je take pridelke, pred samim določanjem nukleotidnega zaporedja, priporočljivo klonirati v plazmidne vektorje, jih razmnožiti v ustreznem bakterijskem sistemu in šele nato iz osamljene DNA določiti specifičnost nukleotidnih zaporedij.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

V nalogo smo vključili 40 izolatov HPV-6 iz arhivske zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vsi izolati HPV-6 so bili predhodno osamljeni iz tkivnih vzorcev genitalnih bradavic, odvzetih pri 40 slovenskih moških (Kocjan, 2007).

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Izdelava oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje LCR HPV-6

Za pomnoževanje in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genomskega področja LCR HPV-6 (806 – 822 bp) je bilo potrebno najprej razviti OZ in protokol pomnoževanja s PCR. V ta namen smo v bazah podatkov GenBank, EMBL in DDBJ, ki so dostopne na medmrežju, poiskali nukleotidna zaporedja celotnega genoma treh uradno priznanih različic HPV-6 [L41216 (HPV-6a), X00203 (HPV-6b) in AF092932 (HPV-6vc)] ter na podlagi njihove poravnave z uporabo računalniškega programa Primer3Plus (Primer3Plus, 2008) razvili dva para OZ (Preglednica 1).

Kakovost izdelanih OZ smo preverili s prosto dostopnim programom Netprimer (NetPrimer, 2008). Specifičnost naleganja OZ na LCR HPV-6 smo preverili z algoritmom BLAST (NCBI, 2008). Vse OZ, uporabljene v raziskavi, je sintetiziralo podjetje TIB MOLBIOL (Berlin, Nemčija).

Prvi (zunanji) par OZ smo razvili tako za pomnoževanje LCR HPV-6 s PCR, kot tudi za nadaljnje določanje nukleotidnega zaporedja. Drugi (notranji) par smo razvili izključno za določanje nukleotidnega zaporedja LCR, saj je celotno genomsko področje LCR relativno dolgo (806 – 822 bp) in ga zato pri sekveniranju le z zunanjim parom OZ ne bi dovolj kakovostno zajeli. Nukleotidna zaporedja OZ in velikosti pričakovanih pridelkov PCR oz. pridelkov sekvenčne reakcije so navedeni v Preglednici 1.

**Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja OZ za pomnoževanje genomskega področja LCR HPV-6**

OZ			Nukleotidno zaporedje OZ	Mesto naleganja*	Velikost pridelka PCR (bp)
ZUNANJI PAR	levi	Lcr-f	5'-CTGCTGTTTCCAAAGCCTCT-3'	7233 -7252	923 <sup>a</sup>
	desni	Lcr-r	5'-TGGTCTATGGTCGTTGCAGA-3'	126 -145	909 <sup>b</sup> 925 <sup>c</sup>
NOTRANJI PAR	levi	LcrSEQ-s	5'-AATCCTATATATTTTGTGCCAGGT-3'	7609 -7632	/
	desni	LcrSEQ-r	5'-TTGGCAGGATATGATGCACT-3'	7661 -7680	/

\* Mesto naleganja OZ v genomu HPV-6b (X00203), ki je referenčni genotip HPV-6 v spletni bazi podatkov GenBank

<sup>a</sup> velikost pričakovanega pridelka PCR za ne-prototipsko različico HPV-6a (L41216)

<sup>b</sup> velikost pričakovanega pridelka PCR za prototip HPV-6b (X00203)

<sup>c</sup> velikost pričakovanega pridelka PCR za ne-prototipsko različico HPV-6vc (AF092932)

### 3.2.2 Pomnoževanje genomskega področja LCR

Protokol pomnoževanja genomskega področja LCR HPV-6 smo prilagodili predvideni dolžini pridelkov PCR (909 bp – 925 bp), lastnostim nukleotidnega zaporedja LCR in lastnostim novo sintetiziranih OZ. Uporabili smo komercialno dostopen komplet kemikalij FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) z inovativno mešanico kemično modificirane Taq polimeraze (FastStart Taq DNA Polymerase) in novega termostabilnega proteina s kontrolnim branjem (angl. *proof-reading activity*), ki z izrezovanjem napačno vstavljenih nukleotidov zagotavlja izredno natančno pomnoževanje tudi večjih kosov genoma – natančnost je približno 4-krat večja v primerjavi z navadno Taq polimerazo. Komplet torej odlikujejo visoka specifičnost in občutljivost ter visok donos pri pomnoževanju DNA.

Za posamezno PCR-reakcijo smo v sterilno reakcijsko posodico odpipetirali 0,5 µl 10 mM nukleotidne mešanice (dNTP mix), po 10 pmol OZ Lcr-f in Lcr-r, 2,5 µl pufru PCR (10X FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,25 U encimske mešanice FastStart High Fidelity Enzyme Blend in 20,85 µl deionizirane vode. Vsebinsko smo dobro premešali in na koncu dodali 0,5 µl HPV DNA. Končni reakcijski volumen je bil 25 µl. Pomnoževanje LCR HPV-6 z OZ Lcr-f in Lcr-r smo izvedli s 40 kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla, sestavljenega iz naslednjih treh inkubacij: 95 °C za 30 sekund, 55 °C za 30 sekund, 72 °C za 1 minuto. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico

inkubirali 2 minuti pri 95 °C, kar povzroči denaturacijo dvoverižne DNA in aktivacijo termostabilnih encimov. Po 40 ciklih pomnoževanja je sledila 7-minutna zaključna stopnja podaljševanja pridelkov PCR pri 72 °C in zaustavitev reakcije PCR z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C.

Pomnoževanje virusne DNA smo izvedli na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System tip 2400 (Applied Biosystems, Foster City, ZDA).

### **3.2.3 Dokazovanje pridelkov PCR**

Pridelke reakcije PCR smo dokazovali kvalitativno z gelsko elektroforezo. Uporabljali smo elektroforezni sistem SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) in že pripravljene komercialno dostopne hidrokele za večkratno uporabo - PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific AG). Geli so sestavljeni iz 1% agaroze, prečno zamrežene s polimerom BG (1, 4-butanedioldiglycidylether), in omogočajo optimalno zaznavanje delcev DNA velikosti od 100 do 4000 bp.

Pufersko raztopino za elektroforezo smo pripravili sami: v suho čašo smo nalili 1950 ml dvojno deionizirane vode in 50 ml 40X pufera TAE (Elchrom Scientific AG), dobro premešali in dodali 100 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics N.V.). Pufersko raztopino smo nato vlili v kadičko zgoraj omenjene elektroforezne aparature in vanjo vstavili gel.

V prvo vdolbinico gela smo vedno najprej nanesti 1,6 µl molekularnega označevalca XVI (Roche Diagnostics), ki vsebuje delce velikosti 100, 200, 300, 400, ... 1500 bp in v lestvici po 100 bp označuje velikost posameznih delcev, prepotovanih v gelu. Molekularni označevalec vsebuje še dodatni delec DNA, velik 2642 bp. V vsako naslednjo vdolbinico gela smo nanašali po 7,6 µl mešanice posameznega pridelka PCR (6 µl) in nanašalnega pufera Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG) (1,6 µl).

Elektroforeza v gelu je pri napetosti 120 V med obema elektrodama potekala 20 minut pri sobni temperaturi, s samodejno vključitvijo črpalke za kroženje pufera 1,5 minute po vklopu. Takoj po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV lučjo in ga fotografirali



z digitalnim aparatom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel). Specifičnost pridelka PCR je določala njegova velikost glede na velikost pozitivne kontrole in velikost delcev molekularnega označevalca (pribl. 900 bp).

### **3.2.4. Določanje nukleotidnega zaporedja in opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6**

Podtipe različice LCR HPV-6 smo opredelili z neposrednim določanjem nukleotidnega zaporedja celotnega genomskega področja LCR in primerjavo dobljenih zaporedij s popravljenim zaporedjem LCR referenčnega izolata HPV-6 (X00203) (Heinzel in sod., 1995), katerega smo označili kot »*HPV-6b-mod*«.

#### **3.2.4.1 Čiščenje pridelkov PCR**

Pridelke PCR smo pred izvedbo sekvenčne reakcije očistili oz. jim odstranili nespecifične pridelke PCR velikosti do 100 bp, OZ, soli, encime, nevgrajene nukleotide ter ostale nečistoče. Pridelke smo čistili s komercialno dostopnim kompletom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija).

Eni volumski enoti pridelkov PCR, ki je znašala 19 µl, smo dodali pet volumskih enot pufra PBI, ki učinkovito veže predvsem OZ in neželene majhne eno- in dvoverižne nespecifične pridelke PCR (velikosti do 100 bp). Mešanico pufra in pridelkov PCR smo premešali na vorteksu, jo nanесли na ločevalno mikrokolono s silikatno membrano, vloženo v 2 ml zbiralno tubico in vse skupaj centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm v centrifugi Rotanta 460 (Hettich AG, Bäch, Švica). S tem so se skozi membrano mikrokolone izločili nespecifični pridelki PCR in tudi ostale nečistoče, med tem ko se je DNA obdržala na membrani. Tubico z izpirkom smo zavrgli, mikrokolono pa vstavili v novo čisto zbiralno tubico.

V nadaljevanju smo v mikrokolono dodali 750 µl pufra PE, s pomočjo katerega smo s centrifugiranjem 2 minuti pri 13000 rpm sprali preostanek soli, vezanih na DNA. Odsotnost soli je ključna za uspešno kasnejše spiranje DNA z membrane mikrokolone. Po centrifugiranju smo ponovno zavrgli zbiralno tubico in izpirek, mikrokolono pa vstavili v

novo zbiralno tubico in centrifugirali še nadaljnji 2 minuti pri 13000 rpm. S tem smo odstranili tudi ostanke pufra PE. Mikrokolono smo nato prestavili v čisto epico, staro zbiralno tubico pa smo zavrgli.

DNA smo z membrane mikrokolone eluirali z dodatkom 30-50  $\mu$ l pufra EB (volumen elucijskega pufra EB je bil odvisen od jakosti pridelka PCR, dokazanega na elektroforeznem gelu) in dvominutnim centrifugiranjem mikrokolone pri 13000 rpm. Očiščene pridelke smo do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C.

#### 3.2.4.2 Določanje koncentracije pridelkov PCR

Čiščenju pridelkov PCR je sledilo določanje njihovih koncentracij. Tudi ta postopek je vključeval uporabo agaroznega gela (1,7 %), ki smo ga pripravili po naslednjem postopku: v stekleno čašo smo vlili 50 ml 1X pufra TAE (0,04 M Tris-HCL, 0,02 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,02 M Na-acetat pH = 8,3), dodali 0,8 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA), dobro premešali ter nastalo raztopino v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Še vroči raztopini agaroze smo dodali 5  $\mu$ l etidijevega bromida koncentracije 10 mg/ml (Innogenetics, N.V.), dobro premešali in vlili v kalup z vstavljenimi glavnički, ki v strjenem gelu tvorijo luknjice za nanos vzorcev. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in gel vstavili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Submarine Unit (Hoefler, San Francisco, ZDA) in ga prelili z 1X pufrom TAE, predhodno ohlajenim na 4 °C. V prvo luknjico smo nanесли 10  $\mu$ l koncentracijskega molekularnega označevalca MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, (Fermentas, Vilnius, Litva). Ta vsebuje 11 delcev različnih velikosti (80 – 1031 bp) in koncentracij (0,8; 1; 2; 3; 4; 10; 6; 7; 8; 9 in 10 ng/ $\mu$ l). V vsako naslednjo luknjico smo nanесли 12  $\mu$ l mešanice očiščenega pridelka PCR (5  $\mu$ l), deionizirane vode (5  $\mu$ l) in nanašalnega pufra 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas) (2  $\mu$ l).

Elektroforeza v gelu je potekala 30 minut pri napetosti 120 V. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV lučjo in ga fotografirali z digitalnim aparatom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

Koncentracijo posameznega pridelka PCR smo določili tako, da smo primerjali jakost njegove emitirane fluorescentne svetlobe pod UV lučjo z jakostjo delcev z znano koncentracijo DNA na lestvici molekularnega označevalca.

#### 3.2.4.3 Sekvenčna reakcija

Naslednji korak na poti k določevanju nukleotidnega zaporedja LCR HPV-6 je izvedba sekvenčne reakcije. V raziskavi smo uporabili aparat GenAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems) in komercialno dostopen komplet Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Zaradi relativno velike dolžine pridelkov PCR, smo le-te sekvenirali z dvema paroma OZ – z zunanjim parom, katerega smo uporabili tudi v reakciji PCR, in notranjim parom, katerega smo razvili ravno v ta namen (Preglednica 1).

Za izvedbo sekvenčne reakcije smo za posamezen pridelek PCR LCR HPV-6 potrebovali 4 sterilne reakcijske posodice. V posamezno reakcijsko posodico smo dodali 1,5 pmol OZ, 2 µl 5X pufra za sekveniranje BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer, 0,5 µl reakcijske mešanice Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, 5 ng DNA in ddH<sub>2</sub>O do končnega reakcijskega volumna 10 µl.

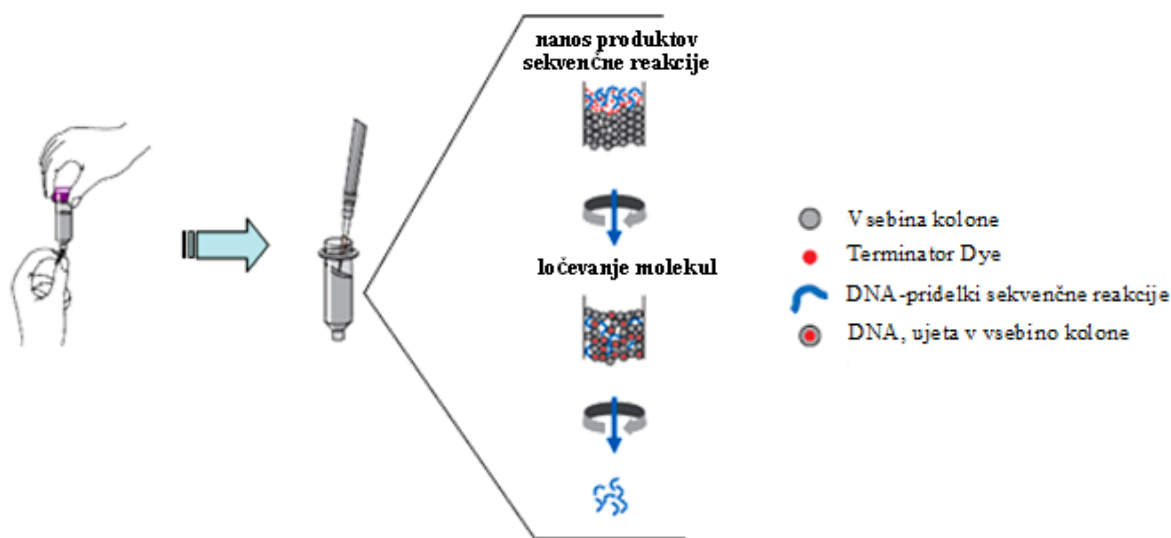
Sekvenčna reakcija je v vseh primerih, razen pri sekveniranju z OZ Lcr-f, potekala po predhodno opisanem protokolu STeP (Platt in sod. 2007). Začetni enominutni inkubaciji pri 96 °C je sledilo 15 temperaturnih ciklov naslednjih treh inkubacij: 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund, 60 °C za 75 sekund. Sledilo je 5 temperaturnih ciklov inkubacij: 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund, 60 °C za 90 sekund in še 5 ciklov, sestavljenih iz inkubacij 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund, 60 °C za 2 minuti. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo na 8 °C.

#### 3.2.4.4 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Pridelke sekvenčne reakcije smo pred analizo z avtomatskim sistemom za določanje nukleotidnih zaporedij očistili nevgrajenih dideoksinukleotidov s komercialno dostopnim paketom DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). Paket DyeEx je relativno hiter, preprost, predvsem pa učinkovit sistem odstranjevanja nevgrajenih dideoksinukleotidov. Princip čiščenja temelji na gelski kromatografiji, ki ločuje molekule med seboj glede na molekulsko maso (Slika 5). V kompletu najdemo že pripravljene mikrokolone, napolnjene z raztopino resina, ki se med centrifugiranjem strdi v gel. V nastalem gelu so kroglaste tvorbe, ki tvorijo pore,

skozi katere molekule v snovi, nanesene na kolono, potujejo z različno hitrostjo glede na velikost oz. molekulsko maso. Manjše molekule, kot so dideoksinukleotidi, se ujamejo v gelskih porah, medtem ko večje molekule, kot so molekule DNA, v pore ne morejo vstopiti in se tako ločijo od manjših molekul, saj hitreje prehajajo skozi gel.

Shema in princip delovanja čiščenja pridelkov sekvenčne reakcije sta prikazana na Sliki 5.



Slika 5: Shema in princip delovanja čiščenja pridelkov sekvenčne reakcije

Mikrokolone, napolnjene z raztopino resina, smo na rahlo pretresli, malce odvili pokrovček (toliko, da smo preprečili nastanek vakuuma v mikrokoloni) in odlomili spodnji del mikrokolone (Slika 5). Mikrokolono smo nato vstavili v 2 ml zbiralno tubico in jo centrifugirali 3 minute pri 2660 rpm. Zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa vstavili v novo 1,5 ml tubico. V mikrokolono smo na sredino strjenega gela, ki je nastal iz raztopine resina med centrifugiranjem, nanesli 10  $\mu$ l pridelkov sekvenčne reakcije (kar je celotna sekvenčna reakcija) in ponovno centrifugirali 3 minute pri 2660 rpm. Med centrifugiranjem so se manjše molekule, kot so terminatorji Dye (nevgrajeni dideoksinukleotidi), ujele v pore v gelu, medtem ko so se DNA – pridelki sekvenčne reakcije, ki so bistveno večje molekule, izločili iz gela in skoncentrirali v eluatu v 1,5 ml tubici. Slednjo smo prenesli v vakuumsko centrifugo Speed VAC SC110 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, ZDA) in sušili 10 minut. Za tem smo v tubico z osušeno DNA dodali 25  $\mu$ l denaturacijske raztopine Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide (Applied BioSystems), ogrete

na sobno temperaturo. Tubico smo vorteksirali in nastalo mešanico prenesli v 0,2 µl reakcijske posodice za PCR. Tako pripravljene vzorce smo v aparaturi PCR GenAmp<sup>®</sup> System 2700 (Applied Biosystems) nazadnje denaturirali 2 minuti pri 95 °C in jih takoj za tem za najmanj 10 minut postavili v ledeni blok, ohlajen na -20 °C.

#### 3.2.4.5 Avtomatsko določanje in analiza nukleotidnega zaporedja ter opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6

##### 3.2.4.5.1 Določanje nukleotidnega zaporedja v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Medicinske fakultete v Ljubljani

V laboratoriju smo z metodo avtomatskega sekveniranja pridelkov PCR 10-im naključno izbranim izolatom HPV-6 določili nukleotidno zaporedje LCR po spodaj navedenem postopku.

Očiščene pridelke sekvenčne reakcije smo vstavili v posebna stojala in jih prenesli v aparaturo za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ta aparatura zabeleži surove podatke (angl. *raw data*) o določenem nukleotidnem zaporedju, ki se nato prenese v računalniški program ABI PRISM<sup>™</sup> Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Slednji zbrane podatke analizira in jih poda v obliki elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

##### 3.2.4.5.2 Določanje nukleotidnega zaporedja pri podjetju Macrogen (Seul, Koreja)

Da bi preverili kakovost in zanesljivost nukleotidnih zaporedij pridelkov PCR, ki smo jih pridobili s sekveniranjem v našem laboratoriju, smo vseh 10 pridelkov PCR poslali v analizo podjetju Macrogen iz Koreje. Pričakovali smo, da bodo s svojo najsodobnejšo tehnologijo za sekveniranje uspeli pridobiti nukleotidna zaporedja veliko daljših področij genoma, kot to omogoča naša aparatura ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (do 500 bp). Glede na predhodno sodelovanje imamo v laboratoriju dobre izkušnje z omenjenim

podjetjem, saj ga poleg kakovosti odlikuje tudi kratek čas posredovanja rezultatov in nizka cena storitev.

Poleg pridelkov PCR 10 izolatov HPV-6, ki smo jih analizirali v našem laboratoriju, smo v Korejo poslali še pridelke PCR preostalih 30 izolatov HPV-6, ki jih v našem laboratoriju nismo opredelili.

V čistih epicah smo podjetju MacroGen poslali vzorce vseh 40 pridelkov PCR in vseh 4 OZ. Koncentracije in volumne pridelkov PCR in OZ smo prilagodili zahtevam podjetja; poslali smo po 10  $\mu$ l posameznega pridelka PCR s koncentracijo 50 ng/ $\mu$ l in po 10  $\mu$ l vsakega izmed štirih OZ (5 pmol/ $\mu$ l).

#### 3.2.4.5.3 Analiza nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali in obdelali z računalniškim paketom Vector NTI Advance v10.1.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Z uporabo specifičnih algoritmov smo za vsak pridelek PCR uskladili nukleotidna zaporedja, pridobljena z vsakim od štirih OZ (Preglednica 1). Na ta način smo pridobili celotno (konsenzno) zaporedje LCR HPV-6, dolgo približno 800 bp. Z nadaljnjo analizo nukleotidnih zaporedij LCR smo opredeljevali podtypeske različice izolatov HPV-6.

Z algoritmom ClustalW, ki je sestavni del programskega paketa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 (North, Carolina State University, ZDA), smo izvedli multiplo poravnavo pridobljenih zaporedij s popravljenim zaporedjem LCR (HPV-6b-mod) referenčnega izolata HPV-6b (X00203) (Heinzel in sod., 1995). Ta vsebuje 94 bp dolgo nukleotidno zaporedje, ki manjka v nukleotidnem zaporedju LCR referenčnega izolata. Na ta način smo preverili mutacije v področju LCR naših izolatov HPV-6.

Kot novo različico genotipa HPV-6 smo opredelili vsak izolat HPV-6, ki se je od referenčnega izolata HPV-6 razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo oz. nukleotidni vstavek/izpad v genomskem področju LCR.

### 3.2.5 Filogenetska uvrstitev različic LCR HPV-6

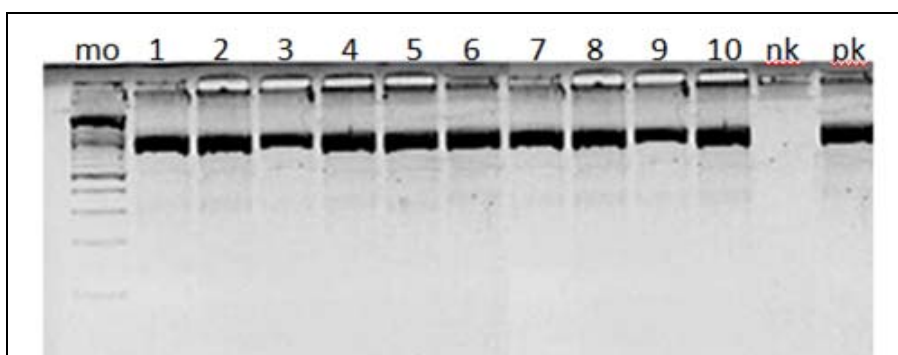
Na podlagi poravnave nukleotidnih zaporedij LCR smo ugotavljali podobnosti in razlike med podtipskimi različicami LCR slovenskih izolatov HPV-6 in do zdaj opredeljenimi različicami LCR HPV-6 iz drugih delov sveta (Heinzel in sod., 1995).

V programu BioEdit smo s ClustalW Multiple Alignment poravnali vsa v raziskavo vključena zaporedja LCR in glede na značilne mutacije ugotavljali evolucijske povezave med njimi. Za primerjavo med izolati HPV-6 smo uporabili področje LCR, ki se nahaja med genomskima mestoma 7676 in 7939 (oz. 7676 in 101) – številke ustrezajo *de novo* številčenju genomskih mest referenčnega izolata HPV-6, ki so ga v svoji raziskavi uvedli Heinzel in sod. (1995).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Pomnoževanje LCR HPV-6

Z uporabo OZ Lcr-f in Lcr-r smo pri vseh 40 izolatih HPV-6, vključenih v raziskavo, uspešno pomnožili približno 900 bp dolgo področje genoma HPV-6, ki obsega celotno zaporedje LCR HPV-6 (806 – 822 bp). Primeri pomnoževanja pribl. 900 bp dolgega genomskega področja HPV-6 desetih izolatov HPV-6 so prikazani na Sliki 6.



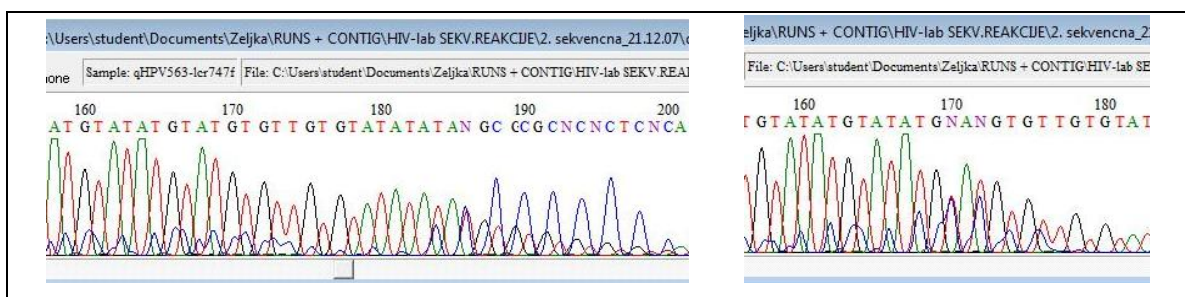
Slika 6: Fotografija elektroforeznega gela 10 nanesenih pridelkov PCR, pridobljenih s pomnoževanjem DNA 10 izolatov HPV-6 z OZ Lcr-f in Lcr-r; 1-8: zaporedne številke nanesenih pridelkov PCR; nk: negativna kontrola; pk: pozitivna kontrola; mo: molekularni označevalec 100 bp (Roche Diagnostics)

### 4.2 Določanje nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic HPV-6

#### 4.2.1 Določanje nukleotidnega zaporedja v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Medicinske fakultete v Ljubljani

Začeli smo z analizo 10 naključno izbranih pridelkov PCR. Predhodno opisan protokol sekvenčne reakcije STeP (Platt in sod. 2007) je bil uspešen pri pridobivanju oz. določanju nukleotidnih zaporedij z OZ Lcr-r, LcrSEQ-s in LcrSEQ-r. V primeru sekveniranja z OZ Lcr-f pa smo ga malce priredili, saj po nekajkratnih poizkusih sekveniranja nismo dobili zadovoljivih rezultatov. Signal je namreč v vsakem poizkusu upadel prezgodaj, in sicer vedno na razdalji pribl. 170 bp od začetka področja LCR. Tako je bila dolžina uporabnega nukleotidnega zaporedja namesto okoli 500 bp le 170 bp. Signal je v nekaterih primerih upadel postopoma, večkrat pa strmo (Slika 7).





Slika 7: Upadanje signala: levo - postopno; desno - strmo

V nadaljevanju naloge smo zato dodobra preučili problematično zaporedje in ugotovili, da je na matrici nekaj bp naprej od področja, kjer je signal na elektroferogramu upadel, relativno dolgo, z GT bogato področje. Zaporedje, ki vsebuje velik delež nukleotidov G in T, predstavlja težko dostopno mesto za vezavo DNA polimeraze in šibko oprijemališče tega encima. Nastali dupleks podaljšanega OZ in matrice je precej nestabilen, zato se vzdolž njega polimeraza le težka premika.

Po nekajkratnih neuspešnih poskusih pridobivanja nukleotidnega zaporedja omenjene regije, s katerimi smo izključili številne možne vzroke težav (kontaminacijo matrice, sekundarne strukture, neustrezne koncentracije kemikalij), smo prežgodnji upad signala odpravili z uporabo protokola, ki ga proizvajalec kompleta BigDye<sup>®</sup> Terminator priporoča za sekveniranje z GT bogatih genomskih področij: začetni enominutni inkubaciji pri 96 °C je sledilo 15 temperaturnih ciklov inkubacij 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund in 55 °C za 75 sekund. Sledilo je 5 temperaturnih ciklov inkubacij: 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund, 55 °C za 90 sekund in še 5 ciklov, sestavljenih iz inkubacij 96 °C za 10 sekund, 50 °C za 5 sekund, 55 °C za 2 minuti. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo na 8 °C. S tem ukrepom smo odpravili težave s prežgodnjim upadom signala na elektroferogramu pri sekveniranju z OZ Lcr-f.

Tako smo desetim, naključno izbranim pridelkom PCR v našem laboratoriju uspešno določili nukleotidna zaporedja. Končno, konsenzno zaporedje LCR HPV-6 posameznega vzorca smo sestavili z uskladitvijo 4 zaporedij, pridobljenih s sekveniranjem izbranega pridelka PCR s 4 različnimi OZ (Lcr-f, Lcr-r, LcrSEQ-s in LcrSEQ-r).

#### 4.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja v podjetju Macrogen

V podjetju Macrogen so z uporabo 4 OZ (Lcr-f, Lcr-r, LcrSEQ-s in LcrSEQ-r) uspešno določili nukleotidno zaporedje LCR pri vseh 40 izolatih HPV-6. Primerjava konsenznih nukleotidnih zaporedij LCR 10 izolatov HPV-6, opredeljenih v našem laboratoriju in istih 10 izolatov, opredeljenih v podjetju Macrogen, je pokazala 100 % ujemanje. Zato smo verjeli tudi v zanesljivost nukleotidnih zaporedij ostalih 30 pridelkov PCR, ki so jih opredelili v Macro genu.

Ugotovljene dolžine LCR slovenskih izolatov HPV-6 so bile 806, 820 in 841 bp.

#### 4.2.3 Podtiske različice LCR HPV-6

Z molekularno opredelitvijo celotnega genomskega področja LCR smo pri 40 izolatih HPV-6 opredelili 13 različic LCR, med katerimi nobena ni ustrezala zaporedju LCR referenčnega izolata HPV-6b-mod (X00203). Tri prototipske oz. prototipu HPV-6 podobne različice LCR smo dokazali pri 4 od 40 (10 %) izolatov HPV-6, medtem ko smo 10 ne-prototipskih različic dokazali pri preostalih 36 (90 %) izolatih HPV-6, vključenih v raziskavo. Ena različica (LCR-4) je bila enaka zaporedju LCR podtiske različice HPV-6a, medtem ko različic, enakih HPV-6vc, v raziskavi nismo dokazali.

V 806 bp dolgem zaporedju LCR smo pri 40 izolatih HPV-6 zabeležili 38 nukleotidnih mest, na katerih so se ti izolati razlikovali od popravljenega referenčnega zaporedja LCR HPV-6b-mod (Heinzel in sod., 1995). Med njimi je bilo 27 enojnih nukleotidnih zamenjav, 3 nukleotidni vstavki (angl. *insertion*) (en 1 bp, en 14 bp in en 20 bp), 7 nukleotidnih izpadov (angl. *deletion*) po 1 bp in en nukleotidni izpad, dolg 19 bp. Od referenčnega izolata HPV-6b je genetsko najbolj oddaljena različica LCR-4, saj se od njega razlikuje na 23 nukleotidnih mestih (23/806 oz. 2,85 %), kar je največje število razlik, zabeleženih pri eni različici. Najmanj odstopanj od referenčnega zaporedja LCR HPV-6 smo zabeležili pri različici LCR-3 in sicer le 2 nukleotidni zamenjavi (2/806 oz. 0,25 %). Razporeditev opredeljenih podtipskih različic LCR pri 40 slovenskih izolatih HPV-6 in značilne mutacije, zabeležene v 806 bp dolgem področju LCR, so prikazane na Sliki 8.

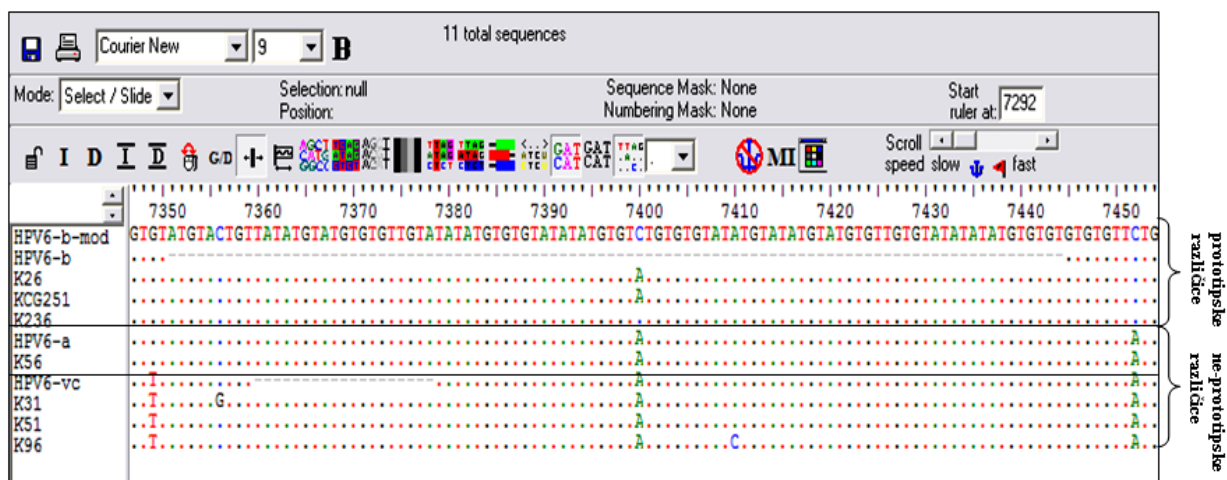
Pri vseh prototipskih in tudi ne-prototipskih različicah slovenskih izolatov HPV-6 smo, podobno kot Heinzl in sod. (1995), na genomskem mestu 7350 dokazali 94 bp dolg odsek znotraj področja LCR, ki manjka v zaporedju LCR referenčnega izolata HPV-6 (X00203). Na Sliki 9, je prikazana hkratna poravnava popravljene referenčnega nukleotidnega zaporedja LCR (HPV-6b-mod), originalnega referenčnega nukleotidnega zaporedja LCR HPV-6 (HPV-6b), zaporedij LCR HPV-6a in HPV-6vc ter zaporedij LCR sedmih izolatov HPV-6, obravnavanih v naši raziskavi. Pri vseh je dobro viden 94 bp dolg odsek področja LCR, manjkajoč pri referenčnem izolatu HPV-6.

Zanimivo je, da pri nobeni podtipski različici LCR HPV-6, opredeljeni v naši raziskavi, nismo zabeležili nukleotidnega izpada I<sub>4</sub> (19 bp), ki je značilen za HPV-6vc. Glede na to, da so bile vse ne-prototipske različice HPV-6 (razen LCR-4) zelo podobne oz. enake LCR HPV-6vc, predvidevamo, da je do izpada tega 19 bp dolgega področja v genomu HPV-6vc, podobno kot v primeru HPV-6b, prišlo med samim postopkom določevanja nukleotidnega zaporedja (Kovelman in sod., 1999).

	IZOLATI / RAZLIČICE HPV-6	LCR različica	7349	7356	7366	7368	7400	7410	7452	7467	7513	7514	7515	7516	7517	7518	7519	7520	7594	7608	7612	7616	7617	7618	7623	7628	7661	7673	7679	7696	7700	7747	7748	7812	7813	7838	7840	7884	7909	7911	7954	8016	Pogostnost		
			G	C	T	G	C	A	C	G	C	C	T	C	T	T	G	T	G	T	T	T	A	A	C	C	A	C	A	T	C	G	C	C	A	T	A	C	G	A	G	T			
izolati - prototipske različice	HPV-6b-mod		G	C	T																																							0	
	K-26	LCR-1					A			T																																			1
	KCG-251	LCR-2					A			T																																			1
	K-238, K-377-Ez	LCR-3					C			T																																		2	
izolati - neprototipske različice	HPV-6a							A	T	A		V <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>			I <sub>7</sub>		C	A	T	G			G	G	C	A		V <sub>2</sub>		C	A			A	V <sub>3</sub>	0			
	K-56	LCR-4						A	T	A		V <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>			I <sub>7</sub>		C	A	T	G			G	G	C	A		V <sub>2</sub>		C	A			A	V <sub>3</sub>	1			
	HPV-6vc		T		I <sub>8</sub>		A		A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>					A	V <sub>3</sub>	0			
	K-8, K-11, K-21, K-36, K-41, K-76, K-91, K-228, K-241, K-276, K-281, K-291, K-296, K-308, K-316, K-326, K-341, K-361	LCR-5	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>					A	V <sub>3</sub>	18		
	K-1, K-81, K-81, K-221, K-271, K-351, K-371	LCR-6	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										G	C	A	T	G	G			G	G		A		V <sub>2</sub>		A		A	V <sub>3</sub>	7		
	K-331	LCR-7	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>		A		G	A	V <sub>3</sub>	1		
	K-51	LCR-8	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										G	C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>				A	V <sub>3</sub>	1		
	K-301	LCR-9	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										G	C	A	T	G	G			G	G		A		V <sub>2</sub>		A			A	V <sub>3</sub>	1	
	K-31, K-46, K-368-1, K-231	LCR-10	T	G				A		A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>					A	V <sub>3</sub>	4		
	K-96	LCR-11	T					A	C	A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>					A	V <sub>3</sub>	1		
	K-286	LCR-12	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>						A				C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>					A	V <sub>3</sub>	1		
	K-116x	LCR-13	T					A		A	T	A		V <sub>1</sub>										C	C	A	T	G			G	G		A		V <sub>2</sub>		G				A	V <sub>3</sub>	1	

Slika 8: Podtypeske različice LCR HPV-6, opredeljene pri 40 slovenskih izolatih HPV-6. Zgoraj so navedena genomska mesta popravljenega, 806 bp dolgega referenčnega zaporedja HPV-6 (X00203), t.j. HPV-6b-mod (od genomskega mesta 7292 – 101), kjer je prišlo do zamenjave ali vstavka/izpada nukleotidov. Genomska mesta, kjer nismo zabeležili mutacij glede na referenčno zaporedje, so potemnjena. Prototipske različice HPV-6 smo od ne-prototipskih ločili glede na vstavke V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> in V<sub>3</sub> na genomskih mestih 7514, 7812 in 8016 ter glede na značilne nukleotidne podpise na mestih 7452, 7513, 7618, 7623, 7628, 7661, 7696, 7700. I<sub>8</sub> smo zabeležili samo pri različicah HPV-6vc.

- V<sub>1</sub> = Nukleotidni vstavek 1 (14 bp) = TACATTATTGTATA
- V<sub>2</sub> = Nukleotidni vstavek 2 (20 bp) = ATATGTTTATTGCCACTGCA
- V<sub>3</sub> = Nukleotidni vstavek 3 (1 bp) = T
- I<sub>1</sub> - I<sub>7</sub> = Nukleotidni izpadi (1 bp)
- I<sub>8</sub> = Nukleotidni izpad (19 bp) = ATGTGTGTTGTATATATGT



Slika 9: 94 bp dolgo nukleotidno zaporedje znotraj genomskega področja LCR, ki smo ga dokazali pri vseh 40 izolatih HPV-6, vključenih v raziskavo. Na sliki so prikazana nukleotidna zaporedja sedmih izolatov, podobnih oz. enakih HPV-6b, HPV-6a oz. HPV-6vc. Pri izolatu HPV-6vc (AF092932) je viden tudi manjkajoči, 19 bp dolg odsek znotraj LCR, katerega smo ravno tako dokazali pri vseh opredeljenih različicah HPV-6.

#### 4.3 Filogenetska uvrstitev različic LCR HPV-6

Genomsko področje LCR 40 slovenskih izolatov HPV-6 smo primerjali z zaporedji LCR 19 različic LCR HPV-6, opredeljenimi v raziskavi Heinzela in sod. (1995). Iz skupine enakih predhodno opisanih podtipskih različic (Heinzel in sod., 1995) smo določili po enega predstavnika iz vsakega geografskega področja in ga glede na popravljeno nukleotidno zaporedje referenčnega izolata HPV-6 (HPV-6b-mod) primerjali s podtipskimi različicami, opredeljenimi v naši raziskavi (LCR-1 – LCR-13). Izolati predhodno opisanih podtipskih različic LCR HPV-6 so bili osamljeni iz sedmih različnih geografskih področji: Indije (IN), New York-a (NY) – ZDA, Brazilije (B, AM), Nemčije (G), Senegala (SN), Japonske (J) in Italije (I). Primerjava je obsegala področje LCR od genomskega mesta 7676 do 101.

Na Sliki 10 so prikazane podobnosti in razlike podtipskih različic LCR HPV-6 (nt 7676 – 101), opredeljenih v naši raziskavi, in podtipskih različic, opredeljenih v raziskavi Heinzela in sod. (1995).

IZOLATI / RAZLIČICE HPV-6		7679	7696	7700	7747	7748	7769	7812	7813	7819	7838	7840	7884	7889	7893	7897	7909	7911	7934	Pogostnost	
HPV-6b-mod		A	T	C	G	C	T	C	A	C	T	A	C	T	T	T	G	A	A		
izolati - prototipske različice	LCR-1																			1	
	IN6-3 (19, 20)	C			C	A											C			8	
	NY6-1 (17, 20)																				
	B6-17 (4a)																				
	LCR-2	C			C	A														1	
	NY6-16																			1	
	LCR-3																			2	
	G6-2b																			1	
	SN6-11																				8
	IN6-2 (4, 11, 13, 21, 30)	C																			
	J6-11																				
	IN6-6 (24)					A															
	J6-6	C																			
	NY6-13 (18)																				
	B6-15	C			C	A								A							
SN6-1		G	G		A				T							C					
izolati - ne-prototipske različice	HPV-6a		G	G	C	A		V <sub>2</sub>				C	A								
	LCR-4																			1	
	NY6-11 (12)		G	G	C	A		V <sub>2</sub>				C	A							5	
	G6-6 (11, 71)																				
	NY6-19		G	G	C	A		V <sub>2</sub>				C	A	-						1	
	HPV-6vc		G	G		A		V <sub>2</sub>													
	LCR-5, LCR-8, LCR-10, LCR-11, LCR-12																			25	
	B6-4b																				
	SN6-3 (4a, 5, 6a, 7, 8, 9, 10)		G	G		A		V <sub>2</sub>													
	G6-20 (9, 2a)																				
	I6-1 (12, 13, 14)																				
	J6-4																				
	LCR-6, LCR-9													A						8	
	G6-8		G	G		A		V <sub>2</sub>						A						2	
	SN6-4b																				
	LCR-7		G	G		A		V <sub>2</sub>					A					G		1	
	LCR-13		G	G		A		V <sub>2</sub>		G										1	
	J6-8		G	G		A		V <sub>2</sub>										G		1	
	SN6-6b		G	G		A		V <sub>2</sub>					C	A						1	
	AM6-1 (2)		G	G	C	A		V <sub>2</sub>					C	A		G				2	
	B6-1	C			C	A	A	V <sub>2</sub>					C	A		G			G	1	
	B6-5			G		A		V <sub>2</sub>												1	
G6-42					A		V <sub>2</sub>												1		
G6-78					A		V <sub>2</sub>						A						1		

Slika 10: Primerjava podtipskih različic LCR HPV-6 (od genomskega mesta 7676 do 101), opredeljenih v naši raziskavi (LCR-1 – LCR-13), s predhodno opisanimi različicami LCR HPV-6 (Heinzel in sod., 1995). Zgoraj so navedena genomska mesta popravljenega, 806 bp dolgega referenčnega zaporedja HPV-6 (X00203), t.j. HPV-6b-mod, kjer je prišlo do zamenjave ali vstavka/izpada nukleotidov. Genomska mesta, kjer nismo zabeležili mutacij glede na referenčno zaporedje, so potemnjena. Prototipske različice HPV-6 smo od ne-prototipskih ločili glede na vstavke V<sub>2</sub> na genomskega mestu 7812.

- = nukleotidni izpad (1 bp)

V<sub>2</sub> = nukleotidni vstavek 2 (20 bp) = ATATGTTTATTGCCACTGCA

Kot je razvidno iz Slike 10, je bila različica LCR-1, ki smo jo opredelili pri enem slovenskem izolatu HPV-6, enaka različicam LCR HPV-6, opredeljenim pri izolatih iz Indije, New Yorka (ZDA) in Brazilije. Različico LCR-2, ki smo jo ravno tako opredelili pri enem slovenskem izolatu, so predhodno dokazali pri enem izolatu iz New Yorka. Različica LCR-3, opredeljena pri dveh slovenskih izolatih HPV-6, je bila enaka različici G6-2b, opredeljeni pri nemškem izolatu HPV-6. Različica LCR-4, dokazana pri enem slovenskem izolatu, je v obravnavanem genomskem področju (nt 7676 – 101) popolnoma ustrezala ne-prototipski različici HPV-6a in različicam LCR izolatov HPV-6 iz New Yorka in Nemčije. Različice LCR-5, LCR-8, LCR-10, LCR-11 in LCR-12 so bile v obravnavanem genomskem območju enake in so sovpadale z različicami LCR HPV-6, dokazanimi v Braziliji, Senegal, Nemčiji, Italiji in na Japonskem. Različicama LCR-6 in LCR-9, ki smo ju dokazali pri osmih slovenskih izolatih HPV-6, sta bili enaki različici izolatov HPV-6 iz Nemčije in Senegala, različici LCR-7 in LCR-13 pa smo opredelili kot novi različici LCR HPV-6, saj v obravnavanem genomskem območju nista bili enaki nobeni predhodno opisani različici LCR HPV-6.

Različic LCR HPV-6, enakih SN6-11, IN6-2, J6-11, IN6-6, J6-6, NY6-13, B6-15, SN6-1, NY6-19, J6-8, SN6-6b, AM6-1, B6-1, B6-5, G6-42 in G6-78 (Heinzel in sod., 1995) v naši raziskavi nismo dokazali.

## **5 RAZPRAVA IN SKLEPI**

### **5.1 RAZPRAVA**

#### **5.1.1 Pomnoževanje LCR HPV-6**

Pri vseh 40 izolatih HPV-6, vključenih v raziskavo, smo z verižno reakcijo polimeraze uspešno pomnožili približno 922 bp dolgo področje genoma HPV-6, ki obsega celotno zaporedje LCR HPV-6 (806 – 841 bp).

#### **5.1.2 Določanje nukleotidnega zaporedja in opredelitev podtipskih različic LCR HPV-6**

V Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo kljub začetnim težavam uspeli določiti celotno nukleotidno zaporedje genomskega področja LCR 10-im naključno izbranim pridelkom PCR oz. izolatom HPV-6. Težave pri določevanju nukleotidnega zaporedja s sekvenčno reakcijo z OZ Lcr-f so nastopile zaradi z G-T bogatega zaporedja, ki predstavlja šibko oprijemališče DNA polimeraze na matrico. Raziskave so pokazale, da imajo genomska območja LCR, ki so bogata z G-T ponovitvami, regulatorno vlogo pri prepisovanju virusnih genov in rekombinaciji (Hamada in sod., 1984) in da so pogostejša in obsežnejša pri genitalnih genotipih HPV, kot pri kožnih (Kitasato in sod., 1994).

V podjetju Macrogen so tako 10 pridelkom PCR, katerim smo tudi sami določali nukleotidno zaporedje, kot preostalim 30, ki jih v našem laboratoriju nismo opredeljevali, kakovostno določili vsa nukleotidna zaporedja LCR. Primerjava nukleotidnih zaporedij pridelkov PCR oz. izolatov HPV-6, pridobljenih v našem laboratoriju z zaporedji, ki so jih določili v Koreji, je pokazala 100 % ujemanje ter tako potrdila kakovost našega in njihovega dela.

#### **5.1.3 Opredelitev podtipskih različic HPV-6**

Pri 40 izolatih HPV-6 smo opredelili 13 različic genomskega področja LCR. Razmerje med različicami LCR, podobnimi prototipskemu izolat in različicami, podobnimi ne-



prototipskima izolatoma HPV-6a in HPV-6vc, je v skladu s pričakovanji: večina (90 %) izolatov HPV-6, osamljenih iz GB, je bilo podobno kot v številnih tovrstnih raziskavah (Krige in sod., 1997; Gissman in sod., 1983; Brown in sod., 1993), ne-prototipskih oz. podobnih HPV-6vc in HPV-6a. Ne-prototipska različica HPV-6vc se od HPV-6a jasno razlikuje po značilnih nukleotidnih podpisih, a ker so razlike med HPV-6a in HPV-6b mnogo izrazitejše, od razlik med HPV-6a in HPV-6vc, lahko HPV-6vc in HPV-6a pojmujeemo kot dve različni ne-prototipski različici HPV-6. Sodeč po rezultatih naše raziskave v GB prevladujejo različice HPV-6, enake oz. podobne HPV-6vc.

Glede na naše rezultate in rezultate predhodnih raziskav lahko povzamemo, da so ne-prototipske različice HPV-6 pogosteje zastopane v spremembah ploščatoceličnega epitelija in zato verjetno bolj patogene od prototipskih, a neposrednih dokazov za te domneve zaenkrat še ni. Glede na to, da se genomsko področje LCR, ki je ključno za uravnavanje podvojevanja virusnega genoma, pri obeh različicah HPV-6 precej razlikuje, se posledice teh razlik mogoče kažejo v različni hitrosti in uspešnosti razmnoževanja posameznih podtipskih različic LCR HPV-6.

Pri vseh 40 izolatih HPV-6 smo v genomskem področju LCR dokazali 94 bp dolg odsek, ki manjka v referenčnem izolatu HPV-6b (X00203). Podobno kot Heinzl in sod. (1995) menimo, da je manjkajoč 94 bp dolg odsek znotraj LCR referenčnega izolata HPV-6b posledica napak določanja njegovega nukleotidnega zaporedja, ki je vključevalo kloniranje v *E. coli*.

Poleg tega smo v nalogi odkrili tudi pomanjkljiv zapis nukleotidnega zaporedja LCR tudi pri uradno priznani ne-prototipski različici HPV-6vc (AF092932). Iz poravnave nukleotidnih zaporedij LCR HPV-6a, HPV-6vc in izolatov HPV-6, opredeljenih v naši raziskavi, s popravljenim zaporedjem LCR referenčnega izolata HPV-6b (HPV-6b-mod) je razvidno, da 19 bp dolgo nukleotidno zaporedje na mestu 7360, manjka le pri izolatu HPV-6vc. Ker smo to zaporedje dokazali pri vseh podtipskih različicah HPV-6, zelo podobnih HPV-6vc, sklepamo, da tako kot HPV-6b, tudi HPV-6vc v naravi nikoli ni obstajal brez tega zaporedja oz. da je 19 bp dolg nukleotidni izpad posledica napak pri kloniranju genoma v plazmidne vektorje, kot je to predvideval takratni postopek določevanja nukleotidnega zaporedja (Kovelman in sod., 1999).

V raziskavi smo po pričakovanjih dokazali tudi dve novi podtipski različici LCR HPV-6. Zaradi precej omejenega genomskega področja, ki smo ga vključili v filogenetske analize, rezultati, dobljeni v naši raziskavi, niso povsem realni oz. bi primerjava celotnega področja LCR zagotovo podajala drugačno sliko razvrščanja različic LCR HPV-6. Celotno področje LCR obsega okoli 900 bp, mi pa smo v primerjalne analize vključili le okoli 260 bp genomskega področja LCR, t.j. 7676 – 101, saj je to edino področje LCR, ki je opredeljeno pri ostalih svetovnih izolatih HPV-6. Tako na primer različice LCR-5, LCR-8, LCR-10, LCR-11 in LCR-12, ki smo jih opredelili z analizo celotnega področja LCR, v primerjavi z zaporedji svetovnih izolatov HPV-6 (Heinzel in sod., 1995), predstavljajo le eno različico LCR HPV-6. Verjamemo torej, da bi s primerjavo celotnih zaporedij LCR v naši nalogi odkrili več različnih, kot tudi novih različic LCR HPV-6.

## 5.2 SKLEPI

- ⇒ V nalogi, ki je vključevala 40 slovenskih izolatov genotipa HPV-6, smo opredelili 13 različic področja LCR, od katerih se jih je 11 uvrstilo med predhodno že opisane, opredelili pa smo tudi dve novi različici LCR HPV-6.
- ⇒ Z raziskavo smo potrdili domnevo o filogenetski razvrstitvi različic HPV-6, saj so bile nekatere slovenske različice LCR HPV-6, sicer v omejenem genomskem področju (7676 – 101), enake številnim drugim različicam LCR HPV-6, izoliranim v različnih geografskih področjih po vsem svetu. Tako v nalogi nismo dokazali združevanja izolatov HPV-6 glede na geografski ali etnični izvor njihovih gostiteljev.
- ⇒ Rezultati raziskave nakazujejo na večjo patogenost ne-prototipskih različic HPV-6, saj so le-te med izolati HPV-6 iz GB v primerjavi s prototipskimi mnogo pogosteje zastopane.
- ⇒ Dokazali smo pomanjkljivosti nukleotidnih zaporedij LCR izolatov HPV-6, objavljenih v spletnih genskih bankah, saj smo pri vseh 40 izolatih, vključenih v raziskavo, dokazali 94 bp dolg nukleotidni odsek, ki manjka v zaporedju LCR referenčnega izolata HPV-6 (X00203), poleg tega smo pri vseh naših izolatih HPV-6 dokazali tudi 19 bp dolg nukleotidni odsek, ki manjka v zaporedju LCR ne-prototipske različice HPV-6vc (AF092932). Na podlagi teh ugotovitev smo pri določevanju mest mutacij v genomskem področju LCR upoštevali novo številčenje genomskih mest.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli opredeliti podtipske različice LCR HPV-6 pri 40 izolatih HPV-6, osamljenih iz genitalnih bradavic istega števila slovenskih moških. S PCR smo uspešno pomnožili področje LCR pri vseh 40 izolatih HPV-6, pridelke PCR očistili s komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) in jim z uporabo komercialno dostopnega kompleta BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) določili nukleotidno zaporedje regije LCR (806 – 841 bp). Pri tem smo uporabili aparaturo za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Z računalniškim programom BioEdit Sequence Alignment Editor smo analizirali pridobljena nukleotidna zaporedja in kot novo različico LCR HPV-6 opredelili vsak izolat HPV-6, ki se je od referenčnega izolata HPV-6 razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo.

Tako smo med 40 v raziskavo vključenimi izolati HPV-6 opredelili 13 podtipskih različic LCR HPV-6, katere smo filogenetsko uvrstili med do sedaj opisane podtipske različice LCR HPV-6, izolirane iz različnih geografskih območij po vsem svetu (Heinzel in sod., 1995). Večina (11) podtipskih različic LCR HPV-6, opredeljenih v naši raziskavi, je bila že predhodno opisanih, dve različici področja LCR pa smo opredelili prvič. Dokazali smo pomanjkljivosti v nukleotidnih zaporedjih referenčnega izolata HPV-6 (X00203) (94 bp dolg izpad znotraj LCR) in izolata HPV-6vc (AF092932) (19 bp dolg izpad znotraj LCR), objavljenih v spletnih genskih bankah ter tako kot Heinzel in sod. (1995) upoštevali novo številčenje genomskega mesta z mutacijami od genomskega mesta 7350 naprej.

Večino (90 %) izolatov HPV-6, vključenih v našo raziskavo, smo opredelili kot ne-prototipske različice LCR HPV-6, podobne HPV-6a oz. HPV-6vc, ter tako sklepali o njihovi večji patogenosti v primerjavi s prototipskimi.

## 7 VIRI

Apt D., Watts R.M., Suske G., Bernard H.U. 1996. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology*, 224: 281-291

Bernard H.U., Chan S.Y., Manos M.M., Ong C.K., Villa L.L., Delius H., Peyton C.L., Bauer H.M., Wheeler C.M. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170: 1077-1085

Bernard H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32: 1-6

Bernard H.U., Celleja-Macias I.E., Dunn S.T. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118: 1071-1076

Blachon S., Demeret C. 2003. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, 85: 813-819

Bosch F.X., de Sanjose S. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute*, 31: 3-13

Boshart M., zur Hausen H. 1986. Human papillomaviruses in Buschke-Löwenstein tumors: physical state of the DNA and identification of a tandem duplication in the noncoding region of a human papillomavirus 6 subtype. *Journal of Virology*, 58: 963-966

Brown D.R., Bryan J.T., Cramer H., Fife K.H. 1993. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and Southern blot techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2667-2673

Brown D.R., Schroeder J.M., Bryan J.T., Stoler M.H., Fife K.H. 1999. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3316-3322

Calleja-Macias I.E., Kalantari M., Allan B. 2005. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *Journal of Virology*, 79: 6565-6569

Caparrós-Wanderley W., Savage N., Hill-Perkins M., Layton G., Weber J., Davies D.H. 1999. Intratype sequence variation among clinical isolates of the human papillomavirus type 6 L1 ORF: clustering of mutations and identification of a frequent amino acid sequence variant. *Journal of General Virology*, 80: 1025-1033

Chan W.K., Klock G., Bernard H.U. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *Journal of Virology*, 63: 3261-3269

Chan S.Y., Ho L., Ong C.K. 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *Journal of Virology*, 66: 2057-2066

Ciuffo G. 1907. Innesto positivo con filtrato di verucca volgare. *Giornale Italiano Malattie Venereologia*, 48: 12-17

Collier B., Goobar-Larsson L., Sokolowski M., Schwartz S. 1998. Translational inhibition *in vitro* of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 22648-22656

Coutlée F., Gravitt P., Kornegay J., Hankins C., Richardson H., Lapointe N., Voyer H., The Canadian Women's HIV Study Group, Franco E. 2002. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 902-907

Davies R., Hicks R., Crook T., Morris J., Vousden K. 1993. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*, 67: 2521-2528

de Roda Husman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., Meijer C.J., Snijders P.J. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76: 1057-1062

de Villiers E.M., Gissmann L., zur Hausen H. 1981. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *Journal of Virology*, 40: 932-935

de Villiers E.M., Fauquet C., Brooker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27

Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541

Gale N., Ferluga D., Poljak M., Kambiccaron V., Fischinger J. 1994. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathological, and clinical evaluation. *Virchows Archiv B, Cell Pathology*, 425: 291-295

Gale N. 2005. Papilloma/papillomatosis. V: Pathology and genetics of head and neck tumours. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. (eds.) Lyon, IARC Press: 144-145

Gale N., Zidar N. 2006. Benign and potentially malignant lesions of the squamous epithelium an squamous cell carcinoma. V: Pathology of the head and neck. Cardesa A., Slootweg P.J. (eds.). Heidelberg, Springer: 1-29

Gissmann L., zur Hausen H. 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*condylomata acuminata*). International Journal of Cancer, 25: 605-609

Gissmann L., Wolnik L., Ikenberg H., Koldovsky U., Schnürch H.G., zur Hausen H. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80: 560-563

Gieswein C.E., Sharom F.J., Wildeman A.G. 2003. Oligomerisation of the E5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. Virology, 313: 415-426

Gloss B., Yeo-Gloss M., Meistererst M., Rogge L., Winnacker E.L, Bernard H.U. 1989. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. Nucleic Acids Research, 17: 3519-3533

Grassmann K., Wilczynski S.P., Cook N., Rapp B., Iftner T. 1996. HPV6 variants from malignant tumors with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. Virology, 223: 185-197

Gravitt P.E., Manos M.M. 1993. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. Laboratory Animal Science, 43: 5-10

Gravitt P.E., Peyton C.L., Alessi T.Q., Wheeler C.M, Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M.H., Scott D.R., Apple R.J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. Journal of Clinical Microbiology, 38: 357-361



Gu Z., Pim D., Labrecque S., Banks L., Matlashewski G. 1994. DNA damage induced p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene*, 9: 629-633

Hagiwara M., Sasaki H., Matsuo K., Honda M., Kawase M., Nakagawa H. 2007. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus Type 6, 11, 16 and 18. *Journal of Medical Virology*, 79: 605-615

Heinzel P.A., Chan S.Y., Ho L., O'Connoor M., Balaram P., Campo M.S., Fujinaga K., Kiviat N., Kuypers J., Pfister H., Steinberg B.M., Tay S.K., Villa L.L., Bernard H.U. 1995. Variaton of human Papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1746-1754

Hofmann K.J., Cook J.C., Joyce J.G., Brown D.R., Schultz L.D., George H.A., Rosolowsky M., Fife K.H., Jansen K.U. 1995. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, 209: 506-518

Kleter B., van Doorn L.J., ter Schegget J., Schrauwen L., van Krimpen K., Burger M., ter Harmsel B., Quint W. 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *American Journal of Pathology*, 153: 1731-1739

Kleter B., van Doorn L.J., Schrauwen L., Molijn A, Sastrowijoto S., ter Schegget J., Lindeman J., ter Harmsel B., Burger M., Quint W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2508-2517

Kocjan B. 2007. Molekularna opredelitev podtipskih različic humanih virusov papiloma HPV-6, HPV-53 in HPV-38 in njihov patogenetski pomen. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 32 -32 str.

Kovelman R., Bilter G.K., Roman A., Brown D.R., Barbosa M.S. 1999. Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. *Journal of General Virology*, 80: 2445-2451

Krige D., Mills H.R., Berrie E.L., Doherty N.C., Jones D.K., Ryan C.A., Davies H., Myint S., McCance D.J., Layton G.T., French T.J. 1997. Sequence variation in the early genes E1E4, E6 and E7 of human papilloma virus type 6. *Virus Research*, 49: 187-191

Lindh M., Gorander S., Andersson E., Horal P., Mattsby-Balzer I., Ryd W., 2007. Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *Journal of Clinical Virology*, 40: 321-324

Lizard G., Chignol M.C., Souchier C., Roignot P., Chardonnet Y., Schmitt D. 1998. Detection of low copy numbers of HPV DNA by fluorescent in situ hybridization combined with confocal microscopy as an alternative to in situ polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 72: 15-25

Longworth M.S., Laimins L.A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 362-372

McGlennen R.C. 2000. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 20: 384-405

Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32: 43-51

Mounts P., Shah K.V., Kashima H. 1982. Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 5425-5429

Mounts P., Kashima H. 1984. Association of human papillomavirus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 94: 28-33

Munger K., Werness B.A., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E., Howley P.M. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumour suppressor gene product. *Embo Journal*, 8: 4099-4105

Munger K., Howley P.M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transforming functions. *Virus Research*, 89: 213-228

Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003. Epidemic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348: 518-527

Muñoz N., Bosch F.X., Castellsague X., Diaz M., De Sanjose S., Hammouda D., Shah K.V., Meijer C.J.L.M. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*, 111: 278-285

NCBI – National Center for Biotechnology Information. 2008. Blast assembled genomes. Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (maj 2008): 1 str.

NetPrimer. 2008. Palo Alto, Premier Biosoft International (maj 2008)  
<http://premierbiosoft.com/> (feb. 2008): 1 str.

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: 1-7

Ong C.K., Chan S.Y., Campo M.S., Fujinaga K., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., Pfister H., Tay S.K., ter Meulen J., Villa L.L., Bernard H.U. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virology*, 67: 6424-6431

Offord E.A., Beard P.A. 1990. Member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *Journal of Virology*, 64: 4792-4798

Park J.S., Chee Y.H., Namkoong S.E., Han S.K., Kim T.E., Lee H.Y., Kim S.J. 1994. Human papillomavirus detection in cervical carcinoma tissues and para-aortic lymph nodes by the polymerase chain reaction. *Gynecologic Oncology*, 53: 344-351

Partridge M., Kiguwa S., Emilion G., Pateromichelakis S., A'Hern R., Langdon J.D. 1999. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 35: 45-55

Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L. Jr. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques*, 43: 58-62

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo-nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400

Poljak M., Seme K. 1996. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 56: 231-238

Poljak M., Seme K., Gale N. 1998. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 5: 216-234

Poljak M., Brenčič A., Seme K., Vince A., Marin I.J. 1999. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 796-797

Poljak M., Marin I. J., Seme K., Vince A. 2002. Hybrid capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *Journal of Clinical Virology*, 25: 89-97

Poljak M., Kocjan B.J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 9: 60-72

Potočnik M., Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. 2007. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermato-Venereologica*, 16: 91-98

Primer3Plus: pick primers from a DNA sequence. 2008. Wageningen, University of Wageningen, Laboratory of Bioinformatics (maj 2008)  
<http://www.bioinformatics.nl/> (feb. 2008): 1 str.

Rando R.F., Groff D.E., Chirikjian J.G., Lancaster W.D. 1986. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *Journal of Virology*, 57: 353-356

Sandri M.T., Lentati P., Benini E., Dell'Orto P., Zorzino L., Carozzi F.M., Maisonneuve P., Passerini R., Salvatici M., Casadio C., Boveri S., Sideri M. 2006. Comparison of the Digene HC2 Assay and the Roche AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Test for Detection of High-Risk HPV Genotypes in Cervical Samples. *Journal of clinical microbiology*, 44: 2141–2146

Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63: 1129–1113

Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D., Howley P.M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505

Schwarz E., Dürst M., Demankowski C., Lattermann O., Zech R., Wolfspurger E., Suhai S., zur Hausen H. 1983. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *The EMBO Journal*, 2: 2341-2348

Seme K., Fujs K., Kocjan B.J., Poljak M. 2006. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. *Journal of Virological Methods*, 134: 252-256

Seo Y.S., Muller F., Lusky M., Hurwitz J. 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 702-706

Smotkin D., Wettstein F.O. 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

Song Y.S., Kee S.H., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Chang W.H., Lee H.P. 1997. Major Sequence Variants in E7 Gene of Human Papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of korean women. *Gynecologic Oncology*, 66: 275-281

Stamatakis S., Nikolopoulos T.P., Korres S., Felekis D., Tzangaroulakis A., Ferekidis E. 2007. Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: still a mystery disease with difficult management. *Head and Neck*, 29: 155-162

Stanley M.A., Pett M.R., Coleman N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1456-1460

Steenbergen R.D., de Wilde J., Wilting S.M., Brink A.A., Snijders P.J., Meijer C.J. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of Clinical Virology*, 32: 25-33

Stoppler M.C., Ching K., Stoppler H., Clancy K., Schlegel R., Icenogle J. 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *Journal of Virology*, 70: 6987-6993

Storey A., Pim D., Murray A., Osborn K., Banks L., Crawford L. 1988. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *Embo Journal*, 7: 1815-1820

Strauss M.J., Shaw E.W., Bunting H., Melnick J.L. 1949. "Cristalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intra-nuclear inclusion bodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 72: 46-50

Suzuki T., Tomita Y., Nagata H., Kono A., Simizu B. 1997. Nucleotide and amino acid sequence variations in the L1 open reading frame of human papillomavirus type 6. *Journal of Medical Virology*, 53: 19-24

Tieben L.M., ter Schegget J., Minnaar R.P. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *Journal of Virological Methods*, 42: 265-279

Tucker R.A., Unger E.R., Holloway B.P., Swan D.C. 2001. Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Molecular Diagnosis*, 6: 39-47

Wilson R., Fehrmann F., Laimins L.A. 2005. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*, 79: 6732-6740

Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A.C., Hildesheim A., Jenison S.A. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized

by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *Journal of Virology*, 69: 7743-7753

Yang D.H., Wildeman A.G., Sharom F.J. 2003. Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. *Protein Expression and Purification*, 30: 1-10

Zhang B., Li P., Wang E., Brahma Z., Dunn K.W., Blum J.S., Roman A. 2003. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- $\gamma$ . *Virology*, 310: 100-108

zur Hausen H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Research*, 36: 794

zur Hausen H. 1991. Viruses in human cancer. *Science*, 254: 1167-1173

zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infection – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1288: F55-F78



## 8 ZAHVALA

*Iskrena hvala mentorju, prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med, ker mi je omogočil izvedbo diplomskega dela v svojem laboratoriju, mi predstavil svet znanstvenega raziskovanja, mi pomagal z nasveti in ves čas zaupal vame. Hvala.*

*Hvala tudi so-mentorju, dr. Boštjanu Kocjanu, ki me je usmerjal pri delu, mi strokovno svetoval in posvetil ogromno časa in prizadevanja v izpopolnitev mojega končnega izdelka.*

*Posebna zahvala prof. dr. Katji Seme, dr. med. za recenzijo diplomskega dela, koristne napotke in vse prijazne besede.*

*Zahvaljujem se tudi vsem v Laboratoriju za diagnostiko aidsa in hepatitisov in molekularno mikrobiologijo, ki ste me vseskozi podpirali, me razmeli in na kakršen koli način pomagali. Hvala predvsem Maji Lunar, ki me je naučila prvih laboratorijskih korakov in mi ves čas pomagala.*

*Nenazadnje največja zahvala staršem, sestri in Mihi, za potrpežljivost, skrb in zaupanje. Brez vas mi ne bi uspelo.*