

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ines KMET

**MOLEKULARNA OPREDELITEV IZOLATOV
ČLOVEŠKEGA PAPILOMAVIRUSA HPV-16 IZ
PREDELA GLAVE IN VRATU TER
ANOGENITALNEGA PREDELA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ines KMET

**MOLEKULARNA OPREDELITEV IZOLATOV ČLOVEŠKEGA
PAPILOMAVIRUSA HPV-16 IZ PREDELA GLAVE IN VRATU TER
ANOGENITALNEGA PREDELA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN
PAPILLOMAVIRUS HPV-16 VARIANTS IN HEAD AND NECK AND
ANOGENITAL REGION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za somentorja znan. sod. dr. Boštjana Kocjana in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič Županc.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: znan. sod. dr. Boštjan KOCJAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ines Kmet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 601.4:577.21:606.616-006.6(043.2)
KG	človeški papilomavirusi/podtipske različice HPV-16/rak materničnega vratu/rak glave in vratu/rak analnega kanala/filogenija
AV	KMET, Ines
SA	NARAT, Mojca (mentor)/KOCJAN, Boštjan (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program druge stopnje Biotehnologija
LI	2016
IN	MOLEKULARNA OPREDELITEV ČLOVEŠKEGA PAPILOMAVIRUSA HPV-16 IZ PREDELA GLAVE IN VRATU TER ANOGENITALNEGA PREDELA
TD	Magistrsko delo (Univerzitetni študij - 2. stopnja)
OP	XI, 74, [6] str., 11 pregl., 22 sl., 4 pril., 145 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Človeški papilomavirusi (HPV) so majhni dvovijačni DNK virusi, ki spadajo v družino <i>Papillomaviridae</i> . Različice HPV-16 so med vsemi najbolj raziskane. Visokorizični genotip HPV-16 je etiološko povezan z mnogimi vrstami raka. Najpomembnejši je rak materničnega vratu, kjer se pri 99 % primerov bolnic odkrije DNK človeškega papilomavirusa. Podobno je tudi za raka analnega kanala v 90-100 % odgovoren HPV. Poleg anogenitalnega predela, lahko HPV v 26 % primerov povzroči tudi raka glave in vratu. V raziskovalni nalogi smo želeli molekularno in filogenetsko opredeliti različice HPV-16 izolirane iz anogenitalnega predela ter predela glave in vratu. Različice tega virusa lahko različno interagirajo z genetskimi dejavniki gostitelja, kar lahko vpliva na potek bolezni. Genom HPV je krožna dvovijačna molekula DNK, velika približno 7,9 kbp, sestavljena iz kodirajočega in nekodirajočega območja. Virusna gena kodirajočega območja <i>E6</i> in <i>E7</i> sta med vsemi geni najbolj raziskana, saj sta v rakavih celicah pogosto izražena. Dolgo nekodirajoče področje je prav tako pomembno, saj s pomočjo vezavnih mest za dejavnike prepisovanja, zgodnje virusne promotorje in uravnalne beljakovine uravnava izražanje beljakovin E6 in E7. S pomnoževanjem dolgega nekodirajočega območja ter genov <i>E6</i> in <i>E7</i> smo ugotovili, da sicer obstajajo različice povezane s posamezno regijo, vendar med njimi ni večjih razlik. HPV-16 razdelimo v štiri glavne filogenetske linije A, B, C in D ter 10 podlinij. Večina vključenih izolatov je pripadala evropski liniji, manjši delež (3,4 %) pa ne-evropski. Molekularna in filogenetska opredelitev različic je pomembna za boljše razumevanje nastanka razvoja bolezni ter razvoj cepiv in drugih terapevtskih pristopov pri zdravljenju s HPV povezanih bolezni.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2

DC UDC 601.4:577.21:606.616-006.6(043.2)

CX human papillomaviruses/HPV-16 variants/cervical cancer/head and neck cancer/anal cancer/phylogeny

AU KMET, Ines

AA NARAT, Mojca (supervisor)/KOCJAN, Boštjan (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology

PY 2016

TI MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS HPV-16 VARIANTS IN HEAD AND NECK AND ANOGENITAL REGION

DT M. SC. Thesis (Master Study Programmes)

NO XI, 74, [6] p., 11 tab., 22 fig., 4 ann., 145 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Human Papillomaviruses (HPV) are small double-stranded DNA viruses and belong to *Papillomaviridae* family. HPV-16 variants are one of the most studied among HPV genotypes. High-risk genotype HPV-16 is etiologically associated with several type of cancer. The most important is cervical cancer where 99 % of cases include HPV DNA. Similarly, 90-100 % of anal cancer cases are related to HPV. In addition to anogenital region, HPV infection can also result in 26 % of head and neck cancer cases. In this study we wanted molecularly and phylogenetically characterize the HPV-16 variants isolated from anogenital and head and neck region. HPV-16 variants can differently interact with genetic factors of the host which can result in different disease progression. HPV genome is a circular double stranded DNA molecule about 7,9 kbp long consisting of coding and non-coding region. Viral oncogenes *E6* and *E7* are one of the most studied genes of coding region as they are often expressed in cancer cells. Long control region includes binding sites for transcriptional factors, early viral promoters and regulating proteins and is important as it regulates the expression of E6 and E7 proteins. The amplification of long control region, *E6* and *E7* genomic regions showed that there are some variants associated with specific region but there are no big differences between them. HPV-16 is divided into four main phylogenetic lineages A, B, C and D and into 10 sublineages. Most of the included isolates belonged to the European lineage and a small proportion (3,4 %) belonged to non-European lineages. Molecular and phylogenetic definition of variants is important for better understanding of the disease occurrence and for finding new approaches in treatment of HPV related diseases, meaning the development of vaccines and other therapeutical approaches.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	4
3 PREGLED OBJAV	5
3.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI (HPV)	5
3.2 ZGRADBA HPV.....	5
3.3 STRUKTURA IN ORGANIZACIJA GENOMA.....	6
3.4 RAZVRŠČANJE HPV	10
3.5 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA	11
3.5.1 Produktivna okužba	12
3.5.2 Abortivna okužba	13
3.6 DIAGNOSTIKA	14
3.7 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z VISOKORIZIČNIMI GENOTIPI.....	15
3.7.1 Rak materničnega vratu (RMV)	15
3.7.2 Rak analnega kanala.....	17
3.7.3 Rak glave in vratu.....	18
3.7.4 Druge vrste raka, povzročene s HPV	20
3.8 POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-16.....	20
3.8.1 Dolgotrajnost okužbe.....	21
3.8.2 Predrakave spremembe	22
3.8.3 Rak in histološki podtip.....	22
4 MATERIALI IN METODE	23
4.1 MATERIALI.....	23
4.1.1 Izolati HPV-16	23
4.2 METODE.....	24

4.2.1	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genomskih področij LCR, <i>E6</i> in <i>E7</i> HPV-16.....	24
4.2.2	Sestava reakcijskih mešanic za posamezne reakcije PCR in pogoji pomnoževanja s PCR.....	26
4.2.3	Dokazovanje in analiza pridelkov PCR	28
4.2.4	Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja	29
4.2.5	Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij.....	31
4.2.6	Filogenetska analiza podtipskih različic genomskih področij LCR, <i>E6</i> in <i>E7</i> HPV-16.....	32
4.2.7	Statistična obdelava podatkov	33
5	REZULTATI	34
5.1	PODTIPSE RAZLIČICE	34
5.1.1	Podtipe različice genomskega področja LCR	35
5.1.2	Podtipe različice gena <i>E6</i>	39
5.1.3	Podtipe različice gena <i>E7</i>	41
5.2	FILOGENETSKA ANALIZA.....	43
5.2.1	Povezave genetskih (pod)linij HPV-16 z anatomskim področjem okužbe in značilnimi boleznimi	46
6	RAZPRAVA	47
6.1	ANALIZA GENOMSKEGA PODROČJA LCR.....	49
6.2	ANALIZA GENA <i>E6</i>	50
6.3	ANALIZA GENA <i>E7</i>	53
6.4	FILOGENETSKA ANALIZA REZULTATOV.....	54
7	SKLEPI.....	57
8	POVZETEK	59
9	VIRI	61
9.1	CITIRANI VIRI	61
9.2	DRUGI VIRI.....	73
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vloge beljakovin visokorizičnih HPV (Stanley in sod., 2007: 1457)	9
Preglednica 2: Pregled vključenih izolatov	23
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje genomskih področij LCR, <i>E6</i> in <i>E7</i>	25
Preglednica 4: Kompleti OZ in dolžine pričakovanih pridelkov PCR	26
Preglednica 5: Reakcijska mešanica za pomnoževanje genomskih področij LCR, <i>E6</i> in <i>E7</i>	27
Preglednica 6: Reakcijska mešanica za pol-vgnezdno reakcijo genomskih področij LCR in <i>E6</i>	28
Preglednica 7: Število uspešno pomnoženih genomskih področij LCR, <i>E6</i> ter <i>E7</i> HPV-16 glede na anatomsko lokacijo izolata	34
Preglednica 8: Porazdelitev mutacij T350T in T350G glede na anatomsko regijo	40
Preglednica 9: Porazdelitev mutacij T350T in T350G pri predrakavih in rakavih spremembah ter normalni citologiji materničnega vratu	40
Preglednica 10: Porazdelitev različic A1 in A2 pri predrakavih in rakavih spremembah ter normalni citologiji materničnega vratu	46
Preglednica 11: Porazdelitev različic A1 in A2 glede na anatomsko regijo	46

KAZALO SLIK

Slika 1: (A) Elektronska mikrofografija negativno obarvanih delcev HPV (Doorbar in sod., 2015: 5); (B) Model HPV, ki temelji na elektronski mikroskopiji (Benowitz, 2003: 37).....	5
Slika 2: Shematski prikaz genoma HPV-16. Zgodnji regiji sta označeni z rdečo in zeleno barvo (vključujeta gene <i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>E4</i> , <i>E5</i> ter onkogene <i>E6</i> ter <i>E7</i>). Strukturna gena pozne regije sta označena z rumeno barvo (Doorbar in sod., 2012: 57).....	6
Slika 3: Frekvenca porazdelitve deležev medsebojne podobnosti nukleotidnih zaporedij gena L1 (de Villiers in sod., 2004: 20).....	10
Slika 4: Razvrščanje HPV ter njihov tropizem (prirejeno po Doorbar in sod., 2015: 3).....	11
Slika 5: Potek okužbe s HPV (Kocjan in Poljak, 2011: 45).....	12
Slika 6: Število primerov rakov povezanih s HPV, predstavljenih po anatomskih regijah (Crow, 2012: 3).....	15
Slika 7: Rak materničnega vratu (Sikorsky, 2012).....	16
Slika 8: Shematski prikaz razvoja predrakavih sprememb materničnega vratu (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010: 276).....	17
Slika 9: Rak analnega kanala (Clark in sod., 2004: 152).....	18
Slika 10: Anatomija dihalnih poti (Vaupotič, 2013: 5).....	19
Slika 11: Rak ustnega dela žrela (VNN, 2016).....	20
Slika 12: (A) žlezni karcinom (angl. <i>adenocarcinoma</i>); (B) ploščatocelični karcinom (angl. <i>squamous cell carcinoma</i>) (Wistuba, 2012: 14).....	22
Slika 13: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za pomnoževanje genomske regije LCR.....	26
Slika 14: Spiranje pridelkov PCR iz membranskega filtra s centrifugiranjem (Arrayit corporation, 2016).....	29
Slika 15: Elektroferogram nukleotidnega zaporedja HPV-16, pridobljen z avtomatskim sekvenciranjem.....	31
Slika 16: Multipla poravnava vseh pridobljenih zaporedij z referenčnim zaporedjem HPV-16 (K02718).....	32
Slika 17: Značilne vezavne domene (dejavniki prepisovanja; SP-1, YY1, AP-1, NF-1, vezavno mesto za beljakovino E2 in zaporedje TATA) genomskega področja LCR HPV-16, kjer smo zabeležili nukleotidne zamenjave.....	36

Slika 18: Podtipska različnost genomskega področja LCR (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat).....	37
Slika 19: Podtipska različnost gena <i>E6</i> (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)	41
Slika 20: Podtipska različnost gena <i>E7</i> (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)	42
Slika 21: Filogenetska umestitev izolatov HPV-16.....	44
Slika 22: Filogenetsko drevo izolatov HPV-16.....	45

KAZALO PRILOG

Priloga A: Natančna lokacija tumorjev glave in vratu

Priloga B: Natančna lokacija tumorjev analnega kanala

Priloga C: Spremenjena imena vključenih izolatov

Priloga D: Okrajšave imen aminokislin

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
AIN	analna intraepitelijska neoplazija (angl. <i>anal intraepithelial neoplasia</i>)
bp	bazni par
cdk	od ciklina odvisna kinaza (angl. <i>cyclin-dependent kinase</i>)
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija (angl. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
Da	Dalton
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E	zgodnje območje (angl. <i>early region</i>)
EGF	rastni dejavnik epidermisa (angl. <i>epidermal growth factor</i>)
EV	bradavičasta epidermodisplazija (angl. <i>epidermodysplasia verruciformis</i>)
FFPE	vzorci fiksirani s formalinom in vklopljeni v parafin (angl. <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
HIV	virus humane imunске pomanjkljivosti (angl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HPV	človeški papilomavirus (angl. <i>human papillomavirus</i>)
HSPG	heparan-sulfatni peptidoglikani (angl. <i>heparan sulfate proteoglycan</i>)
L	pozno območje (angl. <i>late region</i>)
LCR	dolgo nekodirajoče področje (angl. <i>long control region</i>)
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (angl. <i>messenger RNA</i>)
obr/min	obrati na minuto
ORF	odprti bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
ori	mesto začetka podvojevanja (angl. <i>origin of replication</i>)
OZ	oligonukleotidni začetnik
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	rastni dejavnik iz trombocitov (angl. <i>platelet derived growth factor</i>)
PDZ	beljakovina PDZ (angl. <i>post synaptic density protein - PSD95, Drosophila disc large tumor supressor- Dlg1 and Zonula occludens-1 protein - zo-1</i>)
pRb	beljakovina retinoblastoma
RMV	rak materničnega vratu
URR	(angl. <i>upstream regulatory region</i>)
V	volt

1 UVOD

Pred približno 40 leti so domnevali, da bi človeški papilomavirusi (HPV) iz družine *Papillomaviridae* lahko imeli etiološko vlogo pri nastanku raka materničnega vratu. Danes je dobro znano, da je ta heterogena družina virusov zelo pomembna in povzroča ne le raka materničnega vratu, ampak tudi znaten delež ostalih rakov anogenitalne regije ter rakov glave in vratu (zur Hausen, 2009). Za odkritje povezave med rakom materničnega vratu in HPV je nemški znanstvenik Harald zur Hausen leta 2008 prejel Nobelovo nagrado za medicino in fiziologijo (Kocjan in Poljak, 2011).

Za zdaj je uradno priznanih in popolnoma opredeljenih že več kot 205 različnih genotipov HPV (International Human Papillomavirus Reference Center, 2016), ki jih delimo v pet rodov: *Alpha*-, *Beta*-, *Gama*-, *Mu*- in *Nupapillomavirus*. Kot nov genotip HPV opredelimo vsak izolat, katerega nukleotidno zaporedje celotnega gena L1 izkazuje manj kot 90 % ujemanje z odprtim bralnim okvirjem (ORF) gena L1 uradno priznanih genotipov HPV. Okužba s t.i. visokorizičnimi genotipi iz rodu *Alphapapillomavirus*, najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18, je tesno povezana z nastankom malignih sprememb ploščatoceličnega epitela v anogenitalnem predelu ter predelu glave in vratu. Rak materničnega vratu (RMV) je, predvsem v manj razvitih državah sveta, drugi najpogostejši rak pri ženskah. Več kot 99 % RMV je povezanih s HPV, od tega je HPV-16 odgovoren za 50-60 % primerov (Li in sod., 2010; Cubie, 2013). Analni kanal je prav tako dovzeten za okužbo s HPV. Med 70-100 % ploščatoceličnih karcinomov analnega kanala je povezanih z okužbo HPV in najpogostejši med njimi je zopet HPV-16, prisoten pri okrog 80 % primerov (Frisch in sod., 1997; Steinau in sod., 2013). Čeprav rak glave in vratu v glavnem povezujejo s kajenjem in uživanjem alkohola, raziskave kažejo, da lahko okužba s HPV prav tako privede do njegovega nastanka (Ringström in sod., 2002; Wong in sod., 2014). Raki glave in vratu se tako delijo na HPV-negativne in HPV-pozitivne. Prisotnost DNK HPV v rakih glave in vratu se lahko razlikuje glede na geografsko regijo, svetovno gledano pa je prisotna pri približno 26 % vseh rakov (D'Souza in sod., 2007). Raziskave navajajo, da je povezava med HPV in rakom glave in vratu najbolj značilna za ustni predel žrela, kjer je HPV (predvsem HPV-16) prisoten v 70 % primerov (D'Souza in sod., 2007; Westra, 2009; Chaturvedi, 2012). HPV med drugim povezujejo tudi z rakom nožnice (60-90 %), rakom ženskega zunanjega spolovila oz. vulve (50 %) in rakom penisa (30-50 %) (Kocjan in Poljak, 2011; Komloš in sod., 2011; Mehanna in sod., 2013; Chi in sod., 2015).

Genom HPV je krožna dvovijačna molekula DNK, velika približno 7,9 kbp, sestavljena iz kodirajočega in nekodirajočega območja. Nekodirajoče območje LCR (angl. *long control region*) ne vsebuje zapisa za virusne beljakovine, ampak zaporedja DNA, ki so pomembna za podvojevanje in prepisovanje virusnega genoma. S pomočjo vezavnih mest za dejavnike prepisovanja, zgodnjimi virusnimi promotorji ter uravnavalnimi beljakovinami, regija LCR vpliva na uravnavanje izražanja virusnih onkogenov *E6* in *E7* (zur Hausen, 1996; Kocjan

in Poljak, 2011; Doorbar in sod., 2012). Med dejavnike prepisovanja genomskega področja LCR spadajo npr. NF-1, AP-1, Oct-1, SP-1, TEF-1, YY1. Kodirajoče območje genoma delimo na zgodnje območje (E) in pozno območje (L). Zgodnje območje vsebuje zapise za beljakovine, pomembne za uravnavanje izražanja virusnih genov in sodelovanje s celičnimi beljakovinami gostitelja, v poznem območju pa najdemo zapisa za veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino. Gena *E6* in *E7* sta med vsemi geni zgodnjega območja najbolj raziskana, saj igrata vodilno vlogo pri onkogenezi novotvorb, katerih nastanek je povezan s HPV (Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E6 tvori degradacijski kompleks E6-E6AP-p53 in s tem vpliva na razgradnjo beljakovine p53. Beljakovina p53 se aktivira pri poškodbah DNK in ustavi celični cikel ali posreduje prehod v celično apoptozo. Odsotnost beljakovine p53 pomeni nadaljevanje celičnega cikla s poškodovano DNK, kar omogoča delitev celic s poškodovano DNA. Beljakovina E6 vsebuje dve področji cinkovih prstov (angl. *zink finger*), ki omogočajo dimerizacijo in pravilno delovanje beljakovine E6 (Liu in sod., 2005; Mischo in sod., 2013). Pri visokorizičnih HPV na beljakovini E6 najdemo tudi vezavna mesta za beljakovine PDZ (angl. *post synaptic density protein* - *PSD95*, *Drosophila disc large tumor supressor*- *Dlg1* and *Zonula occludens-1 protein* - *zo-1*), ki imajo ključno vlogo pri sidranju transmembranskih beljakovin v citosketu in omogočajo stabilnost kompleksov, vpletenih v celično signalizacijo (Thomas in sod., 2008; Lee in Zheng, 2010). Podobno kot pri beljakovini E6, tudi pri beljakovini E7 najdemo področje cinkovih prstov, ki omogoča dimerizacijo in pravilno delovanje beljakovine (Liu in sod., 2005). Beljakovina E7 se veže na tumor zavirajočo beljakovino pRb in sodeluje pri njeni razgradnji. Zaradi motenega delovanja beljakovine pRb se lahko epitelne celice neprekinjeno razmnožujejo (Kocjan in Poljak, 2011). Inaktivacija tumor zavirajočih beljakovin p53 ter pRb s strani HPV je medsebojno povezana in omogoča neovirano škodljivo delovanje različnih karcinogenih dejavnikov in nekontrolirano pospešeno delitev celic s poškodovano DNK, kar lahko vodi do kopičenja različnih sekundarnih mutacij, ki vodijo v nesmrtnost okuženih celic in do njihove maligne preobrazbe.

Znotraj posameznega genotipa HPV obstajajo podtipske različice HPV, ki različno prispevajo k patogenosti virusa. Podtipske različice so posledica sprememb v nukleotidnem zaporedju genoma virusa. Kot novo podtipsko različico opredeljujemo vsako različico, ki se v nukleotidnem zaporedju od referenčnega zaporedja razlikuje vsaj v eni nukleotidni zamenjavi, vstavkom ali izpadom. Izmed vseh različic so podtipske različice HPV-16 so najbolj raziskane. Z molekularno analizo posameznih področij genoma HPV-16 (najpogostejše gena *E6* in nekodirajočega območja LCR), je bilo dokazano, da obstajajo številne podtipske različice, ki se razvrščajo v štiri glavne genetske linije A, B, C in D. Izolate HPV-16 iz podlinije A1-3 opredeljujemo kot evropske (Ev), iz podlinije A4 kot azijske (As), iz podlinij B1-2 kot afriške veja 1 (Af-1), iz podlinije C-1 kot afriške veja 2 (Af-2), medtem ko izolate HPV-16 iz podlinij D1 opredeljujemo kot severno-ameriške (NA) ter D2-3 kot azijsko-ameriške (AA) (Burk in sod., 2013). Različne podlinije so najverjetneje posledica koevolucije virusa z različnimi skupinami narodov in etničnih

skupin. V državah z malo migracij je filogenetska raznolikost HPV-16 majhna, medtem ko je v etnično in geografsko odprtih državah, filogenetska raznolikost velika (Chen in sod., 2005; Bernard in sod., 2006; Cornet in sod., 2012).

V nekaterih raziskavah je bilo ugotovljeno, da v določenih populacijah obstajajo različice HPV-16, ki so značilno povezane z rakom materničnega vratu, z dolgotrajnostjo virusne okužbe ali s ponavljanjem predrakavih sprememb materničnega vratu (Vrtačnik Bokal in sod., 2010; Du in sod., 2012). Patogenetska različenost podtipskih različic naj bi izvirala iz genetskih sprememb (mutacij) v kodirajočih oz. nekodirajočih področjih genoma HPV (Bernard in sod., 2006). V tretji stopnji razvoja tumorja imajo poleg HPV pomembno vlogo tudi dodatne karcinogene snovi, kot so cigaretni dim, UV žarki, obsevanje, najrazličnejši kemijski agensi itd. Ti povzročajo nastanek številnih sprememb človeškega genoma in vodijo v nesmrtnost okuženih celic in do njihove maligne preobrazbe (Kocjan in Poljak, 2011).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V naši raziskovalni nalogi smo želeli molekularno opredeliti podtipske različice slovenskih izolatov HPV-16, osamljenih iz brisov materničnega vratu žensk z normalno citologijo ter iz histološko potrjenih primerov predrakavih sprememb in raka materničnega vratu, raka analnega kanala in raka glave in vratu. Drugi cilj naloge je bil na podlagi molekularno filogenetskih analiz ugotoviti, katerim evolucijskim vejam pripadajo opredeljene podtipske različice izolatov HPV-16. V zadnjem delu naloge pa smo želeli ugotoviti: (i) ali obstajajo HPV-16 podtipske različice, ki so značilno povezane s predelom glave in vratu oz. anogenitalnim področjem in (ii), ali obstajajo podtipske različice HPV-16, ki so značilno povezane s predrakavimi oz. rakavimi spremembami tarčnega epitela.

Pričakovali smo, da bomo odkrili številne podtipske različice genskih področij LCR, *E6* in *E7*, med katerimi bodo nekatere bolj pogoste kot druge. Predpostavili smo, da je genomsko področje LCR izmed vseh treh področij najbolj variabilno ter da je gen *E6* bolj variabilen kot gen *E7*. Predvidevali smo, da si bodo vse različice podobne in bodo pripadale evropski liniji HPV-16. Glede razporeditve podtipskih različic HPV-16 med področjem glave in vratu ter anogenitalnim predelom nismo pričakovali večjih razlik.

3 PREGLED OBJAV

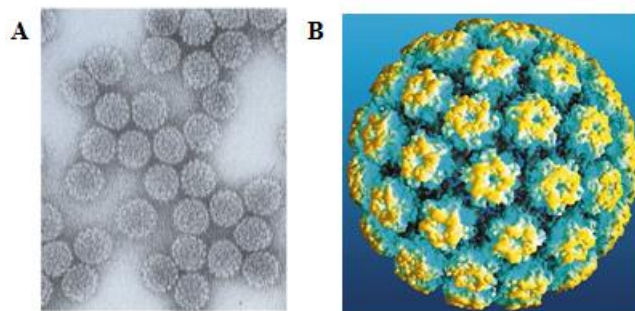
3.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI (HPV)

Človeški papilomavirusi (HPV) spadajo v družino *Papillomaviridae*, ki jo delimo na pet rodov: *Alpha*-, *Beta*-, *Gama*-, *Mu*- in *Nupapillomavirus*. HPV so zelo heterogena skupina virusov, ki jih etiološko povezujemo s številnimi benignimi in malignimi spremembami ploščatoceličnega epitela. Posamezni rodovi HPV izkazujejo tropizem za določeno vrsto epitela (zur Hausen, 1996; de Villiers in sod., 2004).

Človeka lahko okuži na desetine različnih tipov HPV (Crow, 2012). Največji in za človeka klinično najbolj pomemben je rod *Alphapapillomavirus*. Približno 40 genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus* izkazuje tropizem za epitel sluznic in se glede na vrsto novotvorb, ki jih povzročajo, deli na visokorizične in nizkorizične genotipe HPV. Visokorizični genotipi HPV, med katerimi sta najpomembnejša HPV-16 in HPV-18, so odgovorni za nastanek več kot 99 % primerov raka materničnega vratu, 70-100 % rakov analnega kanala, 60-90 % raka nožnice, 50 % raka ženskega zunanega spolovila (vulve), 30-50 % raka penisa ter 70 % raka ustnega dela žrela (Kocjan in Poljak, 2011; Komloš in sod., 2011; Mehanna in sod., 2013).

3.2 ZGRADBA HPV

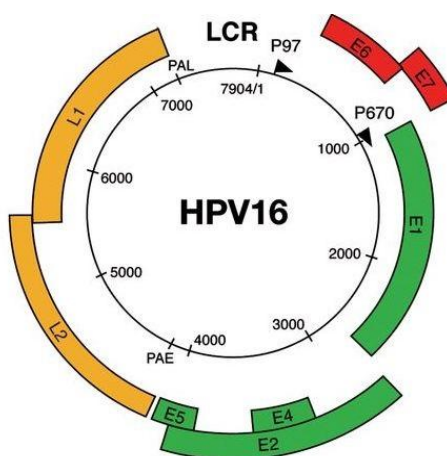
Papilomavirusi so majhni DNK virusi brez ovojnice, ki v premeru merijo približno 55 nm (Slika 1) (Poljak in sod., 2005; Muñoz in sod., 2006). Dedni material je obdan z dvoplastno beljakovinsko sredico, imenovano kapsida. Kapsida je ikozaedrična in sestavljena iz 72 morfoloških enot oz. kapsomer, ki jih sestavljata dva tipa strukturnih beljakovin in sicer velika L1 in mala L2 plaščna beljakovina. Vsaka od 72 kapsomer je sestavljena iz petih beljakovin L1, ki se navzkrižno povežejo z disulfidnimi mostički in ene aksialno vstavljene beljakovine L2, ki pomaga oblikovati in vzdrževati strukturo kapsomere. Velika plaščna beljakovina ima povprečno molekulsko maso 54 kDa in tvori približno 80-90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Ostali del virusnega plašča sestavlja mala plaščna beljakovina z molekulsko maso 74-80 kDa (zur Hausen, 1996; Kocjan in Poljak, 2011).



Slika 1: (A) Elektronska mikrografija negativno obarvanih delcev HPV (Doorbar in sod., 2015: 5); (B) Model HPV, ki temelji na elektronski mikroskopiji (Benowitz, 2003: 37)

3.3 STRUKTURA IN ORGANIZACIJA GENOMA

Virusni genom je zaprta krožna dvovijačna DNK, dolga približno 7,9 kbp. Relativno majhen genom omogoča analizo posameznih nalog genov in interakcij virusnih beljakovin s komponentami gostiteljskih celic. Organiziran je v tri glavne regije: kodirajoče območje, ki ga delimo na zgodnje območje E (angl. *early*) in pozno območje L (angl. *late*) ter nekodirajoče območje LCR (angl. *long control region*) oz. URR (angl. *upstream regulatory region*) (zur Hausen 1996; Chen, 2005; Doorbar, 2006). Območje E vsebuje zapise za beljakovine, ki so pomembne za uravnavanje podvojevanja virusne DNK, uravnavanje izražanja virusnih genov in interakcijo s celičnimi beljakovinami gostitelja. Večina do sedaj opredeljenih genotipov ima najmanj pet različnih genov *E*: *E1*, *E2*, *E4*, *E6* in *E7* (Kocjan in Poljak, 2011). Organizacija genoma HPV je shematsko prikazana na Sliki 2.



Slika 2: Shematski prikaz genoma HPV-16. Zgodnji regiji sta označeni z rdečo in zeleno barvo (vključujeta gene *E1*, *E2*, *E4*, *E5* ter onkogene *E6* ter *E7*). Strukturna gena pozne regije sta označena z rumeno barvo (Doorbar in sod., 2012: 57).

Območje poznega kodirajočega območja genoma L, vsebuje zapisa za strukturni beljakovini virusne kapside L1 in L2, ki se prepisujeta kot bi- in/ali policistronske mRNA iz poznega promotorja, ki se nahaja v genu *E7*. Beljakovina L1 se veže s celičnimi receptorji in je ključna za vstop virusa v celico (Buck in sod., 2013). Predstavlja najbolj imunogeno virusno beljakovino. Formira namreč virusom podobne delce (angl. *virus-like particles*), ki v gostitelju izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki so značilna za posamezen genotip HPV (Kocjan in Poljak, 2011; Wang in Roden, 2013). Beljakovina L1 zaradi te značilnosti služi kot podlaga za dve zelo uspešni cepivi proti raku, ki jih povzročajo HPV (Buck in sod., 2013). Mala plaščna beljakovina L2, je pri posameznih genotipih HPV različna. Sodeluje pri vstopu virusa v celico. Za beljakovino L2 je prav tako značilno, da vsebuje visoko ohranjene epitope, ki v gostitelju izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki ščitijo pred širokim spektrom genotipov HPV. Epitopi so

skriti v notranjosti kapside in se razkrijejo šele ob vezavi kapside na gostiteljsko celico (Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina L2 ima manjši imunogeni potencial kot L1 (Gambhira in sod., 2007).

Uravnavanje izražanja genov je zelo kompleksno in vodeno preko celičnih in virusnih dejavnikov prepisovanja. Dejavniki prepisovanja se vežejo na značilna zaporedja v genomskem področju LCR. Področje LCR se nahaja med genoma *L1* ter *E6* in pokriva okrog 10 % genoma HPV (zur Hausen, 1996). Področje LCR ne vsebuje zapisa za virusne beljakovine, ampak zaporedja DNK pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepisovanja virusnega genoma: mesto *ori*, zgodnje virusne promotorje, vezavna mesta za dejavnike prepisovanja kot so AP-1, YY1, SP-1, NF-1, Oct-1 in TEF-1, ojačevalce in zaviralne uravnalne beljakovine, poliadenilacijska mesta. Vpliva na uravnavanje onkogenov *E6* in *E7*, saj vsebuje štiri vezavna mesta (ACC-N₆-GGT) za beljakovino E2. Pomen drugega nekodirajočega območja, ki se nahaja med genoma E5 in L2, še ni znan (zur Hausen, 1996; Donne in sod., 2010; Kocjan in Poljak, 2011; Vinokurova in von Knebel Doeberitz, 2011).

Virusna beljakovina E1 je pomembna za začetek podvojevanja virusne DNK in vzdrževanje HPV v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev DNK ali episomov. Beljakovina E1 deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo. Veže se na *ori* (angl. *origin of replication*) mesto podvojevanja virusnega genoma v nekodirajočem območju LCR (Poljak in sod., 2005). Poleg gena *L1*, je gen *E1*, pri različnih vrstah HPV, najbolj ohranjen del genoma in predstavlja osnovo za klasifikacijo in raziskave evolucijske sorodnosti med vrstami HPV (zur Hausen, 1996).

Beljakovina E2 igra več vlog pri produktivni okužbi. V bazalnih celicah je beljakovina E2 potrebna za začetek podvojevanja DNK in segregacijo virusnega genoma. V nekodirajočem področju LCR se veže na značilna zaporedja DNK (t.i. *E2 binding sites*) (Doorbar, 2006). Vezava E2 je nujna za pritrditev beljakovine E1 na *ori* mesto, ki v naslednjem koraku veže celične beljakovine, potrebne za podvojevanje virusne DNK. Poleg tega je beljakovina E2 potrebna za pritrditev virusnih episomov na mitotske kromosome in njihovo pravilno segregacijo med celično delitvijo (Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E2 nadzoruje izražanje virusnih onkogenov *E6* in *E7* s tem, da ovira vezavo celičnih dejavnikov prepisovanja SP1 in TFIID na zgodnji promotor p97. V nizkih koncentracijah beljakovina E2 deluje kot prepisovalni aktivator in spodbuja izražanje *E6* in *E7*, medtem ko v visokih koncentracijah deluje kot zaviralec in zavira izražanje *E6* in *E7* (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011).

Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem znana. V času virusnega podvojevanja se akumulira v celici in je v pozni fazi okužbe prisotna v visokih koncentracijah. Beljakovina E4 bi lahko s prekinitvijo normalne celične diferenciacije vzpostavila ugodne pogoje za

zorenje virusa in s tem igrala vlogo pri produktivni okužbi (zur Hausen, 1996). Dosedanje raziskave so pokazale, da se beljakovina E4 veže na citokeratine okuženih celic in na ta način povzroči propad celičnega citoskeleta. Domnevajo, da je porušenje citokeratinske mreže potrebno za lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okuženih celic (Doorbar in sod., 1986; zur Hausen, 1996; Kocjan in Poljak, 2011).

Beljakovina E5 je transmembranska beljakovina, ki se v glavnem nahaja v endoplazmatskem retikulumu (Doorbar, 2006). Z različnimi transmembranskimi beljakovinami tvori komplekse, med drugimi jo povezujejo tudi s protonsko ATP-azo (zur Husen, 1996). Domnevajo, da bi beljakovina E5 lahko sodelovala v začetni stopnji onkogeneze, posredovane s HPV iz rodu *Alphapapillomavirus*. Spodbuja namreč receptorje celičnih rastnih dejavnikov EGF (angl. *epidermal growth factor*) in PDGF (angl. *platlet derived growth factor*) ter na ta način povišuje nivo mitogenih dejavnikov, ki spodbujajo celično proliferacijo. HPV-ju omogoča tudi izmikanje imunskemu odzivu, saj ovira zorenje molekul PHK razreda I. Zapis za to beljakovino manjka pri večini genotipov HPV iz rodov *Beta-*, *Gama-* ter *Mu-* in *Nupapillomavirus* (Kocjan in Poljak, 2011).

Gena *E6* in *E7* sta med vsemi območji genoma najbolj raziskana, saj imata najpomembnejšo vlogo v onkogenezi novotvorb, katerih nastanek povezujejo s HPV. Beljakovini E6 in E7 sta v HPV pozitivnih tumorjih velikokrat izraženi (zur Hausen, 1996). Vplivata na številne celične procese, ki lahko vodijo do maligne transformacije s HPV okuženih celic. Med njimi so najpomembnejši spodbujanje oz. vzdrževanje celične proliferacije, zaviranje zaščitnega delovanja tumor zavirajočih beljakovin ter indukcija celične nesmrtnosti (Poljak in sod., 2005; Kocjan in Poljak, 2011).

Beljakovina E6 je sestavljena iz 158 aminokislin (AK). Vključuje štiri motive Cys-X-X-Cys, ki formirajo dve dobro ohranjeni domeni cinkovih prstov, ki sta pomembni za stabilnost beljakovine. Vsebuje tudi vezavna mesta XX(S/T/Y)X(V/L) za beljakovine PDZ, ki sodelujejo pri sidranju celičnih transmembranskih beljakovin v citoskeletu in omogočajo stabilnost kompleksov vpletenih v celično signalizacijo (Thomas in sod., 2008). Beljakovina E6 ima številne zanimive biološke lastnosti. Na indukcijo celične nesmrtnosti lahko vpliva tudi v odsotnosti beljakovine E7 (zur Hausen, 1996). Ena najbolj raziskanih beljakovin s katerimi je povezana beljakovina E6, je tumor zavirajoča beljakovina p53. Beljakovina p53 je mesto-specifičen dejavnik prepisovanja in je eden ključnih signalnih koordinatorjev kadar je celica izpostavljena genotoksičnemu ali citotoksičnemu stresu. V normalnih pogojih je prisotna v manjši meri in je transkripcijsko neaktivna, poškodba celice prek posttranslacijskih modifikacij pa sproži aktivacijo ter povečanje koncentracije beljakovine p53. Vloga aktivirane p53 je sprožitev poti za popravilo DNK ali celična apoptoza, odvisno od tipa in obsežnosti škode. Beljakovina p53 se prav tako aktivira v primeru nepravilne sinteze DNK, ki jo povzročajo okužbe s HPV (Howie in sod., 2009). Povezovanje beljakovine E6 s p53 in E6AP, prek ubikvitinske poti, je očitno glavni razlog za kromosomsko nestabilnost v celicah okuženih s HPV, kar je eden

glavnih dejavnikov tveganja za napredovanje predrakavih sprememb (zur Hausen, 1996; Doorbar, 2006; Stanley in sod., 2007). Visoko in nizkorizični genotipi različno vplivajo na tumor zavirajočo beljakovino p53. Medtem ko je za visokorizične genotipe dokazano, da povzročijo razgradnjo p53, se nizkorizični genotipi sicer vežejo s p53, vendar niso sposobni povzročiti njene razgradnje. Razgradnja p53 visokorizičnih genotipov tako igra ključno vlogo pri maligni transformaciji celice (Pietsch in Murphy, 2008).

Beljakovina E7 je sestavljena iz 98 AK in vključuje dva motiva Cys-X-X-Cys, oz. eno domeno cinkovih prstov. Beljakovina E7 vsebuje vezavno domeno LXCXE, za beljakovine retinoblastoma (pRb). Afiniteta vezave beljakovine E7 na pRb je pri visokorizičnih HPV približno 100-krat višja kot pri nizkorizičnih tipih. Razlog je verjetno v razliki aminokislinskega zaporedja na mestu 21 (zur Hausen, 1996; Kocjan in Poljak, 2011). Vezava beljakovine E7 na pRb, po ubikvitinski poti s proteasomom 26S, pripelje do proteolitske razgradnje beljakovine pRb. Učinkovitost zaviranja beljakovine je odvisna od koncentracije beljakovine E7 (Poljak in sod., 2005). Beljakovina pRb deluje kot zaviralec družine dejavnikov prepisovanja E2F. Ti so pomembni za prepisovanje (transkripcijo) mnogih gostiteljskih genov, potrebnih za sintezo DNK in nadaljevanje celičnega cikla. Njihova aktivnost upade na koncu mitoze ob ponovni vezavi na defosforilirano beljakovino pRb. Vezava virusne beljakovine E7 na beljakovino pRb povzroči funkcionalno inaktivacijo beljakovine pRb in sprostitev gostiteljskih dejavnikov prepisovanja E2F oz. prehod celičnega cikla iz G1 v S-fazo neodvisno od cdk (angl. *cyclin-dependent kinase*) (zur Hausen, 1996).

Odsotnost ali nepravilno delovanje tumor zavirajočih beljakovin p53 ter pRb je medsebojno povezana in zaradi vezave na beljakovine E6 in E7 HPV omogoča neovirano škodljivo delovanje različnih karcinogenih dejavnikov in nekontrolirano pospešeno delitev celic s poškodovano DNK, kar vodi do kopičenja različnih sekundarnih mutacij in s tem do velike nagnjenosti k maligni transformaciji s HPV okuženih celic (zur Hausen, 1996; Münger in Howley, 2002; Poljak in sod., 2005).

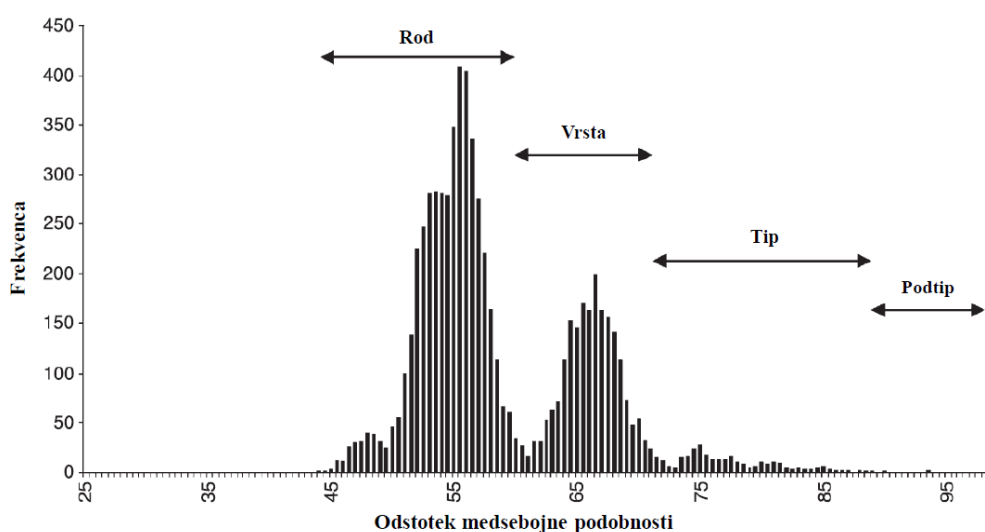
Vloge beljakovin visokorizičnih HPV so povzete v Preglednici 1.

Preglednica 1: Vloge beljakovin visokorizičnih HPV (Stanley in sod., 2007: 1457)

Beljakovine HPV	
ime	vloga
E1	podvojevanje virusnega genoma
E2	podvojevanje virusnega genoma in uravnavanje prepisovanja proteinov E6, E7
E4	interakcija s proteini citoskeleta za izstopanje virusnih delcev
E5	spodbujanje celične proliferacije
E6	onkoprotein, vezava na tumor zavirajočo beljakovino p53
E7	onkoprotein, vezava na protein retinoblastoma pRb
L1	velika plaščna beljakovina
L2	mala plaščna beljakovina

3.4 RAZVRŠČANJE HPV

HPV spadajo v družino *Papillomaviridae*. Razvrščamo jih v pet rodov; *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Mu*- in *Nupapillomavirus* (Slika 4). Za uvrščanje in identifikacijo novih HPV se uporablja najbolj konzervativen gen v genomu, L1 ORF (de Villiers in sod., 2004). Skladnost nukleotidnih zaporedij v celotnem genu L1 je med različnimi rodovi PV manjša kot 60 %. Virusne vrste znotraj posameznega rodu izkazujejo 60-70 % nukleotidno skladnost v genu L1, medtem ko genotipi znotraj posamezne vrste izkazujejo 71-89 % nukleotidno skladnost v genu L1. Za nov tip gre, kadar se sekvence L1 ORF od referenčne sekvence L1 tipa HPV razlikujejo za več kot 10 %. Podtip definirajo razlike od 2-10 % (Slika 3) (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2006).

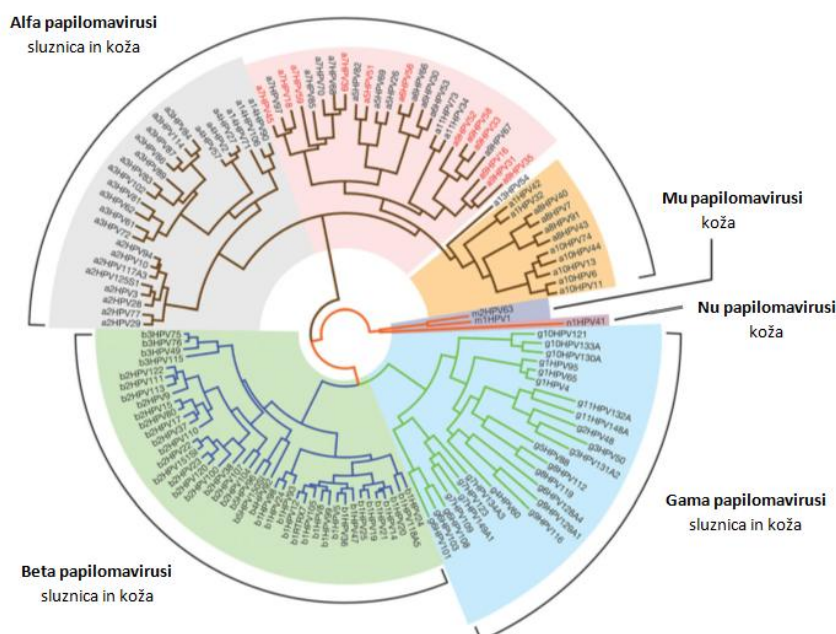


Slika 3: Frekvenca porazdelitve deležev medsebojne podobnosti nukleotidnih zaporedij gena L1 (de Villiers in sod., 2004: 20)

Za večino genotipov HPV, uvrščenih v eno vrsto velja, da imajo podobne biološke lastnosti, to je tropizem za specifična tkiva ali organe ter podoben rakotvorni potencial (Slika 4) (Kocjan in Poljak, 2011).

Rod *Alphapapillomavirus* razdelimo na visokorizične genotipe (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58 in -59), za katere je značilen onkogeni potencial oziroma zmožnost povzročanja maligne preobrazbe ploščatoceličnega epitela, nizkorizične (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81 in -89), katere v glavnem povezujemo z benignimi tvorbami ploščatoceličnega epitela ter genotipe z nejasnim onkogenim potencialom v katere uvrščamo genotipe HPV o katerih ni epidemioloških in bioloških dokazov, ki bi nakazovali stopnjo rizičnosti (HPV-26, -53, -66, -67, -68, -73 in -82) (Bernard in sod., 2010; Cubie, 2013). Rod *Betapapillomavirus* združuje genotipe HPV, povezane z nastankom različnih benignih in malignih novotvorb na koži pri imunsko oslabljenih osebah in pri bolnikih z redko dedno boleznijo, imenovano bradavičasta

epidermodiplazija. Genotipi rodu *Gama*-, *Mu*- in *Nu*papillomavirus povzročajo nastanek različnih benignih novotvorb (Kocjan in Poljak, 2011). Za nekatere genotipe HPV iz rodov *Beta*- in *Gama*papillomavirus je značilen dvojni oz. kožno-sluznični tropizem (Slika 4) (de Villiers in sod., 2004; Cubie, 2013).



Slika 4: Razvrščanje HPV ter njihov tropizem (prirejeno po Doorbar in sod., 2015: 3)

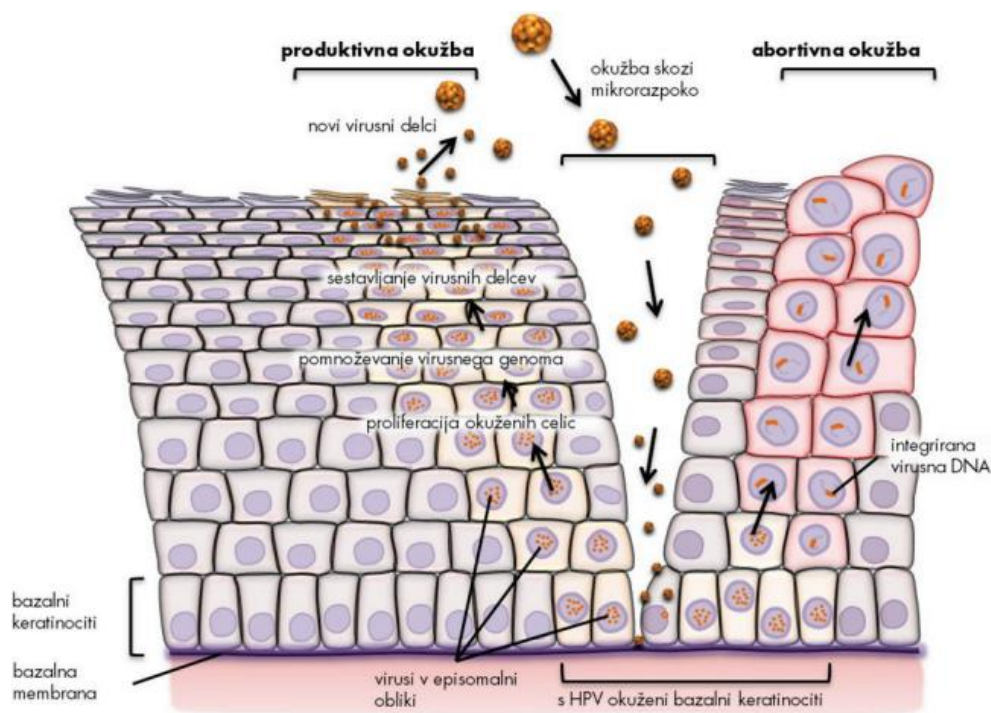
3.5 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA

Cikel razmnoževanja virusa je ključen pri razumevanju patogeneze in imunobiologije HPV vendar, zaradi nezmožnosti gojenja virusov *in vitro*, ni še povsem jasen (Stanley in sod., 2007). Okužba in proces razmnoževanja HPV sta natančno uravnan in odvisna od stopnje dozorevanja epiteljskih celic gostitelja (Schneider, 1994; Stanley in sod., 2007). Prične se z vstopom HPV skozi poškodovani epitel kože ali sluznice, najpogosteje skozi mikroskopsko razpoko v epitelu in z okužbo bazalnih celic večvrstnega ploščatoceličnega epitela (Kocjan in Poljak, 2011). Tarčne celice za HPV so bazalne celice večvrstnega ploščatoceličnega epitela, ki so tudi mesto začetka okužbe s HPV. Domnevajo, da imajo zaradi specifične povezave med HPV in določeno vrsto epitela, samo te celice receptorje za vstop HPV (Poljak in sod., 2005).

V začetni stopnji okužbe pride do vezave virusne plaščne beljakovine L1 na celično vezavno mesto, ki ga predstavljajo receptorji heparin-sulfatni peptidoglikani (HSPG) na bazalni membrani. V nadaljevanju se kapsida prenese do sekundarnega vezavnega mesta, ki je na površini celic in ga prav tako predstavljajo receptorji HSPG. Pri tem pride do konformacijske spremembe in cepitve beljakovine L2, s celičnin encimom furinom. Ti dogodki privedejo do nadaljnjih konformacijskih sprememb v kapsidi, ki vodijo do izpostavitve mest, ki so potrebna za vezavo beljakovine L1 na še nepoznane sekundarne

receptorje, ki sprožijo endocitozo. Po vstopu v celico se potem, najpogosteje preko klatrinsko posredovane endocitoze, virusni delci razgradijo v poznih endosomih in/ali lizosomih. Virusna DNK se potem s pomočjo virusne beljakovine L2 in mikrotubulov, prenese v jedro bazalnih celic. Prepise virusnih genov lahko zaznamo v 12 urah po okužbi (Doorbar, 2006; Doorbar, 2007; Kocjan in Poljak, 2011).

V nadaljevanju okužba s HPV lahko poteka kot produktivna ali nepopolna; abortivna (Slika 5) (Kocjan in Poljak, 2011).



Slika 5: Potek okužbe s HPV (Kocjan in Poljak, 2011: 45)

3.5.1 Produktivna okužba

Pri produktivni okužbi virus uspešno zaključi svoj življenjski krog. V bazalnih epitelijskih celicah se virusna DNK nahaja v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev ali episomov (brez integracije v gostiteljev genom). Za začetek podvojevanja in oddvojitve virusnega genoma (episoma) sta potrebni beljakovini E1 in E2. Bazalne celice z episomi so nosilke latentne okužbe in jih histološko ni mogoče razlikovati od neokuženih celic. Zdi se, da se virusni genom pomnožuje med S-fazo celičnega cikla v kateri pride do podvojevanja gostiteljskih kromosomov. Kmalu po okužbi bazalnih celic se število kopij virusnega genoma, neodvisno od celičnega cikla, poveča na 50 do 100 kopij na celico (Doorbar, 2006; Stanely in sod. 2007; Kocjan in Poljak, 2011). Ko je HPV v bazalnem sloju, je sinteza virusnih beljakovin minimalna. V glavnem se sintetizirata beljakovini E6 in E7 ter minimalna količina beljakovin E1 in E2. Beljakovina E2 v nizkih količinah aktivira

prepisovanje onkogenov *E6* in *E7* (Doorbar, 2006). S pomočjo onkogenov nato HPV ustvari ustrezne pogoje za podvojevanje virusa med potekom diferenciacije okuženih celic v keratinocite. Pridelki zgodnjih virusnih genov *E6* in *E7*, stimulirajo bazalne epitelijske celice k pospešenemu razmnoževanju. V pogojih, kjer HPV ni prisoten, bazalne celice, ki vstopijo v superbazalne epitelne sloje, po določenem številu delitev izstopijo iz celičnega ciklusa in začnejo proces terminalne diferenciacije s ciljem, da vzpostavijo zaščitni keratinski sloj, ki ga normalno zagotavlja koža. Nasprotno se zaradi vpliva beljakovin E6 in E7 s HPV okužene celice suprabazalnega sloja delijo večkrat kot običajno, preden pridejo v višje sloje epitela (Kocjan in Poljak, 2011).

Ob začetku diferenciacije bazalnih celic oziroma ko bazalne celice dozoriijo v spinozne celice, se celični cikel ustavi. Od tu naprej poteka podvojevanje genoma HPV po načinu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle*), tako da v gostiteljskih celicah nastaja veliko kopij virusnega genoma (Poljak in sod., 2005). V naslednji stopnji virusnega življenjskega cikla naraste količina beljakovin E1 in E2, ki so nujne za podvojevanje virusa. Povišana raven beljakovine E2 zavre izražanje virusnih onkogenov *E6* in *E7*, kar zaustavlja proliferacijo epitelnih celic in omogoča njihovo diferenciacijo v keratinocite. Ker je izražanje genov *E6* in *E7* zavrito, se beljakovini E1 in E2 lahko vežeta na značilna zaporedja DNK v območju LCR in aktivirata celične beljakovine oz. mehanizme potrebne za podvojevanje virusne DNK. Ko okuženi keratinociti pridejo v zgornje sloje epitela (*stratum granulosum*) sledi sinteza virusnih beljakovin L1 in L2 potrebnih za sestavljanje virusne kapside. Beljakovina E2 pomaga virusni DNK, da se vključi v virusno kapsido. Nastali virusni delci se potem s pomočjo beljakovine E4 sproščajo iz celice in so sposobni okužiti sosednje celice. Zaradi razmnoževanja HPV nastanejo v povrhnjih epitelijskih celicah za HPV značilne morfološke spremembe, imenovane koliocitoza (zur Hausen, 1996; zur Hausen, 2002; Poljak in sod., 2005; Doorbar, 2006; Doorbar in sod., 2015).

3.5.2 Abortivna okužba

Po obdobju aktivnega virusnega pomnoževanja, v večini primerov s pomočjo celično-posredovanega imunskega odziva pride do odstranitve virusa iz gostiteljskih celic. Za abortivno okužbo gre, kadar virus ne more uspešno zaključiti svojega življenjskega cikla ali še huje, pri tem povzroča nastanek malignih sprememb. Rak materničnega vratu se razvije po različnih stopnjah predrakavih sprememb ploščatega epitela; cervikalne neoplazije 1.stopnje (CIN1), 2. stopnje (CIN2) in 3. stopnje (CIN3) (Kocjan in Poljak, 2011).

Molekularni model karcinogeneze, posredovane z visokorizičnimi genotipi HPV opisuje nastanek malignih novotvorb v treh stopnjah, pri čemer kot vzorčni tumor služi RMV. V prvi stopnji HPV okuži bazalne celice ploščatoceličnega epitela. V drugi stopnji, ki je ključna pri nastajanju raka, pride do integracije DNK virusa v genom gostiteljske celice.

Do vključevanja virusne DNK pride v primeru dolgotrajne okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV (največ HPV-16 ter HPV-18), izjemno redkeje pa tudi z nizkorizičnimi genotipi HPV (npr. HPV-6 ter HPV-11) (Kocjan in Poljak, 2011). Integrirana virusna DNK je prisotna pri večini invazivnih rakov, prav tako jo lahko najdemo tudi pri delu predrakavih sprememb CIN1, kar nakazuje, da se integracija odvija že v začetnih fazah bolezni (Peitsaro in sod., 2002; Doorbar, 2006). Integracija virusne DNK pomeni prekinitev krožnega virusnega genoma na področju zapisa za beljakovino E2, kar vodi do izgube njene biološke vloge. Ker je beljakovina E2 je odgovorna za zaviranje prepisovanja zgodnjih virusnih genov *E6* in *E7*, je rezultat njene izgube nekontrolirano izražanje oz. kopičenje beljakovin E6 in E7 in posledično neomejeno oz. nekontrolirano razmnoževanje epitelnih celic. Te celice izkazujejo povečano genomsko nestabilnost in imajo zato večjo verjetnost za nastanek sekundarnih genetskih nepravilnosti in s tem napredovanje bolezni (Stanley in sod., 2007). Beljakovini E6 in E7 se vežeta na celični tumor zavirajoči beljakovini p53 in pRb in s pomočjo ubikvitina odvisnim sistemom proteaz sodelujeta pri njihovi razgradnji. Beljakovina p53 sodeluje pri uravnavanju izražanja celičnih beljakovin, ki nadzorujejo prehod celičnega cikla iz faze G1 v S, ter sprožitev apoptoze ob nepopravljivi poškodbi celičnega genoma. Beljakovina pRb deluje kot zaviralec družine dejavnikov prepisovanja E2F. Ti imajo ključno vlogo pri aktivaciji genov, potrebnih za sintezo DNK in stimulaciji vstopa celice v fazo S celičnega cikla. Zaradi motenega delovanja beljakovin p53 in pRb se epitelne celice neprekinjeno razmnožujejo, kar lahko vodi v njihovo maligno preobrazbo (Stanley in sod., 2007; Kocjan in Poljak, 2011; Doorbar in sod., 2012).

V tretji stopnji razvoja tumorja imajo poleg HPV pomembno vlogo tudi dodatne karcinogene snovi, kot so cigaretni dim, UV žarki, obsevanje, najrazličnejši kemijski agensi itd. Ti povzročajo nastanek številnih sprememb človeškega genoma in vodijo v nesmrtnost okuženih celic in do njihove maligne preobrazbe (Kocjan in Poljak, 2011).

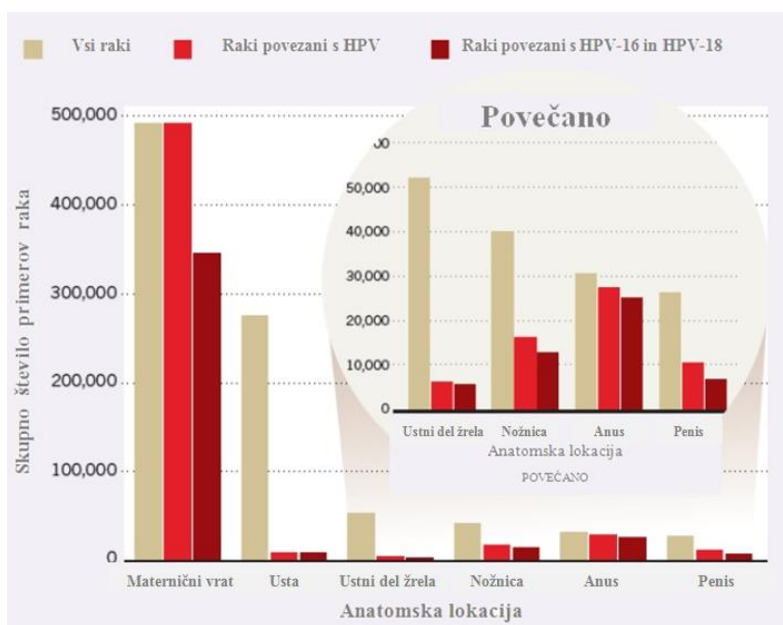
3.6 DIAGNOSTIKA

V zadnjih letih so razvili številne metode za dokazovanje HPV. Delimo jih na tradicionalne in molekularne metode. Tradicionalne metode temeljijo na opazovanju citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom, opazovanju virusnih delcev s pomočjo elektronskega mikroskopa ali dokazovanju virusnih strukturnih beljakovin z uporabo poliklonskih protiteles z imunohistokemično metodo. Danes HPV dokazujemo skorajda izključno z molekularnimi metodami. Tradicionalne metode niso dovolj občutljive in zato z njimi ne moremo opraviti genotipizacije HPV. Raziskave so namreč pokazale, da nekateri genotipi v primerjavi z ostalimi predstavljajo bistveno višje tveganje za nastanek predrakavih in rakavih sprememb in zaradi tega zahtevajo drugačen klinični pristop. Molekularne metode temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusne DNA. Molekularne metode, ki jih uporabljamo za rutinsko dokazovanje HPV, delimo na

hibridizacijske metode, kjer HPV dokazujemo z RNA- in DNA-lovkami in na metode, s katerimi pomnožujemo značilna kratka zaporedja virusnega genoma. Med hibridizacijske metode npr. spada hibridizacija po Southernu, *dot-blot* hibridizacija, *in situ* hibridizacija, tekočinska hibridizacija. Metode pomnoževanja nukleinskih kislin pa vključujejo verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in NASBA (Haedicke in Iftner, 2016), ter določanje nukleotidnega zaporedja (Poljak in sod., 2005; Kocjan in Poljak, 2011).

3.7 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z VISOKORIZIČNIMI GENOTIPI

Okužba s HPV se šteje za najbolj pogosto spolno prenosljivo okužbo. Največkrat je povezana z nastankom RMV, vendar igra etiološko vlogo tudi pri drugih oblikah raka (Slika 6). Ocenjujejo, da je 75 % spolno aktivnih moških in žensk okuženih s HPV (Smith in sod., 2008).



Slika 6: Število primerov rakov povezanih s HPV, predstavljenih po anatomskih regijah (Crow, 2012: 3)

3.7.1 Rak materničnega vratu (RMV)

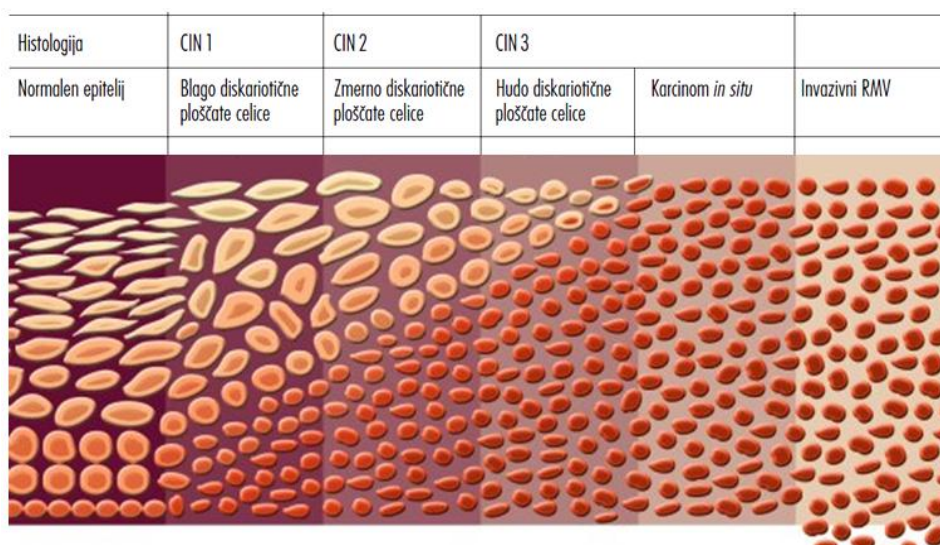
Rak materničnega vratu je v manj razvitih državah za rakom dojke drugi najpogostejši rak pri ženskah (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Razvije se preko več stopenj predrakavih sprememb in ga je z učinkovitim presejalnim programom mogoče preprečiti oz. z odkritjem v zgodnjem stadiju uspešno zdraviti. Za nastanek RMV je nujno potrebna dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Več kot 99 % RMV vsebuje DNK HPV (Li in sod., 2010; Cubie, 2013). Genotipi, povezani z RMV, so običajno HPV-16, -18, -53, -33, -45, -31, -52, -35, -59, -39, -51 in -56. HPV-16 je odgovoren za 50-60 % RMV, skupaj z HPV-18 od 60-80 % (Li in sod., 2010; Cubie, 2013). Pri slovenskih ženskah sta najpogostejša genotipa, HPV-16 in HPV-18, prisotna v

77,1 % primerov RMV (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Kot dejavniki tveganja za RMV se v literaturi pojavljajo še: večje število spolnih partnerjev, pogosti spolni odnosi, zgodnji začetek spolne aktivnosti, uporaba hormonske kontracepcije, kajenje in imunski status osebe (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010; Kocjan in Poljak, 2011; Cubie, 2013).



Slika 7: Rak materničnega vratu (Sikorsky, 2012)

RMV je maligna preobrazba celic na nožničnem delu materničnega vratu, v področju transformacijske cone med ploščatim in žleznim epitelom (Slika 7) (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). HPV lahko okužijo celoten genitalni epitel, vendar je maternični vrat še posebej podvržen rakavim spremembam (Schiffman in Wentzensen, 2013). Zaradi počasnega razvoja preko več stopenj predrakavih sprememb, je RMV eden redkih primerov raka, ki ga lahko z učinkovitim presejalnim programom preprečimo. Redni preventivni pregledi nam omogočijo, da ga odkrijemo v zgodnjem stadiju, ko je kirurško zdravljenje še uspešno (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Predrakave spremembe (cervikalne intraepitelijske neoplazije CIN) razdelimo glede na obseg spremenjenega epitela (Slika 8). Pri CIN1 te spremembe obsegajo tretjino debeline epitela, pri CIN2 dve tretjini in pri CIN3 celotno debelino epitela (Kocjan in Poljak, 2011; Schiffman in Wentzensen, 2013). Večina okužb s HPV je prehodnih in izzveni v 6-12 mesecih, 5-10 % okužb pa je dolgotrajnih in napreduje v predrakave in rakave spremembe (Schiffman in sod., 2007; Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010; Kocjan in Poljak, 2011). Če predrakavih sprememb ne zdravimo, ocenjujejo da približno 20 % CIN1 napreduje v CIN2, okrog 30 % teh lezij napreduje v CIN3. Okrog 40 % vseh CIN3 se potem razvije v RMV (Doorbar, 2006).



Slika 8: Shematski prikaz razvoja predrakavih sprememb materničnega vratu (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010: 276)

RMV je svetovno gledano četrti najbolj pogost rak pri ženskah in sedmi nasploh. Pojavnost RMV se po svetu razlikuje (Crow, 2012). V letu 2012 je za to vrsto raka zbolelo okrog 528.000 žensk, okrog 85 % od teh v slabše razvitih delih sveta. Na svetovni ravni je bil v letu 2012 RMV odgovoren za približno 266.000 smrti (Globocan 2012, 2016).

Rak materničnega vratu v Sloveniji spada med redkeje prisotna rakava obolenja. Predstavlja približno 1,5 % vseh na novo odkritih primerov raka v Sloveniji (Onkološki inštitut Ljubljana, 2016). V letih 2007 do 2011 je v Sloveniji v povprečju zbolelo 140 žensk na leto. Preživelost je v istem obdobju znašala 71 % (Rak v Sloveniji 2011, 2015).

3.7.2 Rak analnega kanala

Podobno kot maternični vrat, je tudi analni kanal predel, ki je še posebej dovzeten za okužbo s HPV in sočasno tveganje za predrakave spremembe. Danes je dobro znano, da HPV igra osrednjo vlogo v patogenezi anogenitalnih primerov raka (Slika 9) (Bjerge in sod., 2002). Med 70-100 % ploščatoceličnih karcinomov anusa je povezanih z okužbo HPV, med katerimi sta najpogostejše prisotna visokorizična genotipa HPV-16 in HPV-18 (Shvetsov in sod., 2009; Komloš in sod., 2011; Alemany in sod., 2015). HPV-16 je odgovoren za okrog 80 % primerov analnih rakov (Frisch in sod., 1997; Steinau in sod., 2013). Drugi genotipi povezani z nastankom analnega raka so tudi: HPV-31, 33, 45 (Hoots in sod., 2009). Rak analnega kanala je bolezen, ki počasi napreduje (Hoots in sod., 2009). Večina (87 %) okužb analnega kanala s HPV izzveni v enem letu (Shvetsov in sod., 2009). Podobno kot za RMV, so tudi za raka analnega kanala značilne predrakave spremembe (analne intraepitelijske neoplazije AIN), ki jih tako kot pri RMV, glede na obseg spremenjenega epitela lahko razdelimo na več stopenj (Hoots in sod., 2009). Pri AIN1 te spremembe obsegajo tretjino debeline epitela, pri AIN2 dve tretjini in pri AIN3 celotno

debelino epitela. Stopnji AIN1 in AIN2, lahko spontano degradirata ali napredujeta v stopnjo AIN3, iz katere se pri približno 10 % lahko razvije invazivni karcinom (Oblak in sod., 2013).



Slika 9: Rak analnega kanala (Clark in sod., 2004: 152)

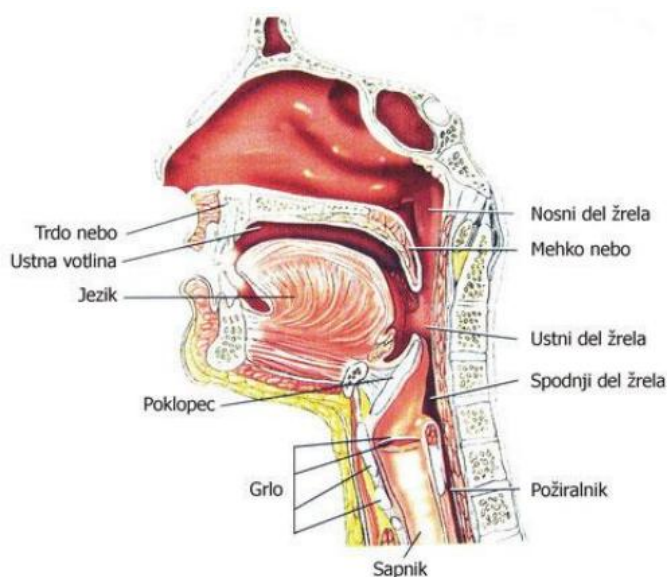
Kljub temu, da je analni rak relativno redka bolezen, se število primerov v zadnjih letih povečuje, predvsem pri moških, ki imajo spolne odnose z drugimi moškimi in HIV pozitivnimi osebami. Pri teh skupinah ljudi je pojavnost analnega raka kar 3-krat večja kot največja zabeležena pojavnost RMV (Bjerge in sod., 2002; Stanley in sod., 2012; Alemany in sod., 2015). Tudi pri ženskah starejših od 50 let opazajo večjo pojavnost analnega raka. Prav tako so ženske z rakavimi in predrakavimi spremembami materničnega vratu bolj podvržene raku analnega kanala (Jemal in sod., 2013).

V Sloveniji je v letu 2011, 16 (5 moških in 11 žensk) oseb zbolelo za rakom anusa in analnega kanala, v istem letu jih je 7 (3 moški in 4 ženske) umrlo (Rak v Sloveniji 2011, 2015). Drugi dejavniki, povezani z analnim rakom, so v splošnem podobni vsem drugim HPV okužbam, kjer največjo vlogo igra kajenje. Ostali faktorji tveganja so analni spolni odnosi, število spolnih partnerjev, imunski status osebe, genetsko okolje in dolgotrajna uporaba hormonske kontracepcije.

3.7.3 Rak glave in vratu

Rak glave in vratu je bolezen, ki jo v veliki meri lahko pripišemo okoljskim dejavnikom. Kajenje in uživanje alkohola sta znana dejavnika tveganja za nastanek te vrste raka. Kljub temu pa se majhen delež rakov glave in vratu pojavi pri nekadilcih in tistih, ki ne uživajo alkohola, kar nakazuje prisotnost drugih faktorjev tveganja (Ringström in sod., 2002; Wong in sod., 2014). Raziskave so pokazale, da okužba s HPV lahko privede do nastanka raka glave in vratu. Visokorizična tipa HPV-16 in HPV-18 sta največkrat prisotna tipa HPV in se pojavita pri več kot 90-95 % vseh HPV-pozitivnih tumorjev (Gillison in sod., 2000; Anantharaman in sod., 2013; Ankola in sod., 2013). Primeri raka glave in vratu sestavljajo anatomsko zelo heterogeno skupino in največkrat izhajajo iz ustne votline, žrela, grla in požiralnika (Slika 10) (Cardesa in Nadal, 2011). Od vseh lokacij so keratinociti ustnega dela žrela, najbolj dovzetni za nastanek raka povezanega s HPV (Slika

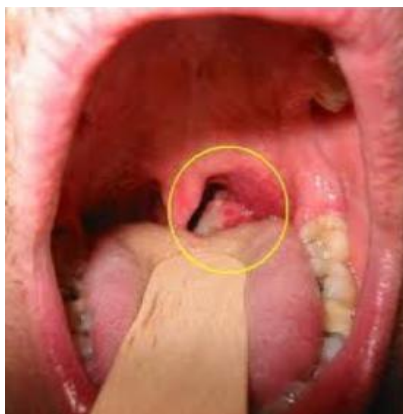
11). Nekateri navajajo, da prav zaradi podobnosti z materničnim vratom oz. enostavnim dostopom za okužbo s HPV (Chi in sod., 2015).



Slika 10: Anatomija dihalnih poti (Vaupotič, 2013: 5)

Nedavni trendi kažejo porast pojavnosti raka ustnega dela žrela, predvsem HPV-pozitivnih tumorjev (McIlwain in sod., 2014). Genotip HPV-16 je prisoten pri okoli 70-90 % rakov ustnega dela žrela (Westra, 2009; Nichols in sod., 2013). Delež HPV-pozitivnih tumorjev ustnega dela žrela se razlikuje tudi glede na geografsko regijo. Najvišji delež, je značilen za Severno Ameriko, najnižji pa za Južno in Srednjo Ameriko. Razloge za razlike v deležih je zaradi vpliva več faktorjev težko določiti, vendar je ključni razlog najverjetneje kajenje oz. uporaba tobaka (Mehanna in sod., 2013; Chi in sod., 2015).

Raki glave in vratu se tako delijo na HPV-negativne ter HPV-pozitivne in se pojavijo v predelih glave in vratu, ki so prekriti s sluznico. HPV-pozitivni raki se z biološkega in kliničnega vidika vse bolj prepoznavajo kot posebno podskupino rakov glave in vratu (Westra, 2009). Za HPV-pozitivne tumorje je značilna slabša diferenciranost, povečanje bezgavk v predelu vratu in možnost prenosa okužbe s spolnimi odnosi. Rak ustnega dela žrela vpliva na dve populaciji bolnikov z različno splošno prognozo. HPV-pozitivni tumorji prizadenejo predvsem mlade nekadilce višjega ekonomskega statusa in paciente z večjim številom spolnih partnerjev. HPV-negativni tumorji pa so največkrat značilni za starejše paciente, ki pogosto kadijo in uživajo alkohol (McIlwain in sod., 2014). Prisotnost HPV in kajenje sta najmočnejša pokazatelja stopnje preživetja pri bolnikih z rakom ustnega dela žrela. Bolniki s HPV-pozitivnimi tumorji imajo namreč višjo stopnjo preživetja, saj se bolje odzivajo na zdravljenje s kemoterapijo in terapijo z radioaktivnim sevanjem, prav tako se HPV-pozitivni tumorji ustnega dela žrela redkeje ponavljajo in širijo na druge predele telesa (Strojan in sod., 2015).



Slika 11: Rak ustnega dela žrela (VNN, 2016)

Rak glave in vratu v Sloveniji predstavlja približno 5 % vseh primerov rakov in se glede na svojo pogostost pojavljanja uvršča na šesto mesto (Onkološki inštitut Ljubljana, 2016). Rak glave in vratu se kar trikrat pogosteje pojavi pri moških kot pri ženskah. V Sloveniji je leta 2011 za rakom ustnega dela žrela zbolelo 45 oseb (39 moških in 6 žensk) umrlo pa 63 oseb (56 moških in 7 žensk) (Rak v Sloveniji 2011, 2015).

3.7.4 Druge vrste raka, povzročene s HPV

Okužba s HPV lahko vodi tudi do raka drugih predelov telesa (Crow, 2012). Poleg RMV visokorizični genotipi (največkrat HPV-16) povzročajo 60-90 % raka nožnice, 50 % raka ženskega zunanjega spolovila (vulve) in 30-50 % raka penisa (Kocjan in Poljak, 2011). Kljub temu, so raki zunanjega spolovila, nožnice in penisa redki. To je najverjetneje zato ker v primerjavi z materničnim vratom in analnim kanalom nimajo celične transformacijske cone (Cubie, 2013). V Sloveniji je bilo v letu 2011 za rakom zunanjega spolovila zbolelo 41 žensk, za rakom nožnice 9 žensk in za rakom penisa 9 moških. V istem letu je za rakom zunanjega spolovila umrlo 21 žensk, za rakom nožnice 4 ženske in za rakom penisa 4 moški (Rak v Sloveniji 2011, 2015). O prisotnosti HPV, v omenjenih vrstah raka, v Sloveniji, do sedaj ni bilo izvedene nobene raziskave.

3.8 POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-16

Zaradi točkastih mutacij, delecij ter insercij se genom HPV spreminja. Mutacije so naključne, vendar se lahko s pomočjo pozitivne selekcije v neki populaciji obdržijo. Določene različice HPV so tako pogosto značilne za določeno etnično skupino (Bernard in sod., 2006).

Za raziskovanje patogenetskega potenciala podtipskih različic HPV, obstajajo različni pristopi. Med njimi so najpogostejše prevalenčne raziskave. Z njimi primerjamo pogostost določenih molekularno opredeljenih podtipskih različic izbranega genotipa pri različnih ciljnih skupinah kot so npr. bolnice z različnimi predrakavimi stopnjami materničnega

vratu. Kompleksnejše raziskave lahko vključujejo *in-vitro* poskuse, kjer raziskujemo interakcijo virusnih beljakovin z izbranimi celičnim beljakovinami (npr. E6 in p53) ali citopatski efekt virusnega razmnoževanja v celičnih linijah.

Podtipske različice genotipa HPV-16 so najbolj celostno opredeljene in raziskane. Z molekularno analizo posameznih področij genoma HPV-16 (najpogostejše gena *E6* in nekodirajočega območja LCR) je bilo dokazano, da obstajajo številne podtipske različice ki jih delimo na štiri genetske linije (A, B, C in D) in 10 podlinij (A1-4, B1 in 2, C1 in D1-3). Izolate HPV-16 iz podlinije A1-3 opredeljujemo kot evropske (Ev), iz podlinije A4 kot azijske (As), iz podlinij B1-2 kot afriške veja 1 (Af-1), iz podlinije C-1 kot afriške veja 2 (Af-2), medtem ko izolate HPV-16 iz podlinij D1 opredeljujemo kot severno-ameriške (NA) ter D2-3 kot azijsko-ameriške (AA) (Burk in sod., 2013). Različice so najverjetneje posledica koevolucije virusa z različnimi skupinami narodov in etničnih skupin (Chen in sod., 2005; Bernard in sod., 2006; Cornet in sod., 2012). V državah z malo migracij je filogenetska raznolikost HPV-16 majhna, v glavnem sestavljena iz "domaćih" različic, ki pripadajo eni veji (npr. evropski) nasprotno pa v državah z veliko migracijami npr. Severna, Srednja in Južna Amerika opazimo več genetskih linij oz. podlinij HPV-16 (Bernard in sod., 2006).

Čeprav lahko vse različice HPV-16 povzročajo raka, se predvideva, da imajo nekatere v primerjavi z drugimi višji onkogeni potencial (Hildesheim in sod., 2001; Schiffman in sod., 2010; Vrtačnik Bokal in sod., 2010; Sichero in sod., 2012). Prav tako obstaja povezava med specifičnimi HPV-16 različicami in nekaterimi etničnimi skupinami (Bernard in sod., 2006; Xi in sod., 2006). Razlike med različicami se lahko kažejo v bioloških značilnostih ter v imunskem odzivu gostitelja. Mutacije genov *E6* in *E7* lahko vplivajo na različno afiniteto beljakovin E6 in E7 do celičnih tumor zavirajočih beljakovin p53 ter pRb in s tem posledično na patogenost virusa (Stöppler in sod., 1996). Mutacije v nukleotidnem zaporedju v regiji LCR lahko različno vplivajo na izražanje virusnih genov oz. beljakovin. Genomsko področje LCR vsebuje vezavna mesta za uravnavno beljakovino E2 in dejavnike prepisovanja za uravnavanje izražanja virusnih onkogenov *E6* in *E7*. Mutacije na tem področju imajo lahko pomembno vlogo pri tumorigenezi (Stephen in sod., 2000). Analiziranje patogenih efektov različic HPV je zaradi interakcij virusa in gostitelja ter različne razporeditve različic v različnih populacijah in regijah izredno zapleteno. Vpliv različic zelo težko kategorično razdelimo. Kljub temu raziskave kažejo, da nekatere različice HPV-16 lahko vplivajo na dolgotrajnost, napredovanje v predrakave in rakave spremembe ter histološki tip RMV.

3.8.1 Dolgotrajnost okužbe

Evropske različice HPV-16 so bolj pogoste pri ženskah bele (kavkazijske) rase, medtem ko so afriške različice bolj pogoste pri ženskah afriško-ameriške rase. Evropske različice so

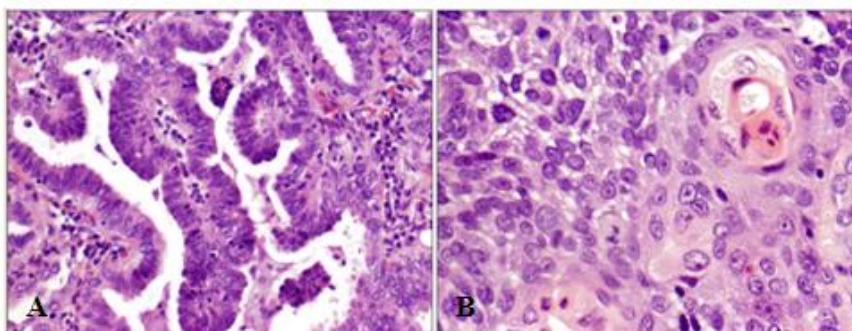
pri ženskah bele rase bolj dolgotrajne v primerjavi z afriškimi različicami, obratno pa so pri afriško ameriških ženskah bolj dolgotrajne afriške različice. Razvoj človeka in HPV je potekal istočasno. Dolgotrajnost okužbe HPV je tako višja v primeru, da imata z gostiteljem skupno geografsko ozadje (Xi in sod., 2006). Vpliv ne-evropskih različic na dolgotrajnost okužbe je v primerjavi z evropskimi različicami 2-krat večji, vendar je potrebno upoštevati tudi interakcije med genomom virusa in gostitelja (Villa in sod., 2000; Schiffman in sod., 2010). Med evropskimi populacijami, kjer prevladujejo evropske različice HPV-16, mutacija na mestu 350G lahko predstavlja 2-krat višje tveganje za dolgotrajnost okužbe (Vrtačnik Bokal in sod., 2010; Gheit in sod., 2011; Cornet in sod., 2013; Matsumoto in Yoshikawa, 2013).

3.8.2 Predrakave spremembe

Večina študij omenja, da imajo ne-evropske različice (podlinije B, C, D) večji onkogeni potencial kot evropske različice (podlinija A) (Villa in sod., 2000; Sichero in sod., 2007; Xi in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Burk in sod., 2013; Freitas in sod., 2014). Ne-evropske linije v primerjavi z evropskimi predstavljajo 2 do 4-krat večjo nevarnost za nastanek predrakavih sprememb (Hildesheim in sod., 2001; Sichero in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010).

3.8.3 Rak in histološki podtip

Obstaja tudi povezava med različico HPV-16 in histološkim podtipom raka. Azijsko-ameriško različico (podlinija D) v primerjavi z evropsko različico večkrat povezujejo z žleznim karcinomom (angl. *adenocarcinoma*) kot ploščatoceličnim karcinomom (angl. *squamous cell carcinoma*) (Slika 12) (Berumen in sod., 2001; Burk in sod., 2003; Zuna in sod., 2011).



Slika 12: (A) žlezni karcinom (angl. *adenocarcinoma*); (B) ploščatocelični karcinom (angl. *squamous cell carcinoma*) (Wistuba, 2012: 14)

Različice genoma se tako lahko uporabljajo kot označevalec za specifične genome HPV v različnih epidemioloških in etioloških študijah (Bernard in sod., 2006).

4 MATERIALI IN METODE

4.1 MATERIALI

4.1.1 Izolati HPV-16

V raziskavo smo vključili 205 slovenskih izolatov HPV-16 iz arhivske zbirke Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Od tega je bilo 53 izolatov HPV-16 osamljenih iz brisov materničnega vratu z normalno citologijo, 25 iz brisov predrakavih sprememb materničnega vratu stopnje 3 (CIN3), 62 iz brisov ali tkivnih vzorcev karcinoma materničnega vratu, 26 iz tkivnih vzorcev karcinoma glave in vratu in 39 iz tkivnih vzorcev karcinoma analnega kanala. Natančne anatomske lokacije tumorjev so prikazane v Prilogah A in B. Klinični vzorci so bili zbrani v okviru preteklih oz. še potekajočih raziskav naše raziskovalne skupine (Pregl. 2), v skladu s Helsinško deklaracijo. Uporaba kliničnih vzorcev v raziskovalne namene je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (številke odobritev: 34/11/06, 45/04/07 in 109/08/12). Arhivske tkivne vzorce smo pridobili iz histopatološkega arhiva Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, prav tako v okviru naših preteklih raziskav. Vsi arhivski vzorci so bili označeni s kodami, tako so bili raziskovalcem dostopni le podatki o spolu, starosti in klinični diagnozi bolnikov. Izolati HPV-16 glave in vratu ter analnega predela so bili osamljeni iz tkivnih vzorcev karcinomov fiksiranih s formalinom in vklopljenih v parafin (arhivski vzorci). Imena izolatov smo zaradi lažjega razumevanja poenostavili tako, da je iz poimenovanja razvidno bolezensko stanje in anatomska regija izolata. Preglednica, ki vključuje izvorna in spremenjena imena kliničnih vzorcev oz. virusnih izolatov je vključena v Prilogi C.

Preglednica 2: Pregled vključenih izolatov

Anatomska regija	Bolezensko stanje	Vrsta vzorca	Število vzorcev	Odstotek (%)	Reference
Glava in vrat	Rak	FFPE*	26	12,68	Strojan in sod., 2015
Analni kanal	Rak	FFPE*	39	19,02	Komloš in sod., 2011
Maternični vrat	Rak	bris ali sveže tkivo	62	30,24	Jančar in sod., 2009
	Predrakave spremembe CIN3	bris MV	25	12,20	Kovanda in sod., 2009
	Normalna citologija	bris MV	53	25,85	Poljak in sod., 2011

*vzorci fiksirani s formalinom in vklopljeni v parafin (angl. *formalin-fixed paraffin-embedded*)

4.2 METODE

Podtipsko različnost izolatov HPV-16 smo določali z metodo neposrednega določanja nukleotidnih zaporedij izbranih genomskih področij in njihovo primerjavo z referenčnim zaporedjem HPV-16 (K02718), dostopnim v genskih bankah EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) in NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kot novo podtipsko različico HPV-16 smo opredelili vsak izolat katerega zaporedje LCR, *E6* in *E7* se je od referenčnega razlikovalo za najmanj eno točkasto mutacijo oz. nukleotidni vstavek/izpad v izbranem genomskem področju.

4.2.1 Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genomskih področij LCR, *E6* in *E7* HPV-16

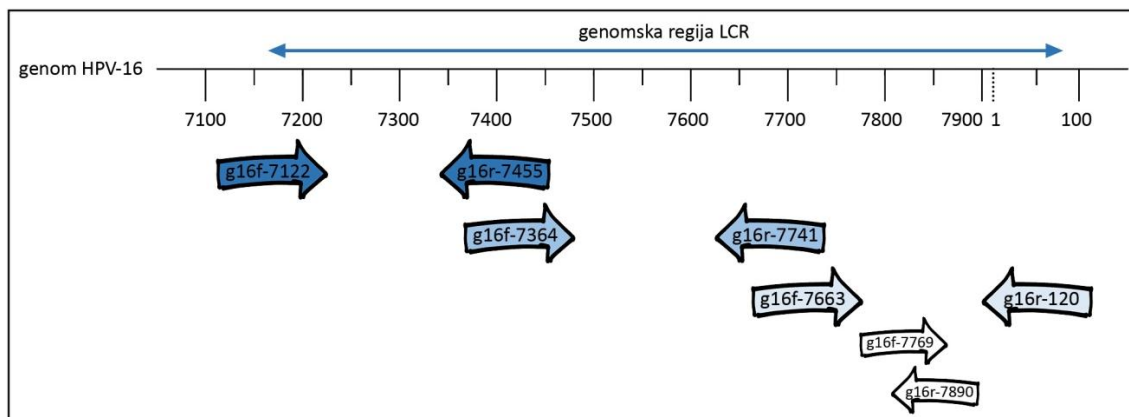
Za pomnoževanje genomskih področij LCR (832 bp), *E6* (477 bp) in *E7* (297 bp) smo uporabili več kompletov HPV-16 tipsko-značilnih začetnih oligonukleotidov (OZ) in komercialno dostopen komplet kemikalij FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Švica). Nekateri OZ so bili izdelani in uporabljeni v predhodnih raziskavah genetske raznolikosti HPV-16 (Vrtačnik Bokal in sod., 2010; Du in sod., 2012), medtem ko smo druge izdelali v sklopu magistrskega dela. Pri tem smo uporabili prosto dostopno računalniško aplikacijo NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) ter poravnave referenčnih nukleotidnih zaporedij HPV-16 (K02718), dostopnih v genskih bankah EMBL, DDBJ in NCBI. Pri izdelavi OZ, smo naredili poravnave z referenčnimi nukleotidnimi zaporedji sorodnih virusov HPV-31, -33, -35, -52, -58, -67 ter HPV-18 in s tem izključili pomnoževanje nespecifičnih pridelkov. Dolžino pridelkov PCR smo prilagodili za pomnoževanje DNK v arhivskih vzorcih (<300-bp). Pri izolatih HPV, osamljenih iz arhivskih tkivnih vzorcev namreč uspešnost pomnoževanja s PCR pada z dolžino pomnoževanih genomskih področij, zato smo za pomnoževanje posameznega genomskega področja razvili dva kompleta prekrivajočih se OZ (angl. *overlapping primers*), ki ciljata 5' oz. 3' konec genomskega področja. Za primere, ko se katerikoli od segmentov *E6* ni uspešno pomnožil smo razvili tudi OZ za vgnezdno (angl. *nested*) oz. pol-vgnezdno (angl. *semi-nested*) PCR. Pol vgnezdni OZ so bili prav tako razviti za 3' konec segmenta LCR, v katerem pomnoževanje ni bilo dovolj uspešno. Nukleotidna zaporedja uporabljenih OZ in dolžine pridelkov PCR so prikazana v Preglednici 3 in 4. Slika 13 prikazuje naleganje OZ na genomsko področje LCR.

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje genomskih področij LCR, *E6* in *E7*

Oligonukleotidni začetniki	Genomsko mesto naleganja HPV-16 (K02718)	Nukleotidno zaporedje OZ	Referenca
g16-r-120	LCR (101-119)	5'-GTGGGTCCTGAAACATTGC-3'	Zasnovani v namen študije
g16-r-7455	LCR (7438-7457)	5'-TCGGTTGAAGCTACAAAATG-3'	
g16-f-7364	LCR (7366-7392)	5'-CATTGTATATAAACTATATTTGCTACA-3'	
g16-f-7769	LCR (7769-7788)	5'-GCCAACTAAATGTCACCCTA-3'	
g16-r-7890	LCR (7868-7889)	5'-GTTGCTTGTAATGTAACCC-3'	
g16f-7122	LCR (7124-7143)	5'-ACAACGTCTAAACGCAAAAA-3'	Vrtačnik Bokal in sod., 2010
g16r-7714	LCR (7697-7717)	5'-GCCAAAAATATGTGCCTAACA-3'	
g16f-7663	LCR (7666-7683)	5'-AATCACTATGCGCCAACG-3'	
HPV16E61N-F	<i>E6</i> (82-101)	5'-TATGCACCAAAAGAGAACTG-3'	Zasnovani v namen študije
HPV16E62N-R	<i>E6</i> (540-560)	5'-ATTACAGCTGGGTTTCTCTAC-3'	
HPV16E61-F	<i>E6</i> (57-79)	5'-CCGGTTAGTATAAAAGCAGACAT-3'	Du in sod., 2012
HPV16E61-R	<i>E6</i> (356-375)	5'-TGCTGTTCTAATGTTGTTCC-3'	
HPV16E62-F	<i>E6</i> (273-292)	5'-GGAATCCATATGCTGTATGT-3'	
HPV16E62-R	<i>E6</i> (568-587)	5'-TGCAATGTAGGTGTATCTCC-3'	
HPV16E71-F	<i>E7</i> (542-561)	5'-AGAGAAACCCAGCTGTAATC-3'	
HPV16E71-R	<i>E7</i> (745-762)	5'-CAACCGAAGCGTAGAGTC-3'	
HPV16E72-F	<i>E7</i> (686-702)	5'-CTGGACAAGCAGAACCG-3'	
HPV16E72-R	<i>E7</i> (881-898)	5'-CCTCTTCCCCATTGGTAC-3'	

Preglednica 4: Kompleti OZ in dolžine pričakovanih pridelkov PCR

Genomsko področje	Set oligonukleotidnih začetnikov	Vrsta reakcije	Naleganje na genomu	Dolžina produkta (približne vrednosti)
<i>E6</i>	HPV16E61-F HPV16E61-R	osnovna PCR	5' konec gena	320 bp
	HPV16E61N-F HPV16E61-R	pol-vgnezdna PCR	5' konec gena	295 bp
	HPV16E62-F HPV16E62-R	osnovna PCR	3' konec gena	315 bp
	HPV16E62-F HPV16E62N-R	pol-vgnezdna PCR	3' konec gena	290 bp
<i>E7</i>	HPV16E71-F HPV16E71-R	osnovna PCR	5' konec gena	220 bp
	HPV16E72-F HPV16E72-R	osnovna PCR	3' konec gena	215 bp
LCR	g16-f-7122 g16-r-7455	osnovna PCR	5' konec gena	335 bp
	g16-f-7364 g16-r-7714	osnovna PCR	5' konec gena	350 bp
	g16f-7663 g16-r-120	osnovna PCR	3' konec gena	360 bp
	g16f-7663 g16-r-7890	pol-vgnezdna PCR	3' konec gena	230 bp
	g16-f-7769 g16-r-120	pol-vgnezdna PCR	3' konec gena	260 bp



Slika 13: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za pomnoževanje genomske regije LCR

4.2.2 Sestava reakcijskih mešanic za posamezne reakcije PCR in pogoji pomnoževanja s PCR

Za vsak vzorec smo po navodilih proizvajalca namešali 20 µL reakcijske mešanice (Pregl. 5) in ji dodali 5 µL DNK. V primeru zelo koncentriranih vzorcev, smo DNK predhodno redčili z deionizirano vodo, saj je optimalna koncentracija DNK v posamezni reakciji 100

ng/25 μ L skupnega reakcijskega volumna. Pri vsakem pomnoževanju smo vključili pozitivno ter negativno kontrolo reakcije PCR.

Pomnoževanje genomskih področij LCR, *E6* ter *E7* smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 30s pri 95 °C, 30 s pri 50 °C in 30 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 2 minuti inkubirali pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNK in aktivacijo encima Taq DNK polimeraza. Zadnjemu ciklu PCR je sledilo končno podaljševanje pridelkov PCR s 7 minutno inkubacijo pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohlavitvijo reakcijske mešanice na 8 °C. Za pomnoževanje s PCR smo uporabili aparaturo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA).

Preglednica 5: Reakcijska mešanica za pomnoževanje genomskih področij LCR, *E6* in *E7*

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (μ L)	Končna koncentracija
dNTP mix (10 mM)	0,5	200 μ M
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10X (+18 mM $MgCl_2$)	2,5	1x, 1,8 mM $MgCl_2$
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2	1,2 mM
OZ-F (50 uM)	0,2	0,4 uM
OZ-R (50 uM)	0,2	0,4 uM
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/ μ L)	0,25	1,25 U
ddH ₂ O	15,15	
Skupni volumen reakcijske mešanice	20	
Volumen DNK	5	
Skupni reakcijski volumen	25	

Pri vgnezdni oz. pol-vgnezdni reakciji PCR, pridelek PCR iz prve reakcije, pomnožimo z enim od OZ iz osnovne PCR in drugim OZ, ki se prilega znotraj prvega pridelka PCR; na ta način povečamo specifičnost PCR reakcije. Pol-vgnezdna PCR reakcija nam omogoča, da pomnožimo zelo nizke koncentracije HPV-16 s čimer povečamo občutljivost reakcije PCR.

Za reakcije pol-vgnezdene PCR smo po navodilih proizvajalca pripravili 47 μ L reakcijske mešanice z vodilnim in povratnim OZ in ji dodali 3 μ L pridelka PCR iz osnovne reakcije (Pregl. 5). Navodila za pripravo reakcijske mešanice so predstavljena v Preglednici 6. Reakcije pol-vgnezdene PCR so bile izvedene pod enakimi pogoji kot osnovne PCR reakcije, vendar na drugi aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied

Biosystems®), da smo se izognili možnosti kontaminacije s pridelki osnovne reakcije PCR.

Za pomnoževanje segmenta *E7*, nismo uporabili vgnezenega protokola PCR, saj nam je uspelo pomnožiti večino vključenih izolatov.

Preglednica 6: Reakcijska mešanica za pol-vgnezeno reakcijo genomskih področij LCR in *E6*

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (μL)	Končna koncentracija
dNTP mix (10 mM)	1	200 μM
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10X (+18 mM MgCl ₂)	5	1x, 1.8 mM MgCl ₂
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	1.2 mM
OZ-NF (50 uM)	0,4	0,4 uM
OZ-NR (50 uM)	0,4	0,4 uM
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/μl)	0,5	1,25 U
ddH ₂ O	37,3	
Skupni volumen reakcijske mešanice	47	
Volumen DNK	3	
Skupni reakcijski volumen	50	

4.2.3 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR

Prisotnost pridelkov vseh reakcij PCR smo preverili s pomočjo gelske elektroforeze. Pri tem smo uporabili komercialno dostopne gele za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific, Cham, Švica) in elektroforezni sistem SEA 2000® (Elchrom Scientific). Geli vsebujejo etidijev bromid in so sestavljeni iz 1 % agaroze; z njimi lahko zaznamo 100-4000 bp velike delce DNK.

Za preverjanje pridelkov PCR smo si najprej pripravili elektroforezni pufer. V 1950 mL deionizirane vode smo zamešali 50 mL 40x pufru TAE (Elchrom Scientific) in 100 μL etidijevega bromida s koncentracijo 10 mg/mL (Fujirebio Europe, Gent, Belgija). Pripravljeno raztopino smo vlili v elektroforezno kadičko in vanjo vstavili gel. V prvo luknjico gela smo vedno nanесли 3,2 μL molekularnega označevalca XVI (Roche Diagnostics), ki vsebuje delce od 100 do 1500 bp in v lestvici po 100 bp označuje velikost prepotovanih posameznih delcev. V vse naslednje luknjice smo po vrsti nanašali 6 μL posameznega pridelka PCR, kateremu smo predhodno primešali 1,6 μL nanašalnega pufru 6x MassRuler™ DNK Loading Dye (Fermentas, Vilnius, Litva). Elektroforeza je potekala 25 minut pri sobni temperaturi in napetosti med elektrodama 120V. Črpalka za kroženje in hlajenje pufru se je avtomatsko vklopila 1,5 minute po zagonu elektroforeze.

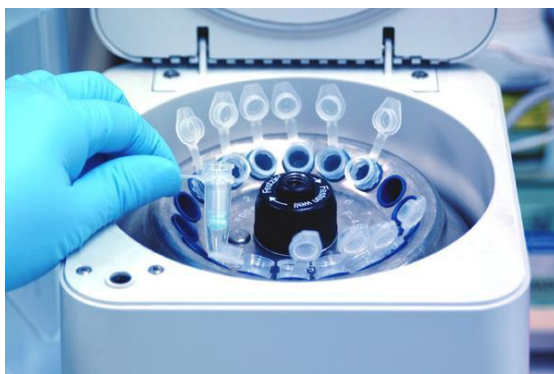
Takoj po končani elektroforezi smo gel slikali in preverili prisotnost oz. velikost pridelkov PCR pod UV svetlobo z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael). Velikost pridelka PCR smo določili s primerjavo njegove pozicije s pozicijo pozitivne kontrole in velikosti delcev molekularnega označevalca. Po dokazovanju pridelkov PCR, smo gele za večkratno uporabo očistili tako, da smo v obratni smeri izvedli 45-minutno elektroforezo. Po čiščenju smo pod UV- svetlobo preverili čistost gela.

4.2.4 Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja

a) Čiščenje pridelkov PCR

Pridelke PCR smo pred izvedbo sekvenčne reakcije očistili s pomočjo komercialno dostopnega kompleta kemikalij QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). S tem smo odstranili manjše nespecifične pridelke PCR, OZ, nevgrajene nukleotide, encime, soli ter ostale nečistoče.

Postopek čiščenja smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Eni volumski enoti pridelka PCR smo dodali 5 volumskih enot pufru PB, mešanico dobro premešali in jo prenesli v ločevalno mikrokolono, vloženo v 2 mL zbiralno tubico. Mikrokolono smo nato s pomočjo centrifuge Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) centrifugirali 1 minuto pri 13000 obr/min. Izpirek in zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa postavili v novo zbiralno tubico, dodali 750 μ L pufru PE in s pomočjo centrifuge (Eppendorf) centrifugirali 1 minuto pri 13000 obr/min. V nadaljevanju smo mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico in centrifugirali pri enakih pogojih, da se je izločil preostanek pufru PE. V zadnjem koraku smo mikrokolono postavili v novo 1,5 mL tubico, dodali 30-50 μ L elucijskega pufru EB in vzorec inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Pri dodajanju elucijskega pufru smo bili pozorni, da smo ga nanесли čim bolj na sredino membrane. Volumen elucijskega pufru je bil odvisen od volumna reakcijske mešanice ter jakosti pridelka PCR na agaroznem gelu. Pridelke PCR smo iz mikrokolone spirali z enominutnim centrifugiranjem pri hitrosti 13000 obr/min in jih do uporabe shranili pri -20 °C (Slika 14).



Slika 14: Spiranje pridelkov PCR iz membranskega filtra s centrifugiranjem (Arrayit corporation, 2016)

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določili s pomočjo 1,6 % agaroznega gela in kvantitativnega molekularnega označevalca. Agarozni gel smo pripravili po navodilih proizvajalca in sicer tako, da smo zatehtali 0,8 g agaroze v prahu, A9539 Agarose for routine use (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in dodali 50 mL 1x pufra TAE. Raztopino smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Preden smo gel vlili v kalup z vstavljenimi elektroforeznimi glavnički, smo raztopino rahlo ohladili ter ji primešali 5 μ L etidijevega bromida (10 mg/mL) (Fujirebio Europe).

Strjen gel smo nato vstavili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit (Hoefer, San Francisco, ZDA) in ga prelili s 1x pufrom TAE, ohlajenim na 4 °C. V prvo luknjico smo nanegli 10 μ L kvantitativnega molekularnega označevalca Mass Ruler™ DNK Ladder, Low Range (Fermentas), s katerim lahko določimo koncentracijo 80-1031 bp dolгим pridelkom PCR. V vsako naslednjo luknjico smo nanašali posamezen očiščen pridelek PCR. Petim μ L očiščenega pridelka PCR smo pred nanašanjem na gel dodali 5 μ L deionizirane vode in 2 μ L nanašalnega pufra 6x MassRuler™ DNK Loading Dye (Fermentas).

Elektroforeza je potekala 25 minut pri sobni temperaturi in napetosti med elektrodama 120V. Takoj po končani elektroforezi smo gel slikali in določili koncentracijo očiščenih pridelkov PCR pod UV svetlobo z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems). Koncentracijo DNK smo določili na podlagi primerjave znane intenzitete fluorescence molekularnega označevalca in intenzitete fluorescence vzorca.

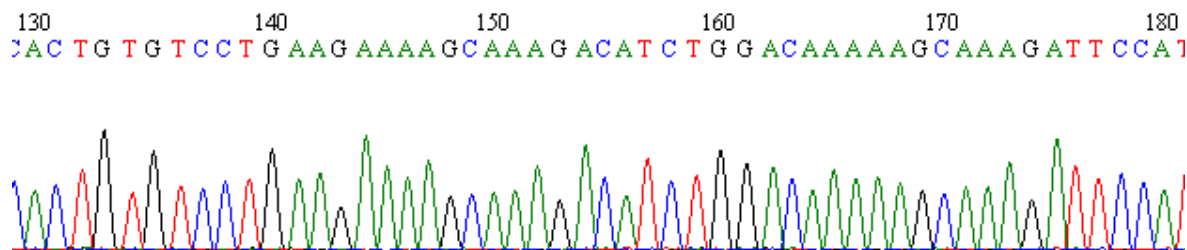
b) Določanje nukleotidnega zaporedja genomskih področij LCR, *E6* in *E7* HPV-16

Sekvenčno reakcijo smo izvedli s pomočjo komercialno dostopnega kompleta kemikalij BigDye® Terminator v1.3 Cyclus Sequencing kit (Applied Biosystems®), OZ uporabljenimi v reakcijah PCR (Pregl. 3) in aparaturo Veriti® 96-Well Thermal Cyclus (Applied Biosystems®). Za vsak pridelek PCR smo pripravili dve sekvenčni reakciji; prva je vsebovala vodilni OZ in druga povratni OZ.

Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilih proizvajalca. V posamezno reakcijsko posodico smo dodali 2 μ L 5x pufra za sekvenciranje BigDye terminator v3.1 Sequencing Buffer, 0,5 μ L reakcijske mešanice BigDye Terminator v3.1, 0,65 μ L izbranega OZ (50 uM), 5 ng očiščenega pridelka PCR in deionizirano vodo do končnega reakcijskega volumna 10 μ L. Nato je sledil protokol sekvenciranja; začetna inkubacija 1 min pri 96 °C, 15x ponovitev temperaturnega cikla sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 75 s pri 60 °C, 5x ponovitev temperaturnega cikla sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 90 s pri 60 °C, in 5x ponovitev temperaturnega cikla sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 2 min pri 60 °C, na koncu je sledila ustavitev encimske reakcije z ohladitvijo na 8 °C.

Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije smo izvedli s komercialno dostopnim kompletom kemikalij BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems). Mikrotitrsko ploščo s pridelki sekvenčne reakcije smo najprej s pomočjo centrifuge Eppendorf Multipurpose Centrifuge 5804 (Eppendorf) centrifugirali, nato smo v vsako reakcijsko tubico dodali 10 µL raztopine XTerminator Solution, ki ulovi nevgrajene dideoksinukleotide in soli ter 45 µL reagenta SAM™ Solution, ki pomaga pri delovanju XTerminator reagenta in stabilizira vzorce po čiščenju. Po dodatku reagentov smo mikrotitrsko ploščo 25 min stresali na stresalniku pri 1700 obr/min. Nato smo mikrotitrsko ploščo s pomočjo centrifuge (Eppendorf) centrifugirali še 2 min pri 2000 obr/min, da so se netopne frakcije reagentov z ulovljenimi nečistočami usedle na dno reakcijske tubice, očiščeni produkti sekvenčne reakcije pa so ostali v supernatantu.

Določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi je potekalo na aparaturi za avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja, ABI3500 (Applied Biosystems®). Mikrotitrsko ploščo z očiščenimi pridelki sekvenčne reakcije smo vpeli v stojalo za sekvenciranje in jo vstavili v aparaturo in glede na dolžino produkta izbrali ustrezen program sekvenciranja. Po končanem sekvenciranju smo s pomočjo računalniškega programa, povezanega z aparaturo ABI3500 Genetic Analyzer, pridobili avtomatsko obdelane podatke v obliki elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem (Slika 15).



Slika 15: Elektroferogram nukleotidnega zaporedja HPV-16, pridobljen z avtomatskim sekvenciranjem

4.2.5 Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo pregledali in analizirali s pomočjo računalniškega paketa Vector NTI Advance v10.1. (Thermo Fisher Scientific). Iz primerjave komplementarnih nukleotidnih zaporedij smo za posamezen pridelek PCR sestavili smiselno (angl. *sense*) nukleotidno zaporedje in ga uporabili za določitev podtipskih različic HPV-16. Z algoritmom ClustalW Multiple alignment, ki je del računalniškega paketa BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University, ZDA) smo izvedli multiplo poravnavo vseh pridobljenih zaporedij z referenčnim zaporedjem HPV-16 (K02718) (Slika 16). Kot novo podtipsko različico HPV-16 smo opredelili vsak izolat katerega zaporedje LCR, *E6* in/ali *E7* se je od referenčnega razlikovalo za najmanj eno točkasto mutacijo oz. nukleotidni vstavek/izpad v izbranem genomskem področju. Za

opredelitev vezavnih mest dejavnikov prepisovanja smo uporabili prosto dostopna programa SIGSCAN software v4.05 (Prestridge, 1991) ter TRANSFAC Public v6.0 (Wingender in sod., 1996).



Slika 16: Multipla poravnava vseh pridobljenih zaporedij z referenčnim zaporedjem HPV-16 (K02718)

4.2.6 Filogenetska analiza podtipskih različ genomskega področja LCR, E6 in E7 HPV-16

Filogenetsko opredelitev podtipskih različ HPV-16 smo izvedli v sodelovanju s sodelavci iz Kitajske (prof. Chen, The Chinese University of Hong Kong, Shenzhen). V ta namen smo nukleotidna zaporedja LCR in/ali E6, E7, pridobljena v naši raziskavi, poravnali z nukleotidnimi zaporedji celotnih genomov HPV-16, ki pripadajo 10 referenčnim podlinijam HPV-16 (A1-4, B1-2, C1 in D1-3) (Burk in sod., 2013), z uporabo programa HmmerAlign (<http://www.biology.wustl.edu/gcg/hmmeralign.html>). Za izdelavo filogenetskih dreves in ugotavljanje evlucijskih povezav med podtipskimi različicami HPV-16 smo nato uporabili metodo največje verjetnosti (angl. *maximum likelihood*, ML) v programu RAxML HPC2 v7.6.3 (angl. *randomized axelerated maximum likelihood*) (Stamatakis in sod., 2008). Za določevanje zanesljivosti drevesnih razvejišč smo izvedli 1000 ponovnih vzorčenj izhodiščnih podatkov (angl. *bootstrap*). Filogenetska drevesa smo prikazali s pomočjo računalniškega programa FigTree v1.3.1 (Drummond in Rambaut, 2007).

4.2.7 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Hi-kvadrat porazdelitev. Pri izračunih smo si pomagali s prosto dostopno aplikacijo Calculation for the chi-square test, kamor smo vnesli podatke in želene parametre (Preacher, 2001). Pri stopnji značilnosti $\alpha=0,05$ smo ničelno domnevo, da spremenljivki nista povezani, potrdili kadar je bila Hi-kvadrat vrednost manjša od kritične vrednosti.

5 REZULTATI

5.1 PODTIPSKÉ RAZLIČICE

Z uporabo HPV-16-tipsko značilnih OZ smo genomsko področje LCR (832-bp) pomnožili pri 178/205 (86,8 %) izolatih, *E6* (477-bp) pri 205/205 (100 %) izolatih in *E7* (297-bp) pri 203/205 (99,0 %) izolatih vključenih v raziskavo. Vzrok za manjši delež uspešno pomnoženih delov genoma LCR so najverjetneje predvsem uporabljeni OZ, ki niso bili optimalni za izolate iz predela glave in vratu ter analnega kanala in pa pomanjkanje DNA nekaterih izolatov, ki so bili uporabljeni že v predhodnih raziskavah (Jančar in sod., 2009; Kovanda in sod., 2009; Komloš in sod., 2011; Poljak in sod., 2011; Strojan in sod., 2015). Omenjeni izolati so bili osamljeni iz tkivnih vzorcev karcinomov, fiksiranih s formalinom in vklopljenih v parafin. DNK izolirana iz FFPE vzorcev je običajno razgrajena oz. vsebuje manjše delce. Tako pri izolatih HPV, osamljenih iz arhivskih tkivnih vzorcev, uspešnost pomnoževanja s PCR pada z dolžino pomnoževanih genomskih področij. Vzrok za slabše pomnoževanje LCR je tako najverjetneje velikost pridelkov 5' konca, ki so znašali med 335 in 350 bp; uspešnost pomnoževanja bil lahko povečali ali z izdelavo OZ, ki ciljajo krajše segmente 5' konca ali z izdelavo vgnezdene PCR na že obstoječih 5' OZ. Pri pomnoževanju nekaterih izolatov so se prav tako pojavili nespecifični produkti, kar prav tako nakazuje na dejstvo, da uporabljeni OZ niso bili optimalni. Kljub manjšemu številu pomnoženih genomskih področij LCR v regijah glave in vratu ter analnega predela, smo se odločili pridobljene regije LCR vključiti v raziskavo. Genomsko področje LCR je namreč zelo pomembno za uravnavanje beljakovin E6 in E7 in prav tako za filogenetsko opredelitev izolatov.

Število uspešno pomnoženih genomskih področij HPV-16 po posameznih anatomskih lokacijah je prikazano v Preglednici 7.

Preglednica 7: Število uspešno pomnoženih genomskih področij LCR, *E6* ter *E7* HPV-16 glede na anatomsko lokacijo izolata

Anatomska lokacija (število izolatov)	Genomsko področje		
	LCR	<i>E6</i>	<i>E7</i>
Glava in vrat (26)	18	26	24
Analni kanal (39)	21	39	39
Maternični vrat (140)	139	140	140
Skupaj (205)	178	205	203

5.1.1 Podtipske različice genomskega področja LCR

Z uporabo PCR smo genomsko področje LCR uspešno pomnožili pri 178/205 izolatih HPV-16 vključenih v raziskavo. Kot je razvidno iz Slike 18, smo s sekvenciranjem celotnega genomskega področja LCR in primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij z zaporedjem referenčnega izolata HPV-16 med 178 slovenskimi izolati opredelili 66 različic LCR. Te so se od referenčnega zaporedja razlikovale za eno do šestnajst točkastih mutacij.

Referenčno zaporedje LCR smo dokazali samo pri 7/178 (3,9 %) izolatih, kateri so bili vsi osamljeni iz materničnega vratu (trije od teh pri raku, dva pri predrakavih spremembah CIN3 ter dva pri normalni citologiji). Pri petih bolnikih smo dokazali okužbo z najmanj dvema različicama LCR (Slika 18, različice: LCR-4, -5, -13, -14 ter -48). Skupno smo v celotnem genomskem področju LCR pri 178 slovenskih izolatih HPV-16, opredelili 71 mest z nukleotidnimi zamenjavami. Genetsko najbolj oddaljena različica (LCR-40) se je od referenčnega zaporedja LCR razlikovala na 16 mestih oz. za 1,9 % (16/832). Različica LCR-1, ki vsebuje mutaciji G7193T in G7521A, je bila najpogostejša na vseh treh anatomskih lokacijah in je bila prisotna pri 62/178 (34,8 %) izolatih. Poleg tega smo na vseh treh anatomskih mestih dokazali še različici LCR-2 in -3. Po drugi strani so bile različice LCR-4 do -8 in LCR-10 do -14 značilne samo za predel glave in vratu, različice LCR-16, -17 in -19 samo za analni kanal, medtem ko so bile različice LCR-20 do -66, značilne samo za maternični vrat. Razporeditev opredeljenih podtipskih različic LCR in značilne mutacije LCR pri 178 slovenskih izolatih HPV-16 so prikazane na Sliki 18.

Znotraj vezavnih mest za celične dejavnike prepisovanja; SP-1, AP-1, YY1 in NF-1 smo dokazali nukleotidne zamenjave 31, 80, 7310, 7335, 7435, 7479, 7483, 7485, 7489, 7584, 7552, 7600, 7622, 7669, 7743, 7753, 7761, 7764, 7786, 7856 in 7877. Znotraj vezavnega mesta za beljakovino E2 smo dokazali nukleotidne zamenjave na mestih 43, 38 in 7868 ter znotraj zaporedja TATA (angl. *TATA box*) nukleotidno zamenjavo na mestu 7894. Na vezavnih mestih za celične dejavnike prepisovanja TEF-1 ter poliadenilacijskih mestih ni bilo zabeleženih nukleotidnih zamenjav. Vezavna mesta za dejavnike prepisovanja, beljakovino E2 in TATA zaporedja, kjer smo zabeležili mutacije so prikazane na Sliki 17.



Slika 17: Značilne vezavne domene (dejavniki prepisovanja; SP-1, YY1, AP-1, NF-1, vezavno mesto za beljakovino E2 in zaporedje TATA) genomskega področja LCR HPV-16, kjer smo zabeležili nukleotidne zamenjave

[illegible]

Slika 18: Podpisna različnost genomskega področja LCR (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)

Se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 18. Podtipska različnost genomskega področja LCR (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)

[illegible]

5.1.2 Podtipske različice gena *E6*

Z uporabo PCR smo gen *E6* uspešno pomnožili pri vseh 205 izolatih HPV-16, vključenih v raziskavo. Kot je razvidno iz Slike 19, smo s sekvenciranjem celotnega gena *E6* pri 205 slovenskih izolatih HPV-16 opredelili 23 različic gena *E6*, ki so se od referenčnega zaporedja HPV-16 razlikovale za eno do osem točkastih mutacij.

Referenčno zaporedje *E6* smo opredelili pri 69/205 (33,7 %) izolatih, vključenih v raziskavo. Pri enem bolniku smo dokazali okužbo z najmanj dvema različicama gena *E6* (Slika 19, različica: E6-3). V celotnem genu *E6* smo pri 205 slovenskih izolatih HPV-16 opredelili 28 mest z nukleotidnimi zamenjavami. Genetsko najbolj oddaljeni različici gena *E6* (različica E6-17 in različica E6-23), sta se od referenčnega zaporedja razlikovali na 8/477 mestih oz. za 1,7 %. Različica E6-1, ki vsebuje samo značilno točkasto mutacijo T350G, je bila najpogostejša na vseh treh anatomskih lokacijah in je bila prisotna pri 99/205 (48,3%) izolatih. Različice E6-2 do -7 ter -9 in -10 so bile značilne samo za predel glave in vratu, različice E6-11 do -14 samo za analni kanal, medtem ko so bile različice E6-15 do -23 značilne samo za maternični vrat.

Od skupno 28 zabeleženih nukleotidnih zamenjav je bilo 17 (60,7 %) takih, ki so povzročile AK spremembo: R10G, R10I, Q14D, Q14H, D25Y, I27R, R39Q, D64E, S71C, H78Y, C80Y, L83V, P95L, K108T, Q116H, H118Y in K122N. Pri 69 od 205 (33,6 %) izolatih HPV-16 nismo zabeležili mutacij, ki bi vplivale na spremembo aminokislinskega zaporedja beljakovine *E6*, medtem ko so bile pri ostalih 136 izolatih spremenjene od ena do pet aminokislin oz. 0,6-3,2 % beljakovine *E6* (158-AK). Zabeležene AK zamenjave se niso pojavile v funkcionalnih domenah beljakovine *E6*, vključujoč cinkove prste, ter E6AP in PDZ vezavno domeno. Okrajšave imen AK so obrazložene v Prilogi D.

Mutacija T350G, ki vodi v spremembo aminokisline levcin (L) v valin (V), na kodonu št. 83, je bila v nekaterih predhodnih raziskavah povezana z dolgotrajnostjo virusne okužbe in ponavljanjem predrakavih sprememb materničnega vratu (Vrtačnik bokal in sod, 2010; Du in sod., 2012). V naši raziskavi smo omenjeno aminokislinsko spremembo dokazali pri vseh podtipskih različicah *E6* razen pri referenčnem zaporedju *E6* in različicah E6-2, -9, -20 in -23 oz. pri 131/205 (63,9 %) izolatih, vključenih v raziskavo.

V nadaljevanju raziskave smo želeli preveriti ali so različice gena *E6* z mutacijo T350T oz. T350G značilno povezane z anatomsko lokacijo okužbe in predrakavimi oz. rakavimi spremembami tarčnega epitela (Pregl. 8 in 9).

Preglednica 8: Porazdelitev mutacij T350T in T350G glede na anatomsko regijo

Anatomska regija	T350T	T350G	skupaj
Glava in vrat	10	16	26
Analni kanal	9	30	39
Maternični vrat	55	85	140
skupaj	74	131	205

V raziskavi nismo dokazali statistično značilne razlike med porazdelitvijo različic T350T in T350G v področju glave in vratu, analnem kanalu in materničnem vratu ($\chi^2=3,55$; p -vrednost=0,17). Kot je razvidno iz Preglednice 9, prav tako nismo dokazali statistično pomembne razlike med porazdelitvijo HPV-16 različic T350T in T350G pri osebah s predrakavimi in rakavimi spremembami materničnega vrata in tistimi z normalno citološko diagnozo ($\chi^2=0,60$; p -vrednost=0,44).

Preglednica 9: Porazdelitev mutacij T350T in T350G pri predrakavih in rakavih spremembah ter normalni citologiji materničnega vrata

Maternični vrat	T350T	T350G	skupaj
Predrakave in rakave spremembe	32	55	87
Normalna citologija	23	30	53
skupaj	55	85	140

HPV16		Gen E6																													
		1 0 9	1 3 1	1 3 2	1 4 3	1 4 5	1 7 6	1 8 3	1 9 6	2 9 6	2 5 1	2 7 6	2 8 9	2 8 9	2 9 5	3 1 5	3 3 5	3 3 5	3 4 2	3 4 0	4 4 3	4 4 6	4 4 8	4 4 1	4 4 2	4 5 5	4 5 9	5 6 3	5 3 2	5 5 5	
K02718-HPV16-REF		T	A	G	C	G	G	T	G	G	C	T	T	A	T	C	C	G	T	C	A	A	G	A	A	C	G	A	A	A	
GLAVA IN VRAT	Rak glave in vratu	Referenca																													
		Različica E6-1																			G										
		Različica E6-2						T																							
		Različica E6-3								A/G								G			G										
		Različica E6-4																G			G										
		Različica E6-5						T													G										
		Različica E6-6																			G	T									
		Različica E6-7						T		G					C	A	G				T		G								
		Različica E6-8												T								G									
		Različica E6-9																												T	
Različica E6-10																				G				A							
ANALNI KANAL	Rak analnega kanala	Referenca																													
		Različica E6-1																			G										
		Različica E6-11																				G								G	
		Različica E6-12			G																	G								G	
		Različica E6-13							T												T		G								
	Različica E6-14																					G						C			
	Rak materničnega vratu	Referenca																													
		Različica E6-1																				G									
		Različica E6-15	C																			G									
		Različica E6-16			G																	G									
Različica E6-17								T		G						A	G	G		T		G							G		
Različica E6-18																A						G									
Različica E6-8																	T					G									
Različica E6-19																						G									
Različica E6-20																							A	G							
Različica E6-21																										C					
Različica E6-22																											C				
Različica E6-23		C			T	G	T									A	G			T		G							G		
CIN3		Referenca																													
		Različica E6-1																					G								
		Različica E6-15	C																				G								
	Različica E6-22																A	G			T		G						G		
	Različica E6-16			G																			G								
Negativni za CIN in raka	Referenca																														
	Različica E6-1																					G									
	Različica E6-15	C																					G								
Različica E6-22							T										A	G				G							G		
Številka kodona		2	10	10	14	14	25	27	31	39	51	56	61	62	64	71	78	80	83	95	100	108	115	116	117	118	122	143	144		
Referenčna AK		F	R	R	Q	Q	D	I	V	R	C	D	A	V	D	S	H	C	L	P	L	K	K	Q	R	H	K	S	R		
Spremenjena AK		F	G	I	D	H	Y	R	V	Q	C	D	A	V	E	C	Y	Y	V	L	L	T	K	H	R	Y	N	S	R		

Slika 19: Podtipska različnost gena *E6* (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)

5.1.3 Podtiske različice gena $E7$

Z uporabo PCR smo gen *E7* uspešno pomnožili pri 203/205 izolatih HPV-16, vključenih v raziskavo. S primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij z zaporedjem referenčnega izolata HPV-16 smo med 203 izolati opredelili 10 različic gena *E7*. Te so se od referenčnega zaporedja *E7* razlikovale za eno do največ tri nukleotide zamenjave (Slika 20).

Referenčno zaporedje gena *E7* smo opredelili pri 167/203 (82,3 %) izolatih, vključenih v raziskavo. Pri enem bolniku smo dokazali okužbo z najmanj dvema različicama gena *E7* (Slika 20, različica: E7-3). Genetsko najbolj oddaljena različica gena *E7* (različica E7-2) se je od referenčnega nukleotidnega zaporedja razlikovala na 3/297 mestih oz. za 1,0 %.

Različica E7-1, ki vsebuje mutacijo A822G, je bila najpogostejša na vse treh anatomskih lokacijah in je bila prisotna pri 23 izolatih. Poleg tega smo na vseh treh anatomskih mestih dokazali še različico E7-2. Po drugi strani so bile različice E7-3, -4 in -5 značilne samo za predel glave in vratu, različice E7-6, -7 in -8 samo za analni kanal, medtem ko sta bili različici E7-9 in -10, značilni samo za predel materničnega vratu.

Od skupno 12 zabeleženih nukleotidnih zamenjav je bilo petih takih, ki so vodile do AK sprememb: M12I, N29S, E33K, D36N in S63C. Pri 198 od 203 (97,5 %) izolatov HPV-16, zabeležene mutacije niso vplivale na spremembo aminokislinskega zaporedja beljakovine E7, medtem ko je bila pri ostalih 5 izolatih spremenjena ena aminokislina oz. 1,0 % beljakovine E7 (98-AK). Prisotne zamenjave AK se niso pojavile v funkcionalnih domenah beljakovine E7, vključujoč cinkove prste in vezavno mesto za celično beljakovino pRb. Okrajšave imen AK so obrazložene v Prilogi D.

HPV16			Gen E7												f r e k v		
			5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	8				
			9	4	5	6	3	4	6	6	8	9	9	2			
			7	7	8	7	2	9	2	5	9	5	6	2			
K02718-HPV16-REF			G	A	G	G	T	C	G	C	T	T	T	A			
GLAVA IN VRAT	Rak glave in vratu		Referenca												16		
			Različica E7-1											G	4		
			Različica E7-2					C				C	G			1	
			Različica E7-3				A/G									1	
			Različica E7-4	A												1	
			Različica E7-5			A										1	
ANOGENITALNA REGIJA	ANALNI KANAL	Rak analnega kanala	Referenca												29		
			Različica E7-1											G	6		
			Različica E7-2					C				C	G			1	
			Različica E7-6						G		T					1	
			Različica E7-7							A						1	
			Različica E7-8								T					1	
	MATERNIČNI VRAT	Rak materničnega vratu	Referenca													55	
			Različica E7-1												G	5	
			Različica E7-2					C				C	G			1	
			Različica E7-9		G							C	G			1	
		CIN3	Referenca														20
			Različica E7-1													G	3
			Različica E7-2					C				C	G			1	
			Različica E7-10											C		1	
		Negativni za CIN in raka	Referenca														47
			Različica E7-1													G	5
			Različica E7-2					C				C	G				1
Številka kodona			12	29	33	36	57	63	67	68	76	78	78	87			
Referenčna AK			M	N	E	D	F	S	L	C	I	T	T	L			
Spremenjena AK			I	S	K	N/D	F	C	L	C	I	T	T	L			

Slika 20: Podtipska različnost gena E7 (Zeleno označena področja so značilna za predel glave in vratu, rumeno označena področja so značilna za analni kanal ter oranžno označena področja za maternični vrat)

5.2 FILOGENETSKA ANALIZA

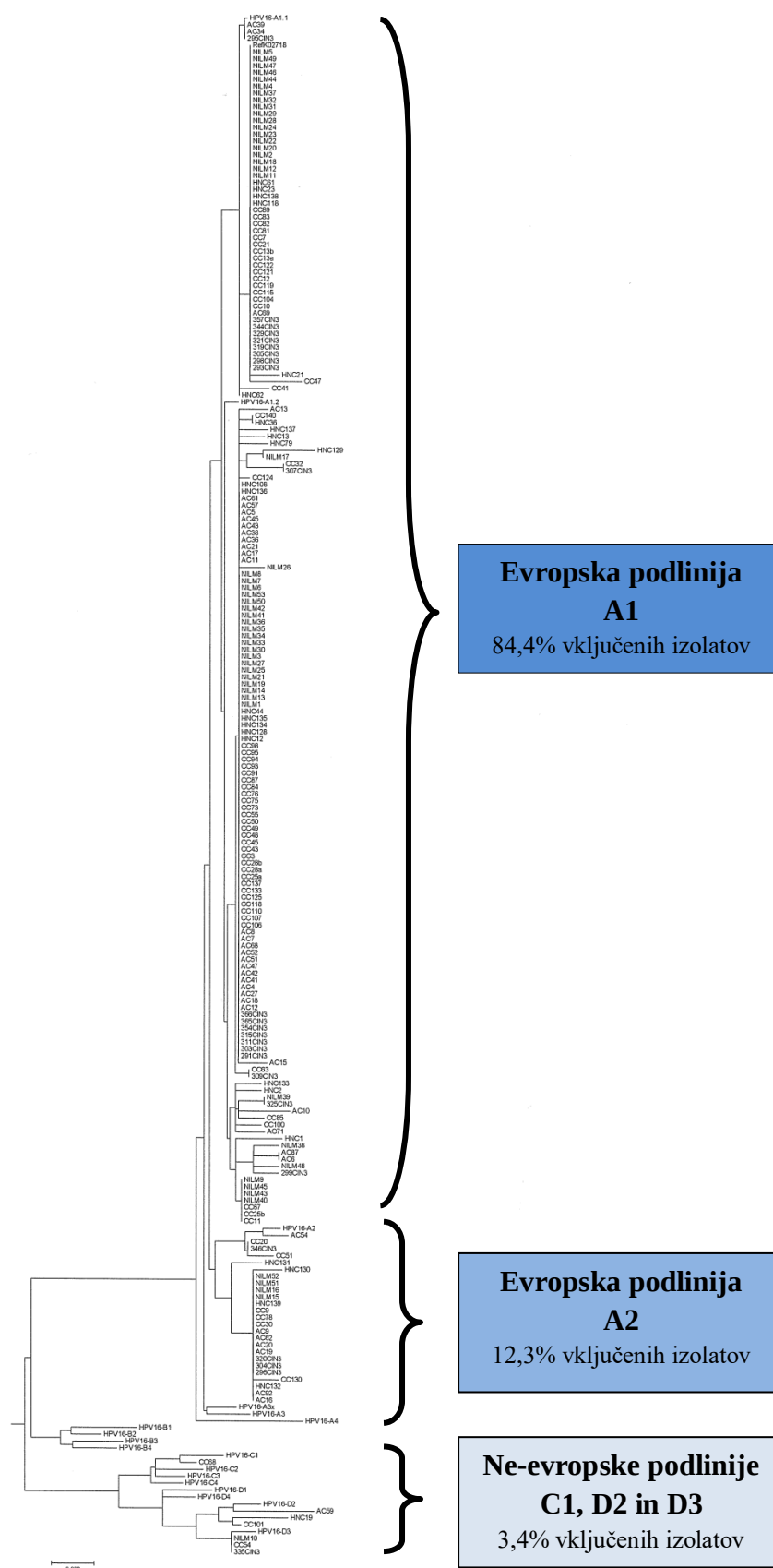
Evolucijsko pripadnost slovenskih izolatov HPV-16 smo določali z umeščanjem njihovih nukleotidnih zaporedij LCR, *E6* in *E7* v globalno filogenetsko drevo HPV-16, ki temelji na analizi celotnih genomov izolatov HPV-16 zbranih na različnih koncih sveta.

HPV-16 delimo na štiri genetske linije (A, B, C in D) in 10 podlinij (A1-4, B1-2, C1 in D1-3). Izolate HPV-16 iz podlinije A1-3 opredeljujemo kot evropske (Ev), iz podlinije A4 kot azijske (As), iz podlinij B1-2 kot afriške veja 1 (Af-1), iz podlinije C1 kot afriške veja 2 (Af-2), medtem ko izolate HPV-16 iz podlinij D1 opredeljujemo kot severno-ameriške (NA) ter D2-3 kot azijsko-ameriške (AA) (Burk in sod., 2013).

Filogenetska razvrstitev slovenskih izolatov HPV-16 je pokazala, da je 198/205 (96,6 %) izolatov pripadalo liniji A (od tega jih je 173 pripadalo podliniji A1 in 25 podliniji A2), 1/205 liniji C oz. podliniji C1 in 6/205 izolatov je pripadalo liniji D (od tega so trije pripadali podliniji D2 in trije podliniji D3). Natančna filogenetska razvrstitev vseh 205 analiziranih slovenskih izolatov HPV-16 je prikazana na Sliki 21 in Sliki 22.

Ime izolata	Filogenetska umestitev	Ime izolata	Filogenetska umestitev	Ime izolata	Filogenetska umestitev	Ime izolata	Filogenetska umestitev	Ime izolata	Filogenetska umestitev
HNC1	A1	AC20	A2	CC43	A1	CC86	A2	NILM13	A1
HNC2	A1	AC21	A1	CC45	A1	CC87	A1	NILM14	A1
HNC12	A1	AC27	A1	CC47	A1	CC88	A1	NILM15	A2
HNC13	A1	AC38	A1	CC48	A1	CC89	A1	NILM16	A2
HNC19	D2	AC34	A1	CC49	A1	291CIN3	A1	NILM17	A1
HNC21	A1	AC36	A1	CC50	A1	293CIN3	A1	NILM18	A1
HNC23	A1	AC39	A1	CC51	A2	295CIN3	A1	NILM19	A1
HNC36	A1	AC41	A1	CC52	D3	296CIN3	A2	NILM20	A1
HNC44	A1	AC42	A1	CC53	A1	298CIN3	A1	NILM21	A1
HNC61	A1	AC43	A1	CC54	A1	299CIN3	A1	NILM22	A1
HNC62	A1	AC45	A1	CC55	A1	303CIN3	A1	NILM23	A1
HNC79	A1	AC47	A1	CC56	C1	304CIN3	A2	NILM24	A1
HNC108	A1	AC51	A1	CC57	A1	305CIN3	A1	NILM25	A1
HNC118	A1	AC52	A1	CC58	A1	307CIN3	A1	NILM26	A1
HNC128	A1	AC54	A2	CC59	A1	309CIN3	A1	NILM27	A1
HNC129	A1	AC57	A1	CC60	A2	311CIN3	A1	NILM28	A1
HNC130	A2	AC59	D2	CC61	A1	315CIN3	A1	NILM29	A1
HNC131	A2	AC61	A1	CC62	A1	319CIN3	A1	NILM30	A1
HNC132	A2	AC62	A2	CC63	A1	320CIN3	A2	NILM31	A1
HNC133	A1	AC68	A1	CC64	A1	321CIN3	A1	NILM32	A1
HNC134	A1	AC69	A1	CC65	A1	325CIN3	A1	NILM33	A1
HNC135	A1	AC71	A1	CC66	A1	329CIN3	A1	NILM34	A1
HNC136	A1	AC87	A1	CC67	A1	335CIN3	D3	NILM35	A1
HNC137	A1	AC92	A2	CC68	A1	344CIN3	A1	NILM36	A1
HNC138	A1	CC3	A1	CC69	A1	346CIN3	A2	NILM37	A1
HNC139	A2	CC7	A1	CC70	A1	354CIN3	A1	NILM38	A1
AC4	A1	CC9	A2	CC71	A1	357CIN3	A1	NILM39	A1
AC5	A1	CC10	A1	CC72	A1	365CIN3	A1	NILM40	A1
AC6	A1	CC11	A1	CC73	A1	366CIN3	A1	NILM41	A1
AC7	A1	CC12	A1	CC74	D2	NILM1	A1	NILM42	A1
AC8	A1	CC13a	A1	CC75	A1	NILM2	A1	NILM43	A1
AC9	A2	CC13b	A1	CC76	A1	NILM3	A1	NILM44	A1
AC11	A1	CC20	A2	CC77	A1	NILM4	A1	NILM45	A1
AC12	A1	CC21	A1	CC78	A1	NILM5	A1	NILM46	A1
AC13	A1	CC25a	A1	CC79	A1	NILM6	A1	NILM47	A1
AC10	A1	CC25b	A1	CC80	A1	NILM7	A1	NILM48	A1
AC15	A1	CC28a	A1	CC81	A1	NILM8	A1	NILM49	A1
AC16	A2	CC28b	A1	CC82	A1	NILM9	A1	NILM50	A1
AC17	A1	CC30	A2	CC83	A1	NILM10	D3	NILM51	A2
AC18	A1	CC32	A1	CC84	A1	NILM11	A1	NILM52	A2
AC19	A2	CC41	A1	CC85	A1	NILM12	A1	NILM53	A1

Slika 21: Filogenetska umestitev izolatov HPV-16



Slika 22: Filogenetsko drevo izolatov HPV-16

5.2.1 Povezave genetskih (pod)linij HPV-16 z anatomskim področjem okužbe in značilnimi boleznimi

Kot je razvidno iz Preglednice 10, nismo dokazali statistično pomembne razlike med porazdelitvijo različic podlinije A1 in A2 pri osebah s predrakavimi in rakavimi spremembami in tistimi z normalno citološko diagnozo materničnega vratu ($\chi^2=1,56$; p -vrednost=0,21). Prav tako lahko trdimo, da razporeditev različic podlinije A1 in A2 ni povezana s specifičnim anatomskim mestom okužbe ($\chi^2=2,03$; p -vrednost=0,36) (Pregl. 11).

Preglednica 10: Porazdelitev različic A1 in A2 pri predrakavih in rakavih spremembah ter normalni citologiji materničnega vratu

Maternični vrat	A1	A2	skupaj
Predrakave in rakave spremembe	125	21	146
Normalna citologija	48	4	52
skupaj	173	25	198

Preglednica 11: Porazdelitev različic A1 in A2 glede na anatomsko regijo

Anatomska regija	A1	A2	skupaj
Glava in vrat	21	4	25
Analni kanal	31	7	38
Maternični vrat	121	14	135
skupaj	173	25	198

6 RAZPRAVA

Skupina človeških papilomavirusov je zelo heterogena skupina virusov DNK, ki jih etiološko povezujemo s številnimi benignimi in malignimi spremembami ploščatoceličnega epitela. Rod *Alphapapillomavirus* se deli na visokorizične genotipe, ki povzročajo maligne preobrazbe ploščatoceličnega sluzničnega epitela in nizkorizične, ki povzročajo benigne tvorbe ploščatoceličnega epitela. Med visokorizičnimi genotipi je najbolj pomemben HPV-16, ki je med drugim odgovoren za nastanek raka materničnega vratu. RMV je predvsem v manj razvitih državah za rakom dojke druga najpogostejša vrsta raka pri ženskah (Poljak in sod., 2005). Več kot 99 % histoloških vzorcev RMV vsebuje DNK HPV (Li in sod., 2010; Cubie, 2013). Med najbolj pogostimi genotipi RMV v Sloveniji je HPV-16 na prvem mestu (64,9 %) in HPV-18 na drugem (12,2 %). Skupaj predstavljata 77,1 % primerov RMV (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Čeprav HPV največkrat povezujemo z rakavimi spremembami materničnega vratu, so tudi druga anatomsko mesta dovzetna za okužbo. Okužba analnega kanala je zaradi histološke podobnosti z materničnim vratom še posebej pomembna. Rak analnega kanala je relativno redka bolezen, podobna RMV. Prisotnost HPV pri rakih analnega kanala variira med 70 in 100 % (Shvetsov in sod., 2009; Komloš in sod., 2011). V Sloveniji je pri raku analnega kanala največkrat prisoten genotip, HPV-16, zaznan pri 90 % obolelih (Komloš in sod., 2011). V zadnjem dvajsetletju so HPV začeli povezovati tudi z rakom glave in vratu (Franceschi in sod., 1996; Schwartz in sod., 1998; Herrero in sod., 2003; Smith in sod., 2004). Rak glave in vratu je bolezen večinoma povezana z okoljskimi dejavniki. Kajenje in uživanje alkohola sta ena izmed glavnih dejavnikov tveganja. Okužba s HPV prav tako lahko privede do nastanka raka glave in vratu. Keratinociti ustnega dela žrela so najbolj dovzetni za nastanek raka, povezanega s HPV (Chi in sod., 2015). Rake glave in vratu lahko delimo na HPV-negativne in HPV-pozitivne. Delež HPV-pozitivnih tumorjev se lahko razlikuje tudi glede na geografsko regijo (15-60 %). Visokorizična tipa HPV-16 in HPV-18 sta največkrat prisotna genotipa in se pojavita pri več kot 90-95 % vseh HPV pozitivnih tumorjev glave in vratu (Gillison in sod., 2000; Anantharaman in sod., 2013; Ankola in sod., 2013). V Sloveniji je HPV-16 prisoten pri več kot 80 % vseh HPV-pozitivnih rakov ustnega dela žrela (Strojan in sod., 2015).

V številnih do sedaj opravljenih raziskavah, ki so temeljile na opredeljevanju podtipске različnosti izolatov HPV-16, osamljenih iz različnih delov sveta, je bilo ugotovljeno, da genotip HPV-16 sestoji iz številnih podtipskih različic, ki jih na osnovi skladnosti nukleotidnih zaporedij delimo na 4 genetske linije (A, B, C in D), ki izkazujejo tudi določeno stopnjo geografske pripadnosti, delimo jih namreč v 10 podlinij. Izolate HPV-16 iz podlinije A1-3 tako opredeljujemo kot evropske, iz podlinije A4 kot azijske, iz podlinij B1-2 kot afriške veja 1, iz podlinije C-1 kot afriške veja 2, medtem ko izolate HPV-16 iz podlinij D1 opredeljujemo kot severno-ameriške in D2-3 kot azijsko-ameriške (Burk in sod., 2013). Analiza različic HPV-16 bi lahko bila ključnega pomena za razumevanje

bioloških razlik virusov in dodatno prispevala k razumevanju njihove infektivnosti in patogenosti. Genetske spremembe v genomu HPV-16 bi lahko različno vplivale na nastanek značilnih bolezni; bodisi z razlikovanjem v funkcionalnih sposobnostih (npr. razlike v izražanju virusnih onkogenov ali razlike v njihovi afiniteti do pRb in p53) ali zaradi aminokislinskih sprememb v plašnih beljakovinah, ki bi različno vplivale na infektivnost virusa oz. spremenile antigene lastnosti (Gheit in sod., 2011). Ugotovljeno je bilo, da so nekatere različice HPV-16 značilno povezane npr. z dolgotrajnostjo okužbe, napredovanjem v predrakave in rakave spremembe ter histološkim tipom raka oz. so izkazovale večjo aktivnost promotorja *E6* ter *E7* (Villa in sod., 2000; Burk in sod., 2003; Schiffman in sod., 2010). Tako lahko npr. metilacija in nukleotidne zamenjave znotraj regije LCR vplivajo na višje izražanje in prepisovanje virusnih onkogenov *E6* in *E7*, kar lahko pripelje do razlik v onkogenem potencialu virusa (Mazumder Indra in sod., 2011). Nekatere podtipske različice HPV-16 naj bi se zaradi značilnih genetskih sprememb v področju LCR razmnoževale hitreje od ostalih in tako neposredno predstavljale povečano tveganje za okužbo s HPV-16 oz. razvoj RMV (Hubert, 2005). Opisovanje in razumevanje različic HPV-16 je pomembno tudi za razvoj molekularne diagnostike, cepiv in drugih terapevtskih pristopov za nadzorovanje oz. preprečevanje s HPV povezanih bolezni.

Z vzporedno molekularno analizo treh področij genoma HPV-16 smo v naši raziskavi pri večjem številu slovenskih izolatov HPV-16 želeli ugotoviti, koliko in katere podtipske različice HPV-16 so zastopane pri osebah z normalno citologijo materničnega vratu oz. povzročajo nastanek predrakavih sprememb CIN3 in raka materničnega vratu, analnega kanala ter glave in vratu. Poleg tega smo z mapiranjem funkcionalnih domen LCR oz. beljakovin E6 in E7 želeli ugotoviti ali bi značilne mutacije opredeljene pri določenih različicah HPV-16, teoretično lahko vplivale na povečano oz. zmanjšano patogenost virusa.

V študijo je bilo vključenih 205 izolatov iz treh anatomskih regij. Pri HPV-16 izolatih iz predela glave in vratu smo genomsko področje *E6* pomnožili v 26/26 (100 %) primerih, *E7* v 24/26 (92,3 %) primerih in LCR v 18/26 (69,2 %) primerih. Pri analnem kanalu nam je uspelo pomnožiti 39/39 (100 %) področij genoma *E6* in *E7* ter 21/39 (53,9 %) delov genomskega področja LCR. Pri anatomske regiji materničnega vratu smo pridobili 140/140 (100 %) regij genoma *E6* in *E7* ter 139/140 (99,3 %) področij genoma LCR. Pri analnem kanalu ter regiji glave in vratu je bilo pomnoževanje genomskega področja LCR, zaradi uporabe OZ, ki niso optimalni za pomnoževanje FFPE vzorcev, manj uspešno kot pri predelu materničnega vratu. Izolati iz analnega predela ter predela glave in vratu so bili najverjetneje manj kvalitetni, saj so bili izolirani iz FFPE vzorcev pri katerih uspešnost pomnoževanja pada z dolžino pomnoževanih področij. Genomsko regijo LCR smo se kljub slabšemu pomnoževanju odločili vključiti v raziskavo, saj pomembno vpliva na izražanje genov *E6* ter *E7* in omogoča boljše filogenetsko opredelitev izolatov.

6.1 ANALIZA GENOMSKEGA PODROČJA LCR

Poleg referenčnega zaporedja smo odkrili 66 različic genomskega področja LCR, ki so se od prototipa razlikovale za ena do 16 točkastih mutacij. Različica LCR-1 z nukleotidnima zamenjavama na mestih G7193T in G7521A je bila najbolj pogosta in je bila prisotna pri 35,4 % izolatov, neodvisno od njihove anatomske lokacije. Podobno so tudi Kurvinen in sodelavci zabeležili to različico pri 37 % okužb materničnega vratu s HPV-16. Opisana različica naj nebi igrala večje vloge pri kancerogenosti, saj naj bi različice z mutacijami na mestih 7193 in 7521 imele podobno prepisovalno aktivnost kot prototip (Veress in sod., 1999; Kurvinen in sod., 2000).

Preostale različice imajo več nukleotidnih zamenjav, ki so se najpogosteje (desetkrat ali več) pojavile na mestih 7316, 7450, 7496, 7729 in 7786. Večina omenjenih nukleotidnih zamenjav se pogosto pojavlja tudi v drugih znanstvenih objavah (Hildesheim in sod., 2001; Pande in sod., 2008; Sichero in sod., 2012). Nasprotno pa smo, po pregledu dostopne literature, različice z nukleotidnimi zamenjavami na mestih; 7173, 7185, 7194, 7195, 7227, 7230, 7238, 7293, 7328, 7360, 7366, 7391, 7399, 7415, 7420, 7447, 7479, 7548, 7600, 7622, 7695, 7753, 38, 73 in 80 zabeležili prvi.

Za nukleotidne zamenjave genomskega področja LCR smo preverili ali se nahajajo znotraj vezavnih domen v raziskavah najpogosteje navedenih dejavnikov prepisovanja, SP-1, AP-1, YY1, NF-1, Oct-1 in TEF-1. Enako smo preverili za vezavne domene beljakovine E2 ter zaporedje TATA. Znotraj vezavnih mest za celične dejavnike prepisovanja SP-1, AP-1, YY1 in NF-1 smo dokazali nukleotidne zamenjave na mestih 31, 80, 7310, 7335, 7435, 7479, 7483, 7485, 7489, 7584, 7552, 7600, 7622, 7669, 7786, 7743, 7753, 7761, 7764, 7834, 7837, 7839, 7856 in 7877. Znotraj vezavnega mesta za beljakovino E2 smo dokazali nukleotidne zamenjave na mestih 43, 38 in 7868 ter znotraj zaporedja TATA (angl. TATA box) nukleotidno zamenjavo na mestu 7894. Na vezavnih mestih za celične dejavnike prepisovanja Oct-1, TEF-1 ter poliadencilacijskih mestih ni bilo zabeleženih nukleotidnih zamenjav. Dejavniki prepisovanja AP-1, NF-1, Oct-1 in SP1 preko zgodnjega promotorja p97 aktivirajo uravnavanje prepisovanja (transkripcije), medtem ko celični faktor YY1 lahko pozitivno ali negativno vpliva na regulacijo celičnega in virusnega prepisovanja genov. Zgodnji promotor HPV-16 p97, je vključen v prepisovanje *E6*, *E7* in drugih genov (Carson in Khan, 2006). V nekaterih raziskavah tako navajajo, da je sprememba v vezavnih mestih dejavnikov prepisovanja ter vezavnem mestu za beljakovino E2 lahko kritičen dejavnik za povečano izražanje zgodnjih genov, kar lahko vpliva na virusno dolgotrajnost (Liu in sod., 2002; Lace in sod., 2009; Kahla in sod., 2014).

Večina zabeleženih različic, ki so vsebovale zgoraj navedene nukleotidne zamenjave je spadalo pod evropske različice, za katere se kljub variabilnosti v področju LCR na vezavnih mestih dejavnikov prepisovanja zdi, da le-to ne vpliva na potek bolezni. Aktivnost promotorjev večine analiziranih evropskih različic LCR je namreč primerljiva z

aktivnostjo prototipa (Veress in sod., 1999; Kurvinen in sod., 2000; Kämmer in sod., 2002).

Ne-evropske različice LCR imajo za razliko od evropskih različic večji vpliv na aktivnost promotorja. Azijsko-ameriška (AA) in severno-ameriška linija (NA) vsebujeta nukleotidno zamenjavo A7729C, ki vpliva na kar tri-kratno povečano aktivnost promotorja p97 v primerjavi s prototipom (Kämmer in sod., 2002; Sichero in sod., 2012). Navedeno mutacijo smo, pri izolatih azijsko-ameriške linije, zabeležili tudi v naši raziskavi. Povečana aktivnost promotorja p97 vpliva na povečano prepisovanje virusnih onkogenov *E6* in *E7* in s tem večjo možnost za nastanek malignih transformacij celice.

6.2 ANALIZA GENA *E6*

Beljakovina E6 ima molekulsko maso 18 kDa in je sestavljena iz 158 AK. Start kodon ATG, se pri genu *E6* nahaja na poziciji 104. Beljakovina vključuje štiri motive Cys-X-X-Cys, ki formirajo dve dobro ohranjeni domeni cinkovih prstov. Pri izolatih, kjer smo analizirali beljakovino E6, nismo opazili mutacij na ohranjenih domenah cinkovih prstov. Te domene so verjetno ključnega pomena za stabilnost beljakovine. Beljakovina E6 vsebuje tudi vezavna mesta za beljakovine PDZ, ki sodelujejo pri sidranju transmembranskih beljakovin v citoskeletu in omogočajo stabilnost kompleksov, ki so odgovorni za celično signalizacijo (Thomas in sod., 2008; Mischo in sod., 2013). Analizirani izolati na teh mestih niso vsebovali mutacij.

Molekularno opredelitev gena *E6* smo uspešno izvedli pri vseh 205 izolatih, vključenih v raziskavo. Opredelili smo 23 različic gena *E6*, ki so se od referenčnega zaporedja razlikovale v enem do osmih nukleotidov ter eno različico, ki je ustrezala referenčnemu zaporedju. Referenčno zaporedje smo odkrili pri 33,7 % izolatov. Relativno nizek odstotek prototipa *E6* potrjuje predpostavljeno hipotezo, da je gen *E6* zelo variabilen (DeFilippis in sod., 2002; Wulandari in sod., 2015). Različica E6-1 je bila poleg prototipa, edina prisotna v vseh treh anatomskih regijah. E6-1, ki je vsebovala samo točkasto mutacijo T350G, se je pojavila pri 48,3 % (99/205) izolatov. Mutacija T350G, ki povzroči aminokislinsko zamenjavo L83V je bila zelo pogosta tudi pri ostalih različicah gena *E6*. Omenjeno AK zamenjavo smo tako dokazali pri 63,9 % izolatov vključenih v študijo.

Za različice gena *E6* z mutacijo T350G, v študijah na Finskem, Švedskem, Norveškem in v Franciji omenjajo, da bi lahko imele večji onkogeni potencial in da predstavljajo večjo možnost za napredovanje bolezni (Londesborough in sod., 1996; Zehbe in sod., 1998; Kurvinen in sod., 2000; Grodzki in sod., 2006; Matsumoto in sod., 2013). Specifično, naj bi bila različica z mutacijo 350G (L83V) bolj učinkovita pri vezavi z beljakovino E6BP ter v degradaciji beljakovine Bax. E6BP je vezavna beljakovina za beljakovino E6, za katero

sklepajo, da bi lahko igrala vlogo pri diferenciaciji keratinocitov posredovani s kalcijem (Liu in sod., 1999; Qmichou in sod., 2013). Beljakovina Bax pa je regulirana s strani beljakovine p53 in vpliva na apoptozo celice. Vezava beljakovine E6 na beljakovino Bax zagotavlja preprečevanje odmiranja diferenciranih keratinocitov in s tem ugodno okolje za izražanje poznih genov HPV (Shnitman-Magal in sod., 2005). Polimorfizem L83V tako verjetno interagira z naravnimi variacijami gena p53 in s tem vpliva na tveganje za nastanek raka (Qmichou in sod., 2013). Polimorfizem kodona 72 beljakovine p53 so namreč v nekaterih raziskavah povezali z razvojem HPV-povezanega RMV (Zehbe in sod., 1999; van Duin in sod., 2000; Qmichou in sod., 2013). Do nasprotnih zaključkov so prišli v študijah na Danskem, Češkem, v Italiji in Grčiji, kjer niso opazili večjih razlik v patogenosti med različicama T350T in T350G (Tornesello in sod., 2004; Gheit in sod., 2011; Tsakogiannis in sod., 2013). Kämmer in sodelavci navajajo da je onkogenost teh različic povezana tudi z geografskim področjem (Kämmer in sod., 2002). Glavni razlog tako verjetno ni v funkcionalnih spremembah beljakovine E6 temveč v izmikanju imunskemu sistemu gostitelja, saj so HPV-različice povezane s HLA haplotipi, ki se med populacijami razlikujejo (Zehbe in sod., 2001). V naši raziskavi nismo zabeležili nobene statistično značilne razlike med porazdelitvijo različic T350T ter T350G pri osebah s predrakavimi in rakavimi spremembami materničnega vratu in tistimi z normalno citologijo materničnega vratu. Obe različici sta tako predstavljali enako tveganje za nastanek RMV v Sloveniji. Namen naše raziskave je bil med drugimi ugotoviti tudi ali so različice gena *E6* z mutacijo T350T oz. T350G značilno povezane z anatomsko lokacijo okužbe, kar bi lahko pomenilo da je določen predel telesa bolj dovzeten za okužbo z eno od različic. S pomočjo porazdelitve Hi-kvadrat smo ugotovili, da med različnimi anatomskimi regijami ni bilo nobene statistično značilne razlike med porazdelitvijo različic s T350T oz. T350G. Rezultati so namreč pokazali, da je bila na treh regijah mutacija T350G prisotna v 60-77 %.

Pri 205 analiziranih izolatih smo skupno opredelili 28 mest z nukleotidnimi zamenjavami. Na vseh treh anatomskih lokacijah so se pojavile nukleotidne zamenjave G145T, C335T ter T350G, ki so povzročile AK zamenjave Q14H, H78Y in L83V. Te so bile pri izolatih materničnega vratu sicer pogostejše kot pri izolatih glave in vratu ter analnega predela. Za raziskovanje povezav med HPV različicami in anatomsko regijo so najbolj zanimive prav različice, ki povzročijo AK zamenjavo in so specifične za določeno anatomsko regijo. Različice E6-2 do -7 ter -9 in -10 so bile značilne samo za predel glave in vratu. AK zamenjave, specifične samo za predel glave in vratu so bile D25Y, S71C, P95L ter H118Y. AK zamenjava S71C, ki smo jo dokazali pri dveh izolatih, vpliva na vezavno mesto epitopa celice T (Pillai in sod., 2009). Za predel analnega kanala so bile značilne različice E6-11 do -14. V tej anatomski regiji ni bilo prisotnih specifičnih AK zamenjav. Za regijo materničnega vratu so bile specifične različice E6-15 do -23. AK zamenjave, ki jih najdemo samo v tej regiji so bile R10I, Q14D, R39Q, D64E, C80Y, K108T, Q116H in K122N. Za AK zamenjavo R10I, odkrito pri enem izolatu raka materničnega vratu,

navajajo, da bi lahko v kombinaciji z drugimi mutacijami med kodonoma 106 in 113 vodila do manjše afinitete beljakovine E6 na beljakovino p53 in s tem njene razgradnje (Stöppler in sod., 1996). Kljub navedbam so ugotovitve slabo dokumentirane (Boumba in sod., 2015). Za AK zamenjavo Q14D, ki smo jo dokazali pri enem izolatu raka materničnega vratu, navajajo, da lahko povzroči razlike v afiniteti vezave z beljakovino p53 in s tem poveča stopnjo njene degradacije (Boumba in sod., 2015). Odsotnost beljakovine p53 pomeni nadaljevanje celičnega cikla s poškodovano DNK in nastanek mutacij, kar je eden glavnih dejavnikov tveganja za napredovanje predrakavih sprememb. Različica z AK zamenjavo Q116H, ki smo jo dokazali pri enem izolatu raka materničnega vratu, pa naj nebi bila učinkovita pri induciranju degradacije beljakovine E6TP1 (angl. *E6 target protein 1*), ki je pomembna za stabilno vzdrževanje virusnih episomov in podaljšanje življenjske dobe celice (Gao in sod., 2001, Lee in sod., 2007). Kljub navedbam je to področje še slabo raziskano (Boumba in sod., 2015).

Chen in sodelavci v raziskavi navajajo, da so kodoni 10, 14 ter 83 pod selekcijskim pritiskom. To pomeni, da lahko različica z mutacijo na tem mestu pridobi lastnosti, ki ji dajejo selekcijsko prednost (Yamada in sod., 1995; DeFilippis in sod., 2002; Chen in sod., 2005). S časom lahko proces pozitivne selekcije preko mnogih generacij privede do prilagoditve (skozi kombinacijo naključnih sprememb) lastnosti ter naravnem izboru tistih virusov, ki so najprimernejši za neko okolje. V nekaterih raziskavah navajajo, da naj bi različice z AK zamenjavami R10G/L83V ter Q14H/H78Y/L83V bolj podvržene pozni celično-inducirani apoptozi kot prototip E6. Ti podatki kažejo, da HPV-16 pod določenimi pogoji raje sprožijo apoptozo celice, kot da bi jo zavrli. Eden možnih vzrokov za to je lahko sproščanje virusnih delcev in s tem dolgotrajnost okužbe ter prenos na nove gostitelje (Zehbe in sod., 2009; Qmichou in sod., 2013). R10G naj bi prav tako spremenila vezavni epitop B, kar lahko vpliva na prepoznavo s strani citotoksičnih limfocitov T (Chen in sod., 2005). Pri izolatih, vključenih v našo študijo, smo opazili, da imata kodona 10 in 14, vsak po dve različni nukleotidni zamenjavi, kar lahko nakazuje na selekcijski pritisk na tem območju proteina E6 (Yamada in sod., 1995).

V naših hipotezah smo predpostavili, da ni razlik v razporeditvi podtipskih različic HPV-16 med področjem glave in vratu ter anogenitalnim predelom. V študiji na Švedskem so primerjali različice iz področja glave in vratu ter materničnega vratu in ugotovili, da bila AK zamenjava R10G relativno pogosta (19 %) pri raku glave in vratu, pri RMV pa ni bila prisotna. Med možnimi razlogi navajajo možnost, da je omenjena različica zaradi neznanega razloga pogostejša v predelu glave in vratu kot v anogenitalnem predelu ali pa da predstavlja večje tveganje za raka glave in vratu (Du in sod., 2012). AK zamenjava R10G je na N-terminalnem koncu beljakovine in vpliva na modifikacijo vezavnega epitopa HLA-B7, kar lahko vpliva na prepoznavo citotoksičnih limfocitov B/T (Ellis in sod., 1995; Zehbe in sod., 1998; Pillai in sod., 2009; Qmichou in sod., 2013). Naša raziskava je pripeljala do drugačnih ugotovitev, AK zamenjava R10G se namreč pri raku glave in vratu sploh ni pojavila, pri raku v anogenitalni regiji pa je bila prisotna pri treh izolatih (3,0 %).

Mutacija R10G je omenjena tudi v nekaterih študijah RMV, vendar je zelo redka. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da se sicer pojavljajo različice beljakovine E6, ki so specifične za določeno anatomsko regijo, vendar je njihova pogostost v populaciji zelo nizka.

Po podatkih iz dostopne literature smo mutacije na mestih C387T, A451C, C455T in G469C opisali prvi. Nukleotidni zamenjavi na mestih 387 in 455 sta bili značilni za predel glave in vratu in sta povzročili AK zamenjavi P95L ter H118Y. Nukleotidni zamenjavi na mestih 451 ter 469 pa sta se pojavili pri izolatih materničnega vratu in povzročili AK zamenjavi Q116H ter K122N. Vpliv omenjenih mutacij bi bilo potrebno dodatno raziskati, saj lahko igrajo vlogo pri tumorigenosti virusa. Pri tem je potrebno opozoriti, da je domneva, da so različice beljakovine E6 določene samo z eno ali dvema spremembama AK napačna, na delovanje beljakovine E6 lahko namreč vpliva tudi kombinacija več spremenljivih AK.

6.3 ANALIZA GENA *E7*

Beljakovina E7 ima molekulsko maso 21 kDa in je sestavljena iz 98 AK. Start kodon ATG, se pri genu *E7* nahaja na poziciji 562. Beljakovina E7 vključuje dva motiva Cys-X-X-Cys, oz. eno domeno cinkovih prstov. Pri vseh izolatih je na beljakovini E7 prisotna vezavna domena pRB, ki je potrebna za vezavo beljakovine E7 z rentinoblastoma tumor supresorsko beljakovino (pRB). Pri izolatih, kjer smo analizirali beljakovino E7, nismo opazili mutacij na ohranjenih domenah cinkovih prstov in pRB. Sprememba AK zaporedja v navedenih domenah bi lahko vodila do spremembe funkcionalnosti oz. aktivnosti beljakovine.

Molekularno opredelitev gena *E7* smo uspešno izvedli pri 203 izolatih, vključenih v raziskavo. Poleg referenčnega zaporedja smo odkrili 10 različic gena *E7*, ki so se med seboj razlikovale v eni do treh nukleotidnih zamenjavah. Najbolj pogosta različica je bila enaka prototipu in se je pojavila pri 82,3 % (167/203) izolatov. Mutacija A822G je bila pri vključenih izolatih prisotna največkrat (23/203). Poleg različice E7-1, ki vključuje mutacijo A822G, je bila v vseh treh regijah prisotna tudi različica E7-2, z mutacijami na mestih T732C, T789C in T795G. Boumba in sodelavci v raziskavi iz leta 2015 navajajo, da sta T789C in T795G najpogostejše prisotni mutaciji v genu *E7* HPV-16. Nobena izmed teh nukleotidnih zamenjav ne povzroči AK zamenjave.

Ostale različice gena *E7* so bile značilne za določeno anatomsko regijo. Različice E7-3, -4 in -5 so bile tako prisotne samo v predelu glave in vratu. Vse te različice so vključevale mutacije, ki so povzročile AK zamenjave na mestih M12I, E33K oz. D36N, vendar niso bile pogoste (0,5 % oz. 1/203). Različice E7-6, -7 in -8 so bile značilne za analni predel. Različica E7-6 vsebuje mutacijo, ki povzroči spremembo AK na kodonu S63C, ostali dve

različici pa nimata mutacij, ki bi vplivale na zgradbo beljakovine. Različici E7-9 ter -10 sta bili specifični za predel materničnega vratu. E7-10 ni vplivala na AK zaporedje, medtem ko je E7-9 povzročila AK zamenjavo na mestu 29. Song in sodelavci so leta 1997 prišli do zaključka, da je AK zamenjava N29S na beljakovini E7 pod selekcijskim pritiskom in povezana z nastankom raka, saj se nahaja znotraj imunoreaktivnega področja (Zehbe in sod., 1998). AK zamenjava N29S je značilna za podlinijo C1 (Af-2), kar smo dokazali tudi v naši študiji. Navajajo tudi, da se pogosteje se nahaja v azijski populaciji kot v evropski, kar pomeni, da so mutacije na genu *E7* prav tako geografsko značilne (Wu in sod., 2006; Qmichou in sod., 2013).

Mutacije, ki so vplivale na zgradbo beljakovine E7, so bile relativno redko prisotne in so se pojavile le pri 2,5 % (5/203) izolatov, ostalih 97,5 % (198/203) izolatov ni imelo spremenjenega AK zaporedja. Razlog za nizko variabilnost oz. pomanjkanje nesinonimnih mutacij v genu *E7* je lahko optimalno delovanje beljakovine E7 in dejstvo, da so lahko različice z mutacijami zaradi spremenjenih lastnosti manj učinkovite kot prototip. Druga teorija razlaga, da beljakovina zaradi svoje pozicije ne dopušča mutacij, saj bi AK spremembe lahko povzročile spremembo v zvijanju beljakovine (Safaeian in sod., 2010). Visok odstotek izolatov brez mutacij v naši študiji je tako potrdil našo hipotezo in navedbe drugih raziskav, da je za gen *E7* značilna manjša variabilnost oz. da terciarna struktura beljakovine E7 ne dopušča večjih aminokislinskih zamenjav (Zehbe in sod., 1998; Swan in sod., 2005; Tsakogiannis in sod., 2013).

Po podatkih iz dostopne literature smo nukleotidne zamenjave na mestih C749G, G762A, C765T in T796C opisali prvi. Prve tri mutacije so specifične za analno regijo (glej zgoraj), medtem ko je bila mutacija T796C prisotna pri izolatu CIN3, izoliranem iz materničnega vratu. Mutacija na mestu C749G je povzročila AK zamenjavo S63C, ostale navedene mutacije pa niso povzročile AK zamenjave. Omenjene mutacije bi bilo potrebno dodatno raziskati in s tem pojasniti njihov morebitni vpliv na razvoj bolezni.

6.4 FILOGENETSKA ANALIZA REZULTATOV

Glede na izvor in geografsko porazdelitev, različice HPV-16 lahko razdelimo v različne filogenetske linije; evropsko (podlinije A1-3), azijsko (podlinija A4), afriško-1 (podlinije B1-2), afriško-2 (podlinije C1), severno-ameriško (podlinija D1) in azijsko-ameriško (podliniji D2-3) (Burk in sod., 2013).

Raziskave navajajo, da so ne-evropske različice HPV-16 (linije B, C, D) bolj patogene kot evropske različice (linija A). Ne-evropske različice HPV-16, so bile po navedbah bolj dolgotrajne in so hitreje napredovale v predrakave spremembe, vendar je potrebno upoštevati tudi interakcije med genomom virusa in gostitelja. V primeru, da imata virus in gostitelj skupen geografski izvor je dolgotrajnost okužbe s HPV višja (Villa in sod., 2000;

Xi in sod., 2006; Xi in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Burk in sod., 2013; Freitas in sod., 2014). V nekaterih študijah so izpostavili azijsko-ameriško linijo (podliniji D2 in D3), ki v delu genoma *E6* vsebuje šest točkastih mutacij (Smith in sod., 2011; Tornesello in sod., 2011). Tri izmed teh so nesinonimne in so povzročile spremembe v AK zaporedju (Q14H, H78Y in L83V). Azijsko-ameriške različice so v primerjavi z evropskimi različicami povezali z večjim tveganjem za nastanek RMV, afriške-2 različice pa z višjim tveganjem za nastanek CIN3. Azijsko-ameriške različice so prav tako povezane z bistveno zgodnejšim pojavom raka. V raziskavi, izvedeni v Mehiki, so bili namreč pacienti z azijsko-ameriško različico 7,7 let mlajši od tistih z evropsko različico (Berumen in sod., 2001; Zehbe in sod., 2001). Azijsko-ameriške različice so med drugim povezane tudi s podtipom raka. V primerjavi z evropskimi različicami jih večkrat povezujejo z žleznim karcinomom (Berumen in sod., 2001; Burk in sod., 2003). Različice azijsko-ameriške ali severno-ameriške linije so pod vplivom polimorfizmov v genskem področju LCR, medtem ko so evropske linije povezane predvsem s polimorfizmom gena *E6* in ne področja LCR (Kämmer in sod., 2002). Mesto polimorfizmov bi bilo tako lahko ključnega pomena za napredovanje v rakave spremembe (Zuna in sod., 2009).

Vrtačnik Bokalova in sodelavci so leta 2011 v študiji pokazali, da v etnično zaprti populaciji žensk z RMV v Sloveniji prevladujejo evropske različice HPV-16. Navajajo tudi dejstvo, da imajo evropske različice navkljub višjemu onkogenemu potencialu ne-evropskih različic, dovolj visok onkogeni potencial za nastanek malignih sprememb materničnega vratu. V naši študiji smo dodatno dokazali, da so v isti populaciji raki anusa in glave prav tako v večji meri povezani z evropskimi različicami.

S pomočjo filogenetskega drevesa smo v naši raziskavi želeli izolate razvrstiti v deset svetovnih podlinij. Kot smo pričakovali se je večina (96,6 %) slovenskih izolatov HPV-16 uvrstila med evropske različice, sedem (3,4 %) izolatov pa se je uvrstilo med ne-evropske različice. Do podobnih zaključkov so prišli tudi na Danskem in v Franciji, kjer je 97 % in 95 % različic pripadalo evropski liniji (Gheit in sod., 2011). Evropske različice analiziranih izolatov spadajo v linijo A oz. podliniji A1 ali A2. Upoštevajoč genomska področja LCR, E6 ter E7 se podliniji A1 in A2 se razlikujeta v deset nukleotidnih zamenjavah (največ v genotipskem področju LCR), vendar kot je razvidno iz rezultatov, nismo opazili nobene statistično značilne razlike med porazdelitvijo različic v podliniji A1 in A2 pri različnih stopnjah razvoja bolezni ter prav tako nobene povezave teh podlinij s specifičnim anatomskim mestom okužbe.

Med sedmimi ugotovljenimi ne-evropskimi različicami, je izolat CC68 (različice LCR-10, E6-23 in E7-9) spadal v podlinijo C1, izolati AC59 (različice E6-13 in E7-2), HNC19 (različice LCR-14, E6-7 in E7-2) in CC101 (različice LCR-30, E6-17 in E7-2) v podlinijo D2 ter izolati NILM10 (različice LCR-53, E6-22 in E7-2), CC54 (različice LCR-37, E6-22 in E7-2) in 335CIN3 (različice LCR-49, E6-22 in E7-2) v podlinijo D3. V podlinijo D3 so se umestili trije izolati materničnega vratu z različno stopnjo napredovanja bolezni;

normalna citologija, CIN3 in rak. Ob upoštevanju dejstva, da azijsko-ameriška različica predstavlja večje tveganje za razvoj raka, obstaja velika verjetnost, da bo bolezen pri pacientkah z normalno citologijo in predrakavimi spremembami napredovala v RMV.

Ne-evropske različice so se pri vključenih izolatih pojavile v vseh treh anatomskih regijah, kar pomeni da nobena izmed treh regij ni bolj izpostavljena oz. podvržena okužbi s temi različicami. V primerjavi z evropskimi različicami imajo ne-evropske različice več točkastih mutacij. Prav tako se pri ne-evropskih različicah pojavi več AK zamenjav, ki povzročijo spremembo v sestavi beljakovin E6 in E7.

7 SKLEPI

- V magistrskem delu smo molekularno in filogenetsko opredelili 205 izolatov HPV-16. Od tega je bilo iz anogenitalne regije 53 izolatov HPV-16 osamljenih iz brisov materničnega vratu z normalno citologijo, 25 iz brisov predrakavih sprememb materničnega vratu CIN3, 62 iz brisov ali tkivnih vzorcev karcinoma materničnega vratu ter 39 iz tkivnih vzorcev karcinoma analnega kanala. Poleg izolatov anogenitalnega predela je bilo vključenih tudi 26 tkivnih vzorcev karcinoma glave in vratu.
- S pomočjo osnovne in pol-vgnezdene reakcije PCR smo uspeli pomnožiti 178 genomskih področij LCR, 205 genomskih področij *E6* ter 203 genomskih področij *E7*. Za pomnoževanje genomskih področij LCR, *E6* ter *E7* smo uporabili več kompletov tipsko-značilnih OZ med katerimi so bili nekateri izdelani in uporabljeni že v predhodnih raziskavah, druge pa smo izdelali v sklopu magistrskega dela.
- V raziskavi smo odkrili številne podtipske različice HPV-16. Genomsko področje LCR HPV-16 je bilo zelo variabilno, le 3,9 % izolatov je bilo namreč enakih prototipu. Poleg prototipa smo zabeležili 66 različic.
- Ugotovili smo, da je bil gen *E6* HPV-16 veliko bolj variabilen kot gen *E7* HPV-16. Pri genu *E7* je bilo kar 82,3 % izolatov identičnih prototipu medtem ko je bilo pri genu *E6* le 33,7 % izolatov enakih kot prototip. Pri genu *E6* smo poleg prototipa odkrili 22 različic pri genu *E7* pa 10 različic.
- Prvi smo opredelili nekatere mutacije oz. nove različice genomskih področij LCR, *E6* in *E7* HPV-16. Nekatere izmed teh različic povzročijo spremembo AK zaporedja. Vlogo novoodkritih mutacij bi bilo potrebno dodatno raziskati, saj lahko igrajo vlogo pri tumorigenosti virusa.
- Z mapiranjem funkcionalnih domen LCR smo ugotovili, da bi značilne mutacije, opredeljene pri določenih različicah HPV-16, teoretično lahko vplivale na povečano oz. zmanjšano patogenost virusa.
- Beljakovina E6 HPV-16 vključuje dve dobro ohranjeni domeni cinkovih prstov, ki sta ključnega pomena za stabilnost beljakovine ter vezavna mesta za beljakovine PDZ, ki sodelujejo pri sidranju transmembranskih beljakovin v citosketu in omogočajo stabilnost kompleksov, odgovornih za celično signalizacijo. Pri analiziranih izolatih nismo opazili mutacij na teh dveh vezavnih mestih.

- Mutacija z nukleotidno zamenjavo T350G ki povzroči aminokislinsko zamenjavo L83V se pojavi pri 63,9 % izolatov. Različice gena *E6* z mutacijo T350T oz. T350G niso značilno povezane z anatomsko lokacijo okužbe. Prav tako med različnimi anatomskimi regijami ni nobene statistično značilne razlike med porazdelitvijo različic s T350T oz. T350G.
- Pri izolatih, vključenih v študijo, smo opazili, da imata kodona 10 in 14 vsak po dve različni nukleotidni zamenjavi, kar lahko nakazuje na selekcijski pritisk na tem območju proteina E6.
- Beljakovina E7 HPV-16 vključuje eno, dobro ohranjeno, domeno cinkovih prstov, prav tako je na beljakovini E7 prisotna vezavna domena pRb, ki je potrebna za vezavo tumor supresorske beljakovine retinoblastoma. Pri analiziranih izolatih nismo opazili mutacij na teh dveh vezavnih mestih.
- Mutacije, ki vplivajo na zgradbo beljakovine E7, so relativno redko prisotne in se pojavijo le pri 2,5 % vključenih izolatov.
- S filogenetsko analizo smo ugotovili, da večina (96,6 %) različic spada pod evropsko linijo, manjši odstotek (3,4 %) pa pod ne-evropsko linijo. Med razporeditvijo evropskih različic v skupini A1 in A2 nismo opazili nobene statistično značilne razlike. Med ne-evropskimi izolati eden spada v podlinijo C1 (Af-2), ter šest v podliniji D2 in D3 (AA). Ne-evropske različice so se pojavile v vseh treh anatomskih regijah, kar pomeni, da nobena izmed regij ni bolj podvržena okužbi z ne-evropsko različico.
- Določene različice HPV-16 se pojavljajo v vseh treh regijah, medtem ko so druge specifične samo za določeno regijo. Kljub temu ni večjih razlik med razporeditvijo podtipskih različic HP-16 med področjem glave in vratu ter anogenitalnem predelu.
- Spremljanje različic HPV-16 je pomembno tako za razvoj molekularne diagnostike kot za boljše razumevanje patogeneze HPV pri nastanku razvoja bolezni ter s tem razvoja cepiv in drugih terapevtskih pristopov.

8 POVZETEK

Rak materničnega vratu je v manj razvitih državah sveta drugo najpogostejše rakavo obolenje žensk. Razvije se preko več stopenj predrakavih sprememb. Za nastanek je nujno potrebna dolgotrajna okužba s HPV. Med visokorizičnimi genotipi je HPV-16 najbolj pomemben in je odgovoren za 50-60 % primerov RMV. HPV-16 povezujemo tudi z vrsto drugih bolezni med drugim z 70-90 % HPV-pozitivnih primerov raka ustnega dela žrela ter okrog 80 % primerov raka analnega kanala.

Gena *E6* in *E7* sta med vsemi geni najbolj raziskana. Povečano izražanje virusih beljakovin E6 in E7 vpliva na beljakovini p53 in pRb, ki sta glavna zaviralca nastanka rakavih celic. Nepravilno delovanje p53 in pRb lahko pripelje do napredovanja okužbe oz. do razvoja predrakavih in rakavih sprememb. Genomsko področje LCR je prav tako pomembno, saj vsebuje vezavna mesta za dejavnike prepisovanja, zgodnje virusne promotorje, ojačevalce in zaviralne uravnalne beljakovine ter vezavna mesta za beljakovino E2, kar vpliva na prepisovanje onkogenov *E6* in *E7*.

Glede na izvor lahko različice razdelimo na različne filogenetske linije; evropsko (podlinije A1-3), azijsko (podlinija A4), afriško-1 (podlinije B1-2), afriško-2 (podlinije C1), severno-ameriško (podlinija D1) in azijsko-ameriško (podliniji D2-3). Razlikovanje med filogenetskimi linijami je zelo pomembno, saj raziskave navajajo, da so okužbe z ne-evropskimi različicami (B, C in D) bolj dolgotrajne in hitreje napredujejo v rakave spremembe.

V magistrskem delu smo želeli opredeliti podtipske različice izolatov HPV-16, osamljenih iz predela glave in vratu ter anogenitalnega predela in ugotoviti katerim evolucijskim vejam pripadajo. S pomočjo tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov smo uspešno pomnožili 178 področij genoma LCR, 205 genov *E6* ter 203 genov *E7*. Pridelkom smo določili nukleotidno zaporedje genov in jih s pomočjo poravnave primerjali s prototipom. Na podlagi teh nukleotidnih zaporedij smo potem izdelali frekvenčne tabele in filogenetsko umestili različice HPV-16.

Glede na naše rezultate in rezultate predhodno objavljenih študij lahko zaključimo, da sta genomski področji LCR ter *E6* v primerjavi z *E7* veliko bolj polimorfni. Za filogenetsko opredelitev različic bi bila dovolj že LCR in *E6* dela genoma, *E7* namreč zaradi pomanjkanja specifičnih točkastih mutacij ni primeren za tovrstne analize. Po podatkih iz dostopne literature smo mutacije na nekaterih mestih genomskih področij LCR, *E6* in *E7* opisali prvi. Med različicami različnih anatomskih mest ni večjih razlik. Nekaterne mutacije so sicer specifične samo za določeno anatomsko regijo vendar je njihova pogostost v populaciji zelo nizka.

Slovenija je etnografsko zaprto področje, zato se po pričakovanjih večina izolatov umešča v evropske različice, manjši delež (3,4 %) izolatov pa spada med ne-evropske različice. Kljub višjemu onkogenemu potencialu ne-evropskih različic, imajo evropske različice v Sloveniji dovolj visok onkogeni potencial za napredovanje okužbe v rakave spremembe. Različica T350G je v nekaterih državah povezana z večjo možnostjo napredovanja bolezni. V naši raziskavi smo ugotovili, da različica T350G ni statično povezana z napredovanjem bolezni ali z določeno anatomske regijo. Zdi se celo, da bo različica s to mutacijo presegla prototip.

Biokemijske in biološke razlike med različicami HPV-16 lahko vplivajo na onkogeni potencial virusa. Teoretično lahko nesinonimne mutacije tudi spremenijo tarčne epitope virusa za cepiva proti HPV, vendar je potrebno upoštevati, da mutacije genomov teh virusov potekajo izjemno počasi in skozi dolgo časovno obdobje. Spremljanje različic HPV tako ni pomembno samo iz vidika evolucije virusa, vendar tudi iz vidika razumevanja patogeneze HPV in preprečevanja virusnih okužb. Različice lahko služijo tudi kot označevalci v različnih epidemioloških in etioloških raziskavah HPV. Z opisom različic HPV prispevamo tudi k razvoju in posodabljanju molekularnih testov in cepiv proti HPV.

9 VIRI

9.1 CITIRANI VIRI

- Aleman L., Saunier M., Alvarado-Cabrero I., Quirós B., Salmeron J., Shin H. R., Pirog E. C., Guimerà N., Hernandez-Suarez G., Felix A., Clavero O., Lloveras B., Kasamatsu E., Goodman M. T., Hernandez B. Y., Laco J., Tinoco L., Geraets D. T., Lynch C. F., Mandys V., Poljak M., Jach R., Verge J., Clavel C., Ndiaye C., Klaustermeier J., Cubilla A., Castellsagué X., Bravo I. G., Pawlita M., Quint W. G., Muñoz N., Bosch F. X., de Sanjosé S. 2015. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *International Journal of Cancer*, 136, 1: 98-107
- Anantharaman D., Gheit T., Waterboer T., Waterboer T., Abedi-Ardekani B., Carreira C., McKay-Chopin S., Gaborieau V., Marron M., Lagiou P., Ahrens W., Holcatova I., Lagiou P., Ahrens W., Holcátová I., Merletti F., Kjaerheim K. A., Talamini R., Simonato L., Castellsague X., Macfarlane T. V., Biggs A. M., Thakker N., Znaor A., Thomson P., Canova C., Conway D. I., Healy C. M., Tommasino M., Pawlita M., Brennan P. 2013. Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 8: 536-545
- Ankola A. A., Smith R. V., Burk R. D., Prystowsky M. B., Sarta C., Schlecht N. F. 2013. Comorbidity, human papillomavirus infection and head and neck cancer survival in an ethnically diverse population. *Oral Oncology*, 49: 911-917
- Arrayit corporation.
http://www.arrayit.com/Products/DNA_Purification/Microarray_Probe_Purification/microarray_probe_purification.html (marec 2016)
- Benowitz S. I. 2003. New Look for Papillomavirus. *Howard Hughes Medical Insitute Bulletin*, 16, 2: 37
- Bernard H. U., Burk D. R., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 1: 70-79
- Bernard H. U., Calleja-Macias I. E., Dunn S. T. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118: 1071-1076
- Berumen J., Ordoñez R. M., Lazcano E., Salmeron J., Galvan S. C., Estrada R. A., Yunes E., Garcia-Carranca A., Gonzalez-Lira G., Madrigal-de la Campa A. 2001. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 17: 1325-1330
- Bjørge T., Engeland A., Luostarinen T., Mork J., Gislefoss R. E., Jellum E., Koskela P., Lehtinen M., Pukkala E., Thoresen S., Dilner J. 2002. Human papillomavirus infection as a risk factor for anal and perianal skin cancer in a prospective study. *British Journal of Cancer*, 87, 1: 61-64

- Boumba L. M. A., Qmichou Z., Mouallif M., Attaleb M., Mzibri M. E., Hilali L., Donatien M., Ennaji M. M. 2015. Human papillomavirus genotypes distribution by cervical cytologic status among women attending the General Hospital of Loandjili, Pointe-Noire, Southwest Congo (Brazzaville). *Journal of Medical Virology*, 87, 10: 1769-1776
- Buck C. B., Day P. M., Trus B. L. 2013. The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, 445: 169-174
- Burk R. D., Harari A., Chen Z. 2013. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445: 232-243
- Burk R. D., Terai M., Gravitt P. E., Brinton L. A., Kurman R. J., Barnes W. A., Greenberg M. D., Hadjimichael O. C., Fu L., McGowan L., Mortel L., Schwartz P. E., Hildesheim A. 2003. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Research*, 63: 7215-7220
- Cardesa A., Nadal A. 2011. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 20, 3: 161-173
- Carson A., Khan S. A. 2006. Characterization of Transcription Factor Binding to Human Papillomavirus Type 16 DNA during Cellular Differentiation. *Journal of Virology*, 80, 9: 4356-4362
- Chaturvedi A. K. 2012. Epidemiology and Clinical Aspects of HPV in Head and Neck Cancers. *Head and Neck Pathology*, 6: 16-24
- Chen Z., Terai M., Fu L., Herrero R., DeSalle R., Burk R. D. 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *Journal of Virology*, 79, 11: 7014-7023
- Chi A.C., Day T.A., Neville B. W. 2015. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65, 5:401-421
- Clark M. A., Hartley A., Geh J. I. 2004. Cancer of the anal canal. *The Lancet Oncology*, 5, 3: 149-157
- Cornet I., Gheit T., Clifford G., Combes J. D., Dalstein V., Franceschi S., Tommasino M., Clavel C. 2013. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infectious Agents and Cancer*, 8, 1: 1-5
- Cornet I., Gheit T., Franceschi S., Vignat J., Burk R. D., Sylla B. S., Tommasino M., Clifford G. M. 2012. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86, 12: 6855-6861
- Crow J. M. 2012. HPV: The global burden. *Nature*, 488, 7413: S2-S3
- Cubie H. A. 2013. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445: 21-34

- de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- DeFilippis V. R., Ayala F. J., Villarreal L. P. 2002. Evidence of Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 E6 But Not E7 Oncogenes. *Journal of Molecular Evolution*, 55, 4: 491-499
- Donne A. J., Hampson L., Homer J. J., Hampson I. N. 2010. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 74, 1: 7-14
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110, 5: 525-541
- Doorbar J. 2007. Papillomavirus Life Cycle Organization and Biomarker Selection. *Disease Markers*, 23, 4: 297-313
- Doorbar J., Campbell D., Grand R. J., Gallimore P. H. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *The EMBO Journal*, 5, 2: 355-362
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25: 2-23
- Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I. G., Stoler M., Broker T. R., Stanley M. A. 2012. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30, 5: 55-70
- Drummond A. J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1: 1-8
- D'Souza G., Kreimer A. R., Viscidi R., Pawlita M., Fakhry C., Koch W. M., Westra W. H., Gillison M. L. 2007. Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 356, 19: 1944-1956
- Du J., Nordfors C., Näsman A., Sobkowiak M., Romanitan M., Dalianis T., Ramqvist T. 2012. Human Papillomavirus (HPV) 16 E6 Variants in Tonsillar Cancer in Comparison to Those in Cervical Cancer in Stockholm, Sweden. *PLoS ONE*, 7, 4:e36239, doi:10.1016/j.virol.2004.03.033: 6 str.
- Ellis J. R. M., Keating P. J., Baird J., Hounsell E. F., Renouf D. V., Rowe M., Hopkins D., Duggan-Keen M. F., Bartholomew J. S., Young L. S., Stern P. L. 1995. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Medicine*, 1: 464-470, doi:10.1038/nm0595-464
- Franceschi S., Muñoz N., Bosch X. F., Snijders P. J., Walboomers J. M. 1996. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5, 7: 567-575

- Frisch M., Glimelius B., van den Brule A. J. C., Wohlfahrt J., Meijer C. J. L. M., Walboomers J. M. M., Goldman S., Svensson C., Adami H. O., Melbye M. 1997. Sexually Transmitted Infection as a Cause of Anal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 337, 19: 1350-1358
- Freitas L. B., Chen Z., Muqui E. F., Boldrini N. A., Miranda A. E., Spano L. C., Burk R. D. 2014. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS ONE*, 9, 7: e100746, doi:10.1371/journal.pone.0100746: 7 str.
- Gambhira R., Karanam B., Jagu S., Roberts J. N., Buck C. B., Bossis I., Alphs H., Culp T., Christensen N. D., Roden R. B. S. 2007. A Protective and Broadly Cross-Neutralizing Epitope of Human Papillomavirus L2. *Journal of Virology*, 81, 24: 13927-13931
- Gao Q., Singh L., Kumar A., Srinivasan S., Wazer D. E., Band V. 2001. Human Papillomavirus Type 16 E6-Induced Degradation of E6TP1 Correlates with Its Ability To Immortalize Human Mammary Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 75, 9: 4459-4466
- Gheit T., Cornet I., Clifford G. M., Iftner T., Munk C., Tommasino M., Kjaer S. K. 2011. Risks for Persistence and Progression by Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages Among a Population-Based Sample of Danish Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20, 7: 1315-1321
- Gillison M. L., Koch W. M., Capone R. B., Spafford M., Westra W. H., Wu L., Zahurak M. L., Daniel R. W., Viglione M., Symer D. E., Shah K. V., Sidransky D. 2000. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 9: 709-720
- Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, International Agency for Research on Cancer
<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (februar 2016)
- Grodzki M., Besson G., Clavel C., Arslan A., Franceschi S., Birembaut P., Tommasino M., Zehbe I. 2006. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16 E6-350G Variant. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15, 4: 820-822
- Haedicke J., Iftner T. 2016. A review of the clinical performance of the Aptima HPV assay. *Journal of Clinical Virology*, 76, 1: S40-S48, doi:10.1016/j.jcv.2015.10.027
- Herrero R., Castellsagué X., Pawlita M., Lissowska J., Kee F., Balaram P., Rajkumar T., Sridhar H., Rose B., Pintos J., Fernandez L., Idris A., Sanchez M. J., Nieto A., Talamini R., Tavani A., Bosch F. X., Reidel U., Snijders P. J., Meijer C. J., Viscidi R., Munoz N., Franceschi S. 2003. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 23: 1772-1783

Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., Rodriguez A., Bratti M. C., Sherman M. E., Scarpidis U., Lin Q. Q., Terai M., Bromley R. L., Buetow K., Apple R. J., Burk R. D. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 93, 4: 315-318

HMMERALIGN, Arts & Sciences, Department of Biology.
<http://www.biology.wustl.edu/gcg/hmmeralign.html> (marec 2016)

Hoots B. E., Palefsky J. M., Pimenta J. M., Smith J. S. 2009. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *International Journal of Cancer*, 124, 10: 2375-2383

Howie H. L., Katzenellenbogen R. A., Galloway D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384, 2: 324-334, doi:10.1016/j.virol.2008.11.017

Hubert W. G. 2005. Variant Upstream Regulatory Region Sequences Differentially Regulate Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication throughout the Viral Life Cycle. *Journal of Virology*, 79, 10: 5914-5922

International Human Papillomavirus Reference Center. 2012. Karolinska Institutet.
<http://ki.se/en/labmed/international-hpv-reference-center> (april 2016)

Jančar N., Kocjan B. J., Poljak M., Lunar M. M., Vrtačnik Bokal E. 2009. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 145: 184-188

Jančar N., Vrtačnik Bokal E. 2010. Predrakave spremembe materničnega vratu. *Medicinski razgledi*, 49: 275-284

Jemal A., Simard E. P., Dorell C., Noone A. M., Markowitz L. E., Kohler B., Ehemann C., Saraiya M., Bandi P., Saslow D., Cronin C. A., Watson M., Schiffman M., Heneley S. J., Schymura M. J., Anderson R. N., Yankey D., Edwards B. K. 2013. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2009, Featuring the Burden and Trends in Human Papillomavirus (HPV)–Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 3: 175-201

Kahla S., Kochbati L., Hammami S., Badis Chanoufi M., Maalej M., Oueslati R. 2014. Sequence Variation in the E2-Binding Domain of HPV 16 and Biological Function Evaluation in Tunisian Cervical Cancers. *BioMed Research International*, 2014, ID639321, doi:10.1155/2014/639321: 8 str.

Kocjan B. J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41-61

Komloš K. F., Kocjan B. J., Kosorok P., Rus T., Toplak J., Bunic M., Poljak M. 2011. Distribution of HPV genotypes in Slovenian patients with anal carcinoma: preliminary results. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 20, 3: 141-143

- Kovanda A., Juvan U., Sterbenc A., Kocjan B. J., Seme K., Jancar N., Vrtacnik Bokal E., Poljak M. 2009. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 18, 2: 47-52
- Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjänen K., Syrjänen S. 2000. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *European Journal of Cancer*, 36, 11: 1402-1410
- Kämmer C., Tommasino M., Syrjänen S., Delius H., Hebling U., Warthorst U., Pfister H., Zehbe I. 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *British Journal of Cancer*, 86, 2: 269-273
- Lace M. J., Isacson C., Anson J. R., Lörincz A. T., Wilczynski S. P., Haugen T. H., Turek L. P. 2009. Upstream Regulatory Region Alterations Found in Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Isolates from Cervical Carcinomas Increase Transcription, ori Function, and HPV Immortalization Capacity in Culture. *Journal of Virology*, 83, 15: 7457-7466
- Lee C., Wooldridge T. R., Laimins L. A. 2007. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology*, 358, 1: 201-210
- Lee H. J., Zheng J. J. 2010. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Communication and Signaling*, 28, 8: 8, doi: 10.1186/1478-811X-8-8: 18 str.
- Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P. J., Clifford G. M. 2010. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer*, 128, 4: 927 -935
- Liu X., Yuan H., Fu B., Disbrow G. L., Apolinario T., Tomaić V., Kelley M. L., Baker C. C., Huibregtse J., Schlegel R. 2005. The E6AP Ubiquitin Ligase Is Required for Transactivation of the hTERT Promoter by the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 11: 10807-10816
- Liu Y., Chen J. J., Gao Q., Dalal S., Hong Y., Mansur C. P., Band V., Androphy E. J. 1999. Multiple Functions of Human Papillomavirus Type 16 E6 Contribute to the Immortalization of Mammary Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 73, 9: 7297-7307
- Liu Y., Li J. Z., Yuan X. H., Adler Storthz K., Chen Z. 2002. An Ap-1 Binding Site Mutation in HPV-16 LCR Enhances E6/E7 Promoter Activity in Human Oral Epithelial Cells. *Virus Genes*, 24, 1: 29-37

- Londesborough P., Ho L., Terry G., Cuzick J., Wheeler C., Singer A. 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *International Journal of Cancer*, 69, 5: 364-368
- Matsumoto K., Yoshikawa H. 2013. Human papillomavirus infection and the risk of cervical cancer in Japan. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 39, 1: 7-17
- Mazumder Indra D., Singh R. K., Mitra S., Dutta S., Chakraborty C., Basu P.S, Mondal R. K., Roychoudhury S., Panda C. K. 2011. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynaecologic Oncology*, 123: 597-604, doi:10.1016/j.ygyno.2011.08.004
- McIlwain W. R., Sood A. J., Nguyen S. A., Day T. A. 2014. Initial symptoms in patients with hpv-positive and hpv-negative oropharyngeal cancer. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 140, 5: 441-447
- Mehanna H., Beech T., Nicholson T., El-Hariry I., McConkey C., Paleri V., Roberts S. 2013. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck*, 35, 5: 747-755
- Mischo A., Ohlenschläger O., Hortschansky P., Ramachandran R., Görlach M. 2013. Structural Insights into a Wildtype Domain of the Oncoprotein E6 and Its Interaction with a PDZ Domain. *PLoS ONE*, 8, 4: e62584, doi:10.1371/journal.pone.0062584: 13 str.
- Muñoz N., Castellsagué X., de González A. B., Gissmann L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24, 3: 1-10
- Münger K., Howley P. M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, 89, 2: 213-228
- Nichols A. C, Dhaliwal S. S., Palma D. A., Basmaji J., Chapeskie C., Dowthwaite S., Franklin J. H., Fung K., Kwan K., Wehrli B., Howlett C., Siddiqui I., Salvadori M. I., Winquist E., Ernst S., Kuruvilla S., Read N., Venkatesan V., Todorovic B., Hammond J. A., Koropatnick J., Mymryk J. S., Yoo J., Barrett J. W. 2013. Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer? *Journal of Otoralyngology-Head & Neck Surgery*, 42: 1-9, doi: 10.1186/1916-0216-42-9: 9 str.
- NetPrimer, Premier Biosoft.
<http://www.premierbiosoft.com/netprimer> (marec 2016)
- Oblak I., Velenik V., Andrelih F., Skoblar Vidmar M., But Hadžić J., Brecej E., Reberšek M., Jelenc F., Potrč S. 2013. Smernice za obravnavo bolnikov s skvamoznoceličnim karcinomom analnega kanala in kože perinealno (analnega roba). *Onkologija*, 2: 105-108

Onkološki inštitut Ljubljana, Rak materničnega vratu.
<http://www.onko-i.si> (februar 2016)

Pande S., Jain N., Prusty B. K., Bhambhani S., Gupta S., Sharma R., Batra S., Das B. C. 2008. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3: 1060-1066

Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S. 2002. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3: 886-891

Pietsch E. C., Murphy M. E. 2008. Low risk HPV-E6 traps p53 in the cytoplasm and induces p53-dependent apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 7, 12: 1916-1918

Pillai M. R., Hariharan R., Babu J. M., Lakshmi S., Chiplunkar S. V., Patkar M., Tongaonkar H., Dinshaw K., Jayshree R. S., Reddy B. K. M., Siddiqui M., Roychoudury S., Saha B., Abraham P., Gnanamony M., Peedicayil A., Subhashini J., Ram T. S., Dey B., Sharma C., Jain S. K., Singh N. 2009. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *International Journal of Cancer*, 125, 1: 91-103

Poljak M., Kocjan B. J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 2: 60-72

Poljak M., Oštrbenk A., Seme K., Učakar V., Hillemanns P., Bokal E. V., Jančar N., Klavs I. 2011. Comparison of Clinical and Analytical Performance of the Abbott RealTime High Risk HPV Test to the Performance of Hybrid Capture 2 in Population-Based Cervical Cancer Screening. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 5: 1721-1729

Preacher K. J. 2001. Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence.
<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm> (junij 2016)

Prestridge D. S. 1991. Signal scan: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Computer Applications Bioscience*, 7: 203-6

Qmichou Z., Khyatti M., Berraho M., Ennaji M. M., Benbacer L., Nejari C., Benjaafar N., Benider A., Attaleb M., El Mzibri M. 2013. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infectious Diseases*, 13: 378-378

Rak v Sloveniji 2011. 2015. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 53: 96 str.

- Ringström E., Peters E., Hasegawa M., Posner M., Liu M., Kelsey K. T. 2002. Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, 8, 10: 3187-3192
- Safaeian M., Porras C., Schiffman M., Rodriguez A. C., Wacholder S., Gonzalez P., Quint W., van Doorn L. J., Sherman M. E., Xhenseval V., Herrero R., Hildesheim A. 2010. Epidemiological Study of Anti-HPV16/18 Seropositivity and Subsequent Risk of HPV16 and -18 Infections. *Journal of the National Cancer Institute*, 102, 21: 1653-1662
- Schiffman M., Castle P. E., Jeronimo J., Rodriguez A. C., Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 8, 370: 890-907
- Schiffman M., Rodriguez A. C., Chen Z., Wacholder S., Herrero R., Hildesheim A., Desalle R., Befano B., Yu K., Safaeian M., Sherman M. E., Morales J., Guillen D., Alfaro M., Hutchinson M., Solomon D., Castle P. E., Burk R. D. 2010. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer research*, 70, 8: 3159-3169
- Schiffman M., Wentzensen N. 2013. Human papillomavirus (HPV) infection and the multi-stage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 22, 4: 553-560
- Schneider A. 1994. Natural History of Genital Papillomavirus Infection. *Intervirolgy*, 37: 201-2014
- Shnitman-Magal S. S., Jackman A., Ish-Shalom S., Botzer L. E., Gonen P., Schlegel R., Sherman L. 2005. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *The Journal of general virology*, 86, 3: 611-621
- Schwartz S. M., Daling J. R., Madeleine M. M., Doody D. R., Fitzgibbons E. D., Wipf G. C., Carter J. J., Mao E. J., Huang S., Beckmann A. M., McDougall J. K., Galloway D. A. 1998. Oral Cancer Risk in Relation to Sexual History and Evidence of Human Papillomavirus Infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 21: 1626-1636
- Shvetsov Y. B., Hernandez B. Y., McDuffie K., Wilkens L. R., Zhu X., Ning L., Killeen J., Kamemoto L., Goodman M. T. 2009. Duration and Clearance of Anal Human Papillomavirus Infection among Women: the Hawaii HPV Cohort Study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48, 5: 536-546
- Sichero L., Ferreira S., Trottier H., Duarte-Franco E., Ferenczy A., Franco E. L., Villa L. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International Journal of Cancer*, 120: 1763-1768
- Sichero L., Sobrinho J. S., Villa L. L. 2012. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*, 432: 127-132

- Sikorsky N. 2012. Cervical cancer screening & management of abnormal PAP smears. <http://www.medicaldump.com> (junij 2016)
- Smith B., Chen Z., Reimers L., van Doorslaer K., Schiffman M., Desalle R., Herrero R., Yu K. F., Wacholder S., Wang T., Burk R. D. 2011. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS ONE*, 6, 6: e21375, doi:10.1371/journal.pone.0021375: 8 str.
- Smith E. M., Ritchie J. M., Summersgill K. F., Klusmann J. P., Lee J. H., Wang D., Haugen T. H., Turek L. P. 2004. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *International Journal of Cancer*, 108, 5: 766-772
- Smith J.S., Melendy A., Rana R.K., Pimenta J.M. 2008. Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review. *Journal of Adolescent Health*, 43, 4: 5-25
- Song S., Liem A., Miller J. A., Lambert P. F. 2000. Human Papillomavirus Types 16 E6 and E7 Contribute Differently to Carcinogenesis. *Virology*, 267, 2: 141-150
- Song Y. S., Kee S. H., Kim J. K., 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, 2: 275-281
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. 2008. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Systematic Biology*, 57, 5: 758-771
- Stanley M. A., Pett M. R., Coleman N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35, 6: 1456-1460
- Stanley M. A., Winder D. M., Sterling J. C., Goon P. K. C. 2012. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. *Bio Med Central Cancer*, 12, 1: 1-4
- Steinau M., Unger E. R., Hernandez B. Y., Goodman M. T., Copeland G., Hopenhayn C., Cozen W., Saber M. S., Huang Y., Peters E. S., Lynch C. F., Wilkinson E. J., Rajeevan M. S., Lyu C., Saraiya M. 2013. Human papillomavirus prevalence in invasive anal cancers in the United States before vaccine introduction. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 17, 4: 397-403
- Stephen A. L., Thompson C. H., Tattersall M. H., Cossart Y. E., Rose B. R. 2000. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China. *International Journal of Cancer*, 86, 5: 695-701

- Stöppler 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, 10: 6987- 6993
- Strojan P., Zadnik V., Šifrer R., Lanišnik B., Didanović V., Jereb S., Poljak M., Kocjan B. J., Gale N. 2015. Incidence trends in head and neck squamous cell carcinoma in Slovenia, 1983–2009: role of human papillomavirus infection. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272, 12: 3805-3814
- Swan D. C., Rajeevan M., Tortolero-Luna G., Follen M., Tucker R. A., Unger E. R. 2005. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecologic Oncology*, 96: 695-700
- Thomas M., Narayan N., Pim D., Tomaic V., Massimi P., Nagasaka K., Kranjec C., Gammoh N., Banks L. 2008. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, 27, 55: 7018-7030
- Tornesello M. L., Duraturo M. L., Salatiello I., Buonaguro L., Losito S., Botti G., Stellato G., Greggi S., Piccoli R., Pilotti S., Stefanon B., De Palo G., Franceschi S., Buonaguro F. M. 2004. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 74, 1: 117-126
- Tornesello M. L., Losito S., Benincasa G., Fulciniti F., Botti G., Greggi S., Buonaguro L., Buonaguro F. M. 2011. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*, 121, 1: 32-42
- Tsakogiannis D., Kyriakopoulou Z., Amoutzias G., Ruether I. G. A., Dimitriou T. G., Panotopoulou E., Markoulatos P. 2013. Identification of novel E6-E7 sequence variants of human papillomavirus 16. *Archives of Virology*, 158: 821-828
- van Duin M., Snijders P. J., Vossen M. T., Klaassen E., Voorhorst F., Verheijen R. H., Helmerhorst T. J., Meijer C. J., Walboomers J. M. 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology*, 81, 2: 317- 325
- Vaupotič M. 2013. Oskrba dihalne poti v prehospitalnem okolju. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za zdravstvene vede: 71 str.
- Veress G., Szarka K., Dong X. P., Gergely L., Pister H. 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology*, 80: 1035-1043
- Villa L. L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T., Franco E. L. 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*, 81, 12: 2959-2968

- Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. 2011. Differential Methylation of the HPV 16 Upstream Regulatory Region during Epithelial Differentiation and Neoplastic Transformation. PLoS ONE, 6, 9: e24451, doi: 10.1371/journal.pone.0024451: 13 str.
- VNN. 2013. Increase in young adults with oropharyngeal cancers linked to HPV. The Nation's Health
<http://www.vaccinews.net/2013/11/increase-in-young-adults-with-oropharyngeal-cancers-linked-to-hpv/> (junij 2016)
- Vrtačnik Bokal E., Kocjan B. J., Poljak M., Bogovac Z., Jancar N. 2010. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 36, 6: 1204-1213
- Wang J. W., Roden R. B. S. 2013. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. Expert review of vaccines, 12, 2: 129-141
- Westra W. H. 2009. The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century: The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. Head and Neck Pathology, 3, 1: 78-81
- Wingender E., Dietze P., Karas H., Knüppel R. 1996. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. Nucleic Acids Research; 24: 238-41
- Wistuba I. I. 2012. Molecular Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Carcinomas. Lung Cancer, 11, 1: 12-20, doi:10.6058/jlc.2012.11.1.12
- Wong G., Ha K., Himratul-Aznita W., Yang Y., Wan Mustafa W., Yuen K., Abraham M., Tay K., Karen-Ng L., Cheong S., Zain R. 2014. Seropositivity of HPV 16 E6 and E7 and the risk of oral cancer. Oral Diseases, doi:10.1111/odi.12218: 6 str.
- Wu Y., Chen Y., Li L., Yu G., He Y., Zhang Y. 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolate4s from China. Journal of General Virology, 87: 1181-1188
- Wulandari D., Rachmadi L., Sudiro T. M. 2015. Phylogenetic analysis and predicted functional effect of protein mutations of E6 and E7 HPV16 strains isolated in Indonesia. Medical Journal of Indonesia, 24, 4: 197-205
- Xi L. F., Kiviat N. B., Hildesheim A., Galloway D. A., Wheeler C. M., Ho J., Koutsky L. A. 2006. Human Papillomavirus Type 16 and 18 Variants: Race-related Distribution and Persistence. Journal of the National Cancer Institute, 98: 1045-1052
- Xi L. F., Koutsky L. A., Hildesheim A., Galloway D. A., Wheeler C. M., Winer R. L., Ho J., Kiviat N. B. 2007. Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 16, 1: 4-10

- Yamada T., Wheeler C., Halpern A., Stewart A., Hildesheim A., Jenison S. 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, 12: 7743 - 7753
- Zehbe I., Richard C., DeCarlo C. A., Shai A., Lambert P. F., Lichtig H., Tommasino M., Sherman, L. 2009. Human Papillomavirus 16 E6 Variants Differ in their Dysregulation of Human Keratinocyte Differentiation and Apoptosis. *Virology*, 383, 1: 69-77, doi:10.1016/j.virol.2008.09.036: 20 str.
- Zehbe I., Tachezy R., Mytilineos J., Voglino G., Mikyškova I., Delius H., Marongiu A., Gissmann L., Wilander E., Tommasino M. 2001. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *International Journal of Cancer*, 94, 5: 711-716
- Zehbe I., Voglino G., Wilander E., Genta F., Tommasino M. 1999. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet*, 354: 218-219
- Zehbe I., Wilander E., Delius H., Tommasino M. 1998. Human Papillomavirus 16 E6 Variants Are More Prevalent in Invasive Cervical Carcinoma than the Prototype. *Cancer Research*, 58, 4: 829-833
- Zuna R. E., Moore W. E., Shanesmith R. P., Dunn S. T., Wang S. S., Schiffman M., Blakey G. L., Teel T. 2009. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *international Journal of Cancer*, 125: 2609-2613
- Zuna R. E., Tuller E., Wentzensen N., Mathews C., Allen R. A., Shanesmith R., Dunn S. T., Gold M. A., Wang S. S., Walker J., Schiffman M. 2011. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 6, 1: 1-9
- zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1228: 55-78
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2, 5: 342-350
- zur Hausen H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384, 2: 260-265

9.2 DRUGI VIRI

- Da Ros C. T., Schmidt C. S. 2008. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Asian Journal of Andrology*, 10, 1: 110-114

- Frazer I. H. 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology*, 4, 1: 46-54
- Huertas-Salgado A., Martín-Gámez D. C., Moreno P., Murillo R., Bravo M. M., Villa L., Molano M. 2011. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, 410, 1: 201-215
- Nichols A. C., Faquin W. C., Westra W. H. 2009. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 140, 2: 228-234
- Poljak M., Kovanda A., Kocjan B. J., Seme K., Jančar N., Vrtačnik-Bokal E. 2009. The Abbot RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 2 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 13, 3: 94-103
- Schmidt M. T., Olejnik A., Gozdzicka-Jozefiak A. 2005. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of viral genome. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 4: 823-832
- Sun M., Gao L., Liu Y., Zhao Y., Wang X., Pan Y., Ning T., Cai H., Yang H., Zhai W., Ke Y. 2012. Whole Genome Sequencing and Evolutionary Analysis of Human Papillomavirus Type 16 in Central China. *PLoS ONE*, 7, 5: e36577, doi.org/10.1371/journal.pone.0036577: 10 str.

ZAHVALA

Prva zahvala gre **prof. dr. Mariu Poljaku**, vodji Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, da je v meni prepoznal talent, mi zaupal in me sprejel v svojo ekipo, kasneje pa tudi dal priložnost za opravljanje magistrskega dela. Po njegovi zaslugi sem se naučila dela v laboratoriju in pridobila prve neprecenljive izkušnje.

Hvala somentorju **dr. Boštjanu Kocjanu**, da me je tako pri eksperimentalnem kot pisnem delu magistrskega dela usmerjal in mi dal vedeti da je le najboljše dovolj dobro. Hvala za vsak nasvet.

Hvala mentorici **prof. dr. Mojci Narat** in recenzentki **prof. dr. Tatjani Avšič-Županc**, da sta kljub napornemu urniku v zelo kratkem času prebrali ter konstruktivno pokomentirali magistrsko delo.

Hvala **dr. Ziguiu Chenu** iz Kitajske univerze Hong Kong, za pomoč pri izdelavi filogenetskega drevesa in nasvete glede filogenetske opredelitve vključenih izolatov.

Hvala sodelavcem **Maji Acetto-Kos**, **dr. Kristini Fujs Komloš**, **Bernardi Habe**, **dr. Lei Hošnjak**, **Robiju Krošlju**, **Blanki Kušar**, **dr. Mateji Jelen**, **Maji Lunar**, **Petri Markočič**, **dr. Jani Mlakar**, **Anji Ošterbenk**, **Danieli Petek**, **Martinu Sagadinu**, **Anji Šterbenc** in **Sonji Vuletić**, da so skrbeli za prijetno delovno vzdušje in z menoj delili svoje izkušnje. Izpostavila bi **dr. Leo Hošnjak**, ki me je naučila prvih korakov dela v laboratoriju, povedala nenapisana pravila in neštetokrat pomagala s koristnimi nasveti, ko sama nisem več videla rešitve. Posebna hvala tudi **dr. Mateji Jelen**, ki je bila ena prvih ki so mi zaupali pri delu.

Hvala **knjižničarkam na Oddelku za živilstvo**, za pomoč pri iskanju literature in skrben pregled magistrskega dela.

Zahvala tudi **sodelavcem oddelka Mikrobiologija in fermentacija**, podjetja Lek d.d., da so verjeli vame in me spodbujali.

Hvala najbližjim študijskim kolegicam **Ivanki Krajnik**, **Andreji Šink** in **Evi Vovk**, s katerimi sem delila težave pri izdelavi magistrskega dela, saj so vedno najbolj vedele kako pomagati.

Iskrena hvala mojim prijateljicam **Evi Bajec**, **Lei Sirc** in **Tamari Lazić**, za vso dobro voljo, pozitivno energijo in vse lepe misli. Z vašo podporo je še tako velik problem zdel majhen. Smeha nikoli ni manjkalo. **Evi Bajec** še posebej hvala pomoč pri urejanju sheme genoma.

*Največja zahvala gre moji družini, ki mi je dala krila da lahko letim visoko. Stari mami **Ani** se zahvaljujem za izkazano zanimanje in podporo. Staršema **Marjani** in **Frenku** hvala, da sta mi omogočila študij in me vzgajala v duhu da si je potrebno postavljati visoke cilje, ter da je za uspeh vedno potrebno trdo delo. Hvala sestri **Maji**, ki si je velikokrat vzela čas in mi pomagala pri urejanju končnega izdelka v smiselno celoto. Skozi smeh in humor sva skupaj rešili marsikateri problem. Draga družina; hvala za vse - zaradi vas sem to kar sem!*

*Nazadnje hvala **Mateju**, da mi je stal ob strani in potrpežljivo poslušal moje težave. Tvoji športno obarvani izleti v naravo so mi vedno dali polno energije za nove zmage in pregnali skrbi. Brez tebe mi nebi uspelo!*

Karkoli si človeški um lahko predstavlja, lahko tudi doseže.

(W. Clement Stone)

Priloga A

Natančna lokacija tumorjev glave in vratu

Anatomska regija	Ime izolata	Anatomska lokacija tumorja
GLAVA IN VRAT	HNC1	orofarinks
	HNC2	orofarinks
	HNC12	leva nebica
	HNC13	koren jezika
	HNC19	orofarinks
	HNC21	desna tonzila
	HNC23	desna tonzila
	HNC36	koren jezika
	HNC44	lat. stena orofarinksa levo
	HNC61	leva tonzila
	HNC62	orofarinks
	HNC79	orofarinks
	HNC108	leva tonzila
	HNC118	nebica
	HNC128	leva tonzila
	HNC129	desna stran jezika
	HNC130	leva polovica hipo in orofarinksa
	HNC131	prednji nebni lok levo
	HNC132	ulkus retromolarno levo
	HNC133	tumor desne tonzile
	HNC134	orofarinks
	HNC135	orofarinks
	HNC136	orofarinks
	HNC137	orofarinks
	HNC138	orofarinks
	HNC139	orofarinks

Priloga B

Natančna lokacija tumorjev analnega kanala

Anatomska regija	Ime izolata	Anatomska lokacija tumorja
ANALNI KANAL	AC41	anus
	AC62	peritonej (iz rektuma)
	AC8	anus
	AC13	anus
	AC15	anus
	AC11	anus
	AC5	anus
	AC71	anus
	AC54	anus
	AC57	perianalno
	AC6	anus
	AC39	rektum
	AC87	anus
	AC34	rektum
	AC42	anus
	AC61	perianalno
	AC36	anus
	AC43	rektum
	AC69	anus
	AC16	anus
	AC10	anus
	AC19	anus
	AC7	anus
	AC4	anus
	AC38	anus
	AC51	rektum
	AC52	anus
	AC27	perianalno
	AC18	anus
	AC45	anus
	AC21	anus
	AC12	anus
	AC17	anus
	AC47	anorektum
	AC9	anus
	ACa8	perianalno
	AC59	anus
	AC20	anus
	AC92	ND*

* ND - mesto odvzema vzorca ni definirano

Priloga C

Spremenjena imena vključenih izolatov*

Anatomska regija	IME		Anatomska regija	IME		Anatomska regija	IME		Anatomska regija	IME	
	prvotno	spremenjeno		prvotno	spremenjeno		prvotno	spremenjeno		prvotno	spremenjeno
GLAVA IN VRAT	KUV25	HNC132	ANALNI KANAL	ACa13	AC13	MATERNIČNI VRAT-RAK	K76	CC76	MATERNIČNI VRAT-NORMALNA CITOLOGIJA	17095	NILM1
	HN108	HNC108		ACa36	AC36		C25	CC25b		06139	NILM2
	HN23	HNC23		ACa38	AC38		K45	CC45		10112	NILM3
	HN61	HNC61		ACa57	AC57		K54	CC54		01115	NILM4
	HN118	HNC118		ACa43	AC43		K78	CC78		09081	NILM5
	OPSCC25	HNC138		ACa45	AC45		K25	CC25a		01225	NILM6
	HN12	HNC12		ACa61	AC61		K21	CC21		07138	NILM7
	HN44	HNC44		ACa16-a	AC16		K12	CC12		20145	NILM8
	HN128	HNC128		ACa92	AC92		K94	CC94		06209	NILM9
	OPSCC4	HNC134		ACa15	AC15		K84	CC84		13008	NILM10
	OPSCC17	HNC135		ACa34	AC34		K115	CC115		01271	NILM11
	HN2	HNC2		ACa39	AC39		C28	CC28a		06209	NILM12
	HN13	HNC13		ACa59	AC59		K63A	CC63		20080	NILM13
	KUV1	HNC129		ACa71	AC71		K98	CC98		09048	NILM14
	KUV21	HNC131	MATERNIČNI VRAT-RAK	K107-Ca	CC107	MATERNIČNI VRAT-CIN3	K81	CC81		04004	NILM15
	KUV27	HNC133		K32-Ca	CC32		K48	CC48		06090	NILM16
	HN19	HNC19		K93-Ca	CC93		K130	CC130		20167	NILM17
	OPSCC27	HNC139		K87-Ca	CC87		K91	CC91		01171	NILM18
	OPSCC22	HNC136		K110-Ca	CC110		K68A	CC68		07108	NILM19
	HN36	HNC36		K125(C10)-Ca	CC125		K28	CC28b		15212	NILM20
	HN79	HNC79		K50-Ca	CC50		K67A	CC67		01034	NILM21
	OPSCC23	HNC137		K55-Ca	CC55		K49	CC49		06182	NILM22
	HN21	HNC21		K118(C7)-Ca	CC118		K83	CC83		15076	NILM23
	KUV20	HNC130		K9-Ca	CC9		K11	CC11		07199	NILM24
	HN1	HNC1		K10-Ca	CC10		K43	CC43		04018	NILM25
	HN62	HNC62		K89-Ca	CC89		291-CIN3	291CIN3		11175	NILM26
ANALNI KANAL	ACa4	AC4		C13-Ca	CC13a		303-CIN3	303CIN3		09031	NILM27
	ACa7	AC7		K119(C3)-Ca	CC119		307-CIN3	307CIN3		15009	NILM28
	ACa8	AC8		K122(C9)-Ca	CC122		311-CIN3	311CIN3		23025	NILM29
	ACa12	AC12		K121(C1)-Ca	CC121		315-CIN3	315CIN3		01791	NILM30
	ACa18	AC18		K104-Ca	CC104		325-CIN3	325CIN3		02005	NILM31
	ACa27	AC27		K41-Ca	CC41		354-CIN3	354CIN3		04091	NILM32
	ACa41	AC41		K101-Ca	CC101		365-CIN3	365CIN3		17249	NILM33
	ACa42	AC42		K124(C4)-Ca	CC124		366-CIN3	366CIN3		03091	NILM34
	ACa47	AC47		K140-Ca	CC140		293-CIN3	293CIN3		15281	NILM35
	ACa51	AC51		K20-Ca	CC20		295-CIN3	295CIN3		17168	NILM36
	ACa52	AC52		K100-Ca	CC100		298-CIN3	298CIN3		11142	NILM37
	ACa68	AC68		Ka73	CC73		305-CIN3	305CIN3		06148	NILM38
	ACa9	AC9		K137	CC137		319-CIN3	319CIN3		06146	NILM39
	ACa19	AC19		K47	CC47		321-CIN3	321CIN3		16041	NILM40
	ACa20-c	AC20		K7	CC7		329-CIN3	329CIN3		01099	NILM41
	ACa62	AC62		K106	CC106		344CIN3	344CIN3		06189	NILM42
	ACa6	AC6		Ka75	CC75		357-CIN3	357CIN3		04099	NILM43
	ACa87	AC87		K133	CC133		296-CIN3	296CIN3		15105	NILM44
	ACa69	AC69		K30	CC30		304-CIN3	304CIN3		06410	NILM45
	ACa54	AC54		K13	CC13b		320-CIN3	320CIN3		04006	NILM46
	ACa10	AC10		K95	CC95		299-CIN3	299CIN3		10099	NILM47
	ACa5	AC5		K3	CC3		309-CIN3	309CIN3		08035	NILM48
	ACa11	AC11		K51	CC51		335-CIN3	335CIN3		20050	NILM49
	ACa21	AC21		K82	CC82		346-CIN3	346CIN3		05012	NILM50
	ACa17	AC17		K85	CC85					20033	NILM51
										06147	NILM52
										06018	NILM53

*HNC (rak glave in vratu), AC (rak analnega kanala), CC (rak materničnega vratu), CIN3 (predrakave spremembe materničnega vratu), NILM (normalna citologija materničnega vratu)

Priloga D

Okrajšave imen aminokislin

AMINOKISLINE		
okrajšava		ime
A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asn	asparaginska kislina
E	Glu	glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin