

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja KOVANDA

MOLEKULARNA OPREDELITEV KANDIDATNIH
IZOLATOV ZA NOVE GENOTIPE VIRUSOV
PAPILOMA V SLOVENIJI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja KOVANDA

**MOLEKULARNA OPREDELITEV KANDIDATNIH IZOLATOV ZA
NOVE GENOTIPE VIRUSOV PAPILOMA V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CANDIDATE ISOLATES
OF NOVEL PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES FROM SLOVENIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2012

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 6.5.2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja mikrobiologije. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa in v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar, univ. dipl. biol.
Nacionalni inštitut za biologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 2.3.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Kovanda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 578.2/.8:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
KG	virusi/ humani virusi papiloma/ novi genotipi virusov papiloma/ HPV-125/ HPV-150/ HPV-151/ molekularne tehnike/ filogenetske analize/ kožne spremembe
AV	KOVANDA, Anja, univ. dipl. mikrobiolog
SA	POLJAK, Mario (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje mikrobiologija
LI	2012
IN	MOLEKULARNA OPREDELITEV KANDIDATNIH IZOLATOV ZA NOVE GENOTIPE VIRUSOV PAPILOMA V SLOVENIJI
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 116 str., 15 pregl., 31 sl., 2 pril., 130 vir.
IJ	Sl
JI	Sl/en
AI	Humane viruse papiloma (HPV) uvrščamo v družino <i>Papillomaviridae</i> in jih delimo na rodove, vrste in genotipe. Različni genotipi HPV so etiološko povezani z nastankom malignih in benignih sprememb sluznice in kože. Doslej poznamo okoli 150 genotipov HPV, vendar naj bi bilo po nekaterih ocenah dejansko število genotipov veliko višje. V doktorski nalogi smo opredelili tri nove genotipe HPV: HPV-125, HPV-150 in HPV-151. Z uporabo metode pomnoževanja krožne DNA in verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili genome novih genotipov, jim določili celotno nukleotidno zaporedje in pripravili referenčne klone, potrebne za uradno poimenovanje. Nove genotipe smo opredelili virološko, z določitvijo virusnih genov, in jih filogenetsko uvrstili. Da bi določili njihov tropizem in patogeni potencial, smo razvili tri kvantitativne tipsko specifične PCR teste v realnem času in testirali širok nabor kliničnih vzorcev. Filogenetsko smo uvrstili HPV-125 v vrsto 2 rodu <i>Alphapapillomavirus</i> , HPV-150 najbližje vrsti 5 rodu <i>Betapapillomavirus</i> in HPV-151 v vrsto 2 rodu <i>Betapapillomavirus</i> . Testiranje kliničnih vzorcev je pokazalo, da je HPV-125 etiološko povezan z nastankom navadnih kožnih bradavic pri človeku. HPV-150 in HPV-151 smo našli pri več primerih navadnih kožnih bradavic, ploščatoceličnega in bazalnoceličnega raka kože, vendar ju zaradi prisotnosti dodatnih genotipov HPV in nizkega virusnega bremena nismo mogli dokončno potrditi kot etiološka povzročitelja teh sprememb.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dd
 DC UDC 578.2/.8:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
 CX viruses/ human papillomaviruses/ novel papillomavirus genotypes/ HPV-125/ HPV-150/ HPV-151/ molecular techniques/ phylogenetic analysis/ skin lesions
 AU KOVANDA, Anja
 AA POLJAK, Mario (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, field Microbiology
 PY 2012
 TI MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CANDIDATE ISOLATES OF NOVEL PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES FROM SLOVENIA
 DT Doctoral Dissertation
 NO XIV, 116 p., 15 tab., 31 fig., 2 ann., 130 ref.
 LA SI
 AL SI/en
 AB Human papillomaviruses (HPV) belong to the viral family *Papillomaviridae* and are classified into genera, species and genotypes, the last being etiologically implicated in the development of malignant and benign lesions of skin and mucosa. Around 150 distinct HPV genotypes have been characterized so far, however based on some estimates the number of HPV genotypes could be much higher. The doctoral thesis presents the characterization of three novel genotypes: HPV-125, HPV-150 and HPV-151. Using whole genome amplification and PCR we amplified, sequenced and cloned the full genomes of the three genotypes, and performed various standard virological analyses. In order to determine the tropism and pathogenic potential of the novel genotypes, we developed three quantitative type-specific real-time PCR assays and tested various clinical samples. Phylogenetic analyses placed HPV-125 within *Alphapapillomavirus* species 2, HPV-150 closest to *Betapapillomavirus* species 5 and HPV-151 within *Betapapillomavirus* species 2. Testing of clinical samples showed HPV-125 to be etiologically linked to the development of common skin warts. Although HPV-150 and HPV-151 were present in several cases of common skin warts and squamous cell and basal cell carcinoma of the skin, their etiological role in the development of benign and malignant skin lesions could not be determined due to low viral loads and presence of additional HPV genotypes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 VIRUSI PAPILOMA	1
1.2 CILJI IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 VIRUSI PAPILOMA	4
2.1.1 Zgradba virusnega delca	4
2.1.2 Organizacija genoma virusov papiloma	4
2.1.3 Vezava in vstop virusov papiloma v tarčne celice	6
2.1.4 Razmnoževanje virusov papiloma in vloga virusnih beljakovin	8
2.1.4.1 Začetna faza razmnoževanja virusov papiloma	8
2.1.4.2 Latentna faza vzdrževanja virusov papiloma v okuženih celicah	9
2.1.4.3 Vegetativna ali produktivna faza razmnoževanja virusov papiloma	10
2.1.4.4 Abortivno razmnoževanje virusov papiloma	12
2.2 FILOGENETSKO RAZVRŠČANJE VIRUSOV PAPILOMA	19
2.2.1 Humani virusi papiloma	23
2.3 ZNAČILNOSTI OKUŽB S HPV	26
2.3.1 Sluznične spremembe, povezane z okužbo s HPV	26
2.3.1.1 Benigne sluznične spremembe, povezane z okužbo s HPV	26
2.3.1.1.1 Benigne spremembe anogenitalne sluznice, povezane z okužbo s HPV	27
2.3.1.1.2 Benigne spremembe ustne votline in grla, povezane z okužbo s HPV	27
2.3.1.2 Maligne spremembe sluznice, povezane z okužbo s HPV	28
2.3.1.2.1 Rak materničnega vratu	28
2.3.1.2.2 Preostali raki anogenitalne sluznice	29
2.3.1.2.3 Maligne spremembe ustnega dela žrela, povezane z okužbo s HPV	29
2.3.2 Kožne spremembe povezane z okužbo s HPV	29
2.3.2.1 Benigne kožne spremembe, povezane z okužbo s HPV	30
2.3.2.2 Maligne kožne spremembe, povezane z okužbo s HPV	30
2.3.3 Subklinične okužbe s HPV in kolenalizem	31
2.4 OPREDELJEVANJE NOVIH VIRUSOV PAPILOMA	32

2.4.1	Direktno kloniranje	32
2.4.2	Kloniranje s pomočjo pomnoževanja s polimerazo.....	33
2.4.3	Krožno pomnoževanje celotnega genoma po principu kotalečega se kroga	34
3	MATERIALI IN METODE	35
3.1	IZVOR IZHODIŠČNIH KANDIDATNIH IZOLATOV IN OBRAZLOŽITEV	
	IZBIRE KANDIDATNIH IZOLATOV SIBX1, SIBX2 IN SIBX9	35
3.1.1.	Kandidatni izolat SIBX9 (HPV-125).....	36
3.1.2.	Kandidatni izolat SIBX1 (HPV-150).....	36
3.1.3.	Kandidatni izolat SIBX2 (HPV-151).....	37
3.2	POMNOŽEVANJE CELOTNEGA GENOMA NOVIH GENOTIPOV	37
3.2.1	Izotermalno pomnoževanje izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov.....	37
3.2.2	Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov	38
	3.2.2.1 Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolata SIBX1	38
	3.2.2.2 Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolata SIBX2	39
3.2.3	Pomnoževanje celotnega genoma HPV-125	39
3.2.4	Pomnoževanje celotnega genoma HPV-150	40
3.2.5	Pomnoževanje celotnega genoma HPV-151	40
3.2.6	Preverjanje uspešnosti pomnoževanja dolgih pridelkov PCR	41
3.3	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA NOVIH GENOTIPOM	42
3.3.1	Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-125.....	42
3.3.2	Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-150.....	42
3.3.3	Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-151.....	42
3.3.4	Sestavljanje krajših nukleotidnih zaporedij novih genotipov v celotne genome	46
3.4	KLONIRANJE NOVIH GENOTIPOV	48
3.4.1	Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-125.....	48
3.4.2	Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-150.....	48
3.4.3	Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-151.....	49
3.4.4	Čiščenje pridelkov PCR na gelu.....	49
3.4.5	Kloniranje	50
	3.4.5.1 Kloniranje pridelkov PCR s 'TA' konci za HPV-125.....	51
	3.4.5.2 Kloniranje pridelkov PCR s topimi konci za HPV-150 in HPV-151	51
	3.4.5.3 Preverjanje uspešnosti ligacijske reakcije	51
3.4.6	Transformacija	52
3.4.7	Preverjanje uspešnosti kloniranja	52
	3.4.7.1 PCR na osnovi kolonij.....	53
	3.4.7.2 Izolacija plazmidov iz transformirane bakterijske kulture	54
	3.4.7.3 Določanje nukleotidnega zaporedja referenčnih klonov	54
3.4.8	Depozicija klonov in potrditev celotnega nukleotidnega zaporedja novih genotipov s strani Referenčnega centra.....	54

3.5 DOLOČANJE ODPRTIH BRALNIH OKVIRJEV	55
3.6 FILOGENETSKE ANALIZE	55
3.6.1 Filogenetska analiza HPV-125.....	55
3.6.2 Filogenetska analiza HPV-150 in HPV-151	56
3.7 PRIPRAVA TIPSKE SPECIFIČNIH PCR V REALNEM ČASU.....	57
3.7.1 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za PCR v realnem času	57
3.7.1.1 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času	57
3.7.1.2 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času	57
3.7.1.3 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času	57
3.7.2 Optimizacija kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	58
3.7.2.1 Kvantitativni HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času	58
3.7.2.2 Kvantitativni HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času	58
3.7.2.3 Kvantitativni HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času	59
3.7.3 Evaluacija kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	59
3.7.3.1 Ugotavljanje linearnosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	59
3.7.3.2 Določanje meje detekcije kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	60
3.7.3.3 Določanje ponovljivosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	60
3.7.3.4 Določanje specifičnosti in preverjanje navzkrižne reaktivnosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času	60
3.8 TESTIRANJE KLINIČNIH VZORCEV	61
3.8.1 Testiranje kliničnih vzorcev na HPV-125	61
3.8.2 Testiranje kliničnih vzorcev na HPV-150 in HPV-151	62
3.8.3 Delna opredelitev kandidatnega izolata za novi genotip SI-HPV-Beta5, identificiranega pri testiranju kliničnih vzorcev na HPV-125, HPV-150 in HPV-151	62
4 REZULTATI.....	63
4.1 REZULTATI POMNOŽEVANJA CELOTNEGA GENOMA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151	63
4.1.1 Rezultati izotermalnega pomnoževanja izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov	63
4.1.2 Rezultati PCR pomnoževanja celotnega genoma in dolgih nukleotidnih odsekov novih genotipov za pripravo referenčnih klonov	64
4.2 REZULTATI KLONIRANJA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151	66

4.3 ZNAČILNOSTI GENOMA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151	68
4.3.1 Organizacija genoma novih genotipov	68
4.3.1.1 Organizacija genoma HPV-125	68
4.3.1.2 Organizacija genoma HPV-150	70
4.3.1.3 Organizacija genoma HPV-151	71
4.3.2 Značilnosti virusnih genov in beljakovin novih genotipov	73
4.3.2.1 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-125	73
4.3.2.2 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-150	75
4.3.2.3 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-151	75
4.4 FILOGENETSKA UVRSTITEV NOVIH GENOTIPOV	77
4.4.3 Filogenetska uvrstitev HPV-125	77
4.4.2 Filogenetska uvrstitev HPV-150	77
4.4.3 Filogenetska uvrstitev HPV-151	77
4.5 REZULTATI EVALUACIJE KVANTITATIVNIH TIPSKO SPECIFIČNIH PCR V REALNEM ČASU	80
4.5.1 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-125 tipsko specifičnega PCR v realnem času	80
4.5.2 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-150 tipsko specifičnega PCR v realnem času	81
4.5.3 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-151 tipsko specifičnega PCR v realnem času	82
4.6 REZULTATI TESTIRANJA KLINIČNIH VZORCEV NA PRISOTNOST NOVIH GENOTIPOV	83
4.6.1 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-125	83
4.6.2 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-150	84
4.6.3 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-151	86
4.6.4 Delna opredelitev kandidatnega izolata za novi genotip SI-HPV-Beta5	87
5 RAZPRAVA	88
5.1 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-125	88
5.1.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-125	88
5.1.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-125	89
5.2 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-150	90
5.2.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-150	90
5.2.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-150	90
5.3 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-151	93
5.3.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-151	93
5.3.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-151	93
5.4 POMEN KANDIDATNEGA IZOLATA ZA NOVI GENOTIP SI-HPV-BETA5 ..	95
6 SKLEPI	96
7 POVZETEK	98

7.1 POVZETEK	98
7.2 SUMMARY	101
8 VIRI	104
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rodovi in vrste virusov papiloma (de Villiers in sod., 2004; Fauquet, 2005; Bernard in sod., 2010).....	20
Preglednica 2: Vrstna razporeditev, tkivni tropizem in bolezni, povezane z genotipi HPV (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010).....	24
Preglednica 3: Osnovne značilnosti izhodiščnih kandidatnih izolatov za nove genotipe HPV.....	35
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-150.....	43
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-151.....	44
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-125.....	45
Preglednica 7: Značilnosti referenčnih klonov novih genotipov humanih virusov papiloma	68
Preglednica 8: Odstotki podobnosti med geni E6, E7, E1, E2, L1 in L2 HPV-125 in najbolj sorodnih genotipov HPV iz vrste 2 rodu <i>Alphapapillomavirus</i> (Kovanda in sod., 2011a).....	73
Preglednica 9: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a).....	83
Preglednica 10: Lastnosti HPV-125 pozitivnih vzorcev in bolnikov (Kovanda in sod., 2011a)	84
Preglednica 11: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-150	84
Preglednica 12: Lastnosti HPV-150 pozitivnih vzorcev in bolnikov	85
Preglednica 13: Rezultati testiranja dlačnih mešičkov na HPV-150, v enem letu odvzetih s štirih mest iste osebe	86
Preglednica 14: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-151	86
Preglednica 15: Lastnosti HPV-151 pozitivnih vzorcev in bolnikov	87

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz strukture virusne kapside (slika 5.2. Kovanda, 2011 v: Kocjan in Poljak, 2011)	4
Slika 2: Shematski prikaz virusnih odprtih bralnih okvirjev pri rodovih <i>Alphapapillomavirus</i> (HPV-18) in <i>Betapapillomavirus</i> (HPV-9)	5
Slika 3: Shematski prikaz vezave in vstopa virusnih delcev v tarčno celico	7
Slika 4: Shematski prikaz produktivne in abortivne okužbe epitela z virusi papiloma (slika 5.4. Kovanda, 2011 v: Kocjan in Poljak, 2011).	12
Slika 5: Virusna beljakovina E6	14
Slika 6: Virusna beljakovina E7	16
Slika 7: Shematski prikaz mehanizmov nastanka maligne transformacije kot posledice okužbe z virusi papiloma	18
Slika 8: Filogenetsko drevo 207 genotipov virusov papiloma, pripravljeno na podlagi analize združenega aminokislinskega zaporedja genov E1-E2-L1 (Gottschling in sod., 2011).....	22
Slika 9: Shematski prikaz molekularnih metod v uporabi pri opredeljevanju novih virusov papiloma.....	34
Slika 10: Sestavljanje celotnega genoma HPV-125 iz krajših nukleotidnih zaporedij s pomočjo programa ContigExpress	46
Slika 11: Sestavljanje celotnega genoma HPV-150 iz krajših nukleotidnih zaporedij s pomočjo programa ContigExpress.	47
Slika 12: Sestavljanje celotnega genoma HPV-151 iz krajših nukleotidnih zaporedij s pomočjo programa ContigExpress	47
Slika 13: Pridelki izotermalnega pomnoževanja izolatov iz dlačnih mešičkov	63
Slika 14: Pridelki kratkega tipsko specifičnega PCR, pripravljeni iz razredčenih pridelkov izotermalnega pomnoževanja.....	64
Slika 15: Preverjanje uspešnega pomnoževanja dolgega pridelka PCR HPV-150	65
Slika 16: Preverjanje uspešnega pomnoževanja pridelkov PCR za kloniranje HPV-150... ..	66
Slika 17: Preverjanje uspeha ligacijske reakcije med plazmidom pJET/blunt in pridelkom PCR za pripravo referenčnega klona HPV-151	67
Slika 18: Gelska elektroforeza pridelkov PCR na osnovi kolonij	67
Slika 19: Organizacija genoma HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a).....	69
Slika 20: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a).....	69
Slika 21: Organizacija genoma HPV-150 (Kovanda in sod., 2011b).....	70
Slika 22: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-150 (Kovanda in sod., 2011b)	71

Slika 23: Organizacija genoma HPV-151 (Kovanda in sod., 2011b).....	72
Slika 24: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-151 (Kovanda in sod., 2011b)	72
Slika 25: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovin E6 in E7 HPV-125 z drugimi predstavniki vrste 2 rodu <i>Alphapapillomavirus</i> ter klinično pomembnimi sluzničnimi genotipi HPV-16, HPV-18, HPV-6 in HPV-11 (Kovanda in sod., 2011a).....	74
Slika 26: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovin E6 in E7 HPV-150 in HPV-151 z drugimi predstavniki vrst 2, 4 in 5 rodu <i>Betapapillomavirus</i> (Kovanda in sod., 2011b).....	76
Slika 27: Filogenetsko drevo 117 genotipov HPV, pripravljeno na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja gena L1 (Kovanda in sod., 2011a)	78
Slika 28: Filogenetsko drevo 200 genotipov PV, pripravljeno na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja gena L1 (Kovanda in sod., 2011b).....	79
Slika 29: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-125/reakcijo	80
Slika 30: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-150/reakcijo	81
Slika 31: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-151/reakcijo	82

KAZALO PRILOG

Priloga A: Znanstveno delo: Kovanda, A., Kocjan B.J., Potočnik M., Poljak M. 2011a. Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125. PLoS ONE, 6, 7: e22414, doi:10.1371/journal.pone.0022414: 8 str.

Priloga B: Znanstveno delo: Kovanda A., Kocjan B.J., Luzar B., Bravo I.G., Poljak M. 2011b. Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. PLoS ONE, 6, 7: e22529, doi:10.1371/journal.pone.0022529: 10 str.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BCC	bazalnocelični rak kože (angl. <i>basal cell carcinoma</i>)
bp	bazni par
CIN 1-3	cervikalna intraepitelijska neoplazija stopnje 1 do 3 (angl. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CV	koeficient variacije (angl. <i>coefficient of variation</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfati (angl. <i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
GB	genitalne bradavice
HSPG	heparan sulfatni proteoglikan (angl. <i>heparan sulfate proteoglycan</i>)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
kbp	kilo bazni par
kDa	kilo Dalton
LCR	nekodirajoče regulatorno področje (angl. <i>long control region</i>)
LOD	meja detekcije (angl. <i>limit-of-detection</i>)
ME	metoda minimalne evolucije (angl. <i>minimum evolution</i>)
ML	filogenetski algoritem, ki temelji na računanju največje verjetnosti za določeno evolucijsko pot (angl. <i>maximum likelihood</i>)
mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
NJ	filogenetski algoritem, ki temelji na združevanju sosednjih nukleotidnih zaporedij (angl. <i>neighbour-joining</i>)
NMSC	nemelanomski rak kože (angl. <i>non-melanoma skin cancer</i>)
ORF	odprti bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
p53	tumor-supresorska beljakovina 53 (angl. <i>tumour suppressor protein 53</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pRb	retinoblastomska beljakovina (angl. <i>retinoblastoma protein</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
RCA	metoda krožnega pomnoževanja (angl. <i>rolling cycle replication</i>)
RMV	rak materničnega vratu
RRP	rekurentna respiratorna papilomatoza (angl. <i>recurrent respiratory papillomatosis</i>)
SCC	ploščatocelični rak kože (angl. <i>squamous cell carcinoma</i>)
URR	nekodirajoče regulatorno področje (angl. <i>upstream regulatory region</i>)
WGA	pomnoževanje celotnega genoma (angl. <i>whole genome amplification</i>)

1 UVOD

1.1 VIRUSI PAPILOMA

Virusi papiloma (PV) imajo dvoverižni krožni DNA genom. Uvrščamo jih v družino *Papillomaviridae*.

Virusi papiloma so povezani z različnimi benignimi in malignimi spremembami kože in sluznic pri človeku in drugih kopenskih vretenčarjih.

Viruse papiloma, katerih gostitelj je človek, imenujemo humani virusi papiloma (angl. *human papilloma virus*, HPV) in jih nadalje delimo na rodove, vrste in genotipe (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010). Doslej je bilo z določitvijo celotnega nukleotidnega zaporedja genoma opredeljenih že več kot 200 genotipov PV, od katerih je humanih, oziroma HPV, okoli 150, vendar naj bi bilo dejansko število genotipov po ocenah, pridobljenih na podlagi delnih nukleotidnih zaporedij, veliko višje.

Različni genotipi HPV pri človeku so etiološko povezani z nastankom malignih in benignih sprememb sluznice in kože (rak materničnega vratu, bazalnocelični in ploščatocelični rak kože, genitalne bradavice, papilomi grla, navadne kožne bradavice itd.), zato ravno genotipi predstavljajo najpomembnejši nivo razvrščanja (de Villiers in sod., 2004).

V smernicah, sprejetih leta 2004, je bilo določeno, da kot poseben genotip HPV lahko opredelimo izolat, katerega nukleotidno zaporedje celotnega gena L1 izkazuje manj kot 90 % ujemanje z genom L1 drugih uradno priznanih genotipov HPV. Kadar je neskladnost v genu L1 med 2 % in 10 %, govorimo o virusnem podtipu, če pa je ta raznolikost manjša od 2 %, gre za genomsko različico določenega genotipa (de Villiers in sod., 2004). Po novejših smernicah iz leta 2010 (Bernard in sod., 2010) pa je za določitev genotipa bolj kot omenjene omejitve glede ujemanja gena L1 potrebno upoštevati dejanska filogenetska razmerja.

Za opredelitev in priznanje novega genotipa HPV je potrebno celoten genom izolata HPV vklonirati v plazmidni vektor in mu določiti celotno nukleotidno zaporedje. Zaporedne številke novo opredeljenih genotipov HPV dodeljuje Referenčni center za HPV (Deutsches Krebs-Forschungszentrum, DKFz) v Heidelbergu v Nemčiji, ki deluje tudi kot zbirka in distribucijski center za klone HPV (de Villiers in sod., 2004). Tradicionalno so tako genotipi HPV po številkah označeni glede na zaporedje, po katerem so bili prvič

opredeljeni, in ne glede na filogenetsko sorodnost ali klinični pomen (de Villiers in sod., 2004).

Z obstoječimi komercialnimi molekularnimi testi lahko danes zanesljivo identificiramo okoli 40 klinično najpomembnejših genotipov HPV, medtem ko moramo preostale genotipe dokazovati z lastnimi (angl. *in-house*) metodami, pri čemer pogosto naletimo na probleme zaradi sočasnih okužb z različnimi genotipi, majhnega števila kopij virusa v določenih kužninah (npr. dlačni mešički) ter zaradi prisotnosti še neopredeljenih genotipov HPV z neznanim kliničnim pomenom.

Odkritja novih genotipov HPV pomembno prispevajo k izboljšanju razumevanja filogenetske raznolikosti virusov papiloma, posebej pa so taka odkritja pomembna, če lahko dokažemo da imajo novi genotipi tudi klinični pomen. V takih primerih lahko molekularna opredelitev novih HPV prispeva k izboljšani diagnostiki in obravnavi bolnikov ter odpira nove možnosti za raziskovanje patogeneze HPV.

V predhodnih slovenskih raziskavah razporeditve genotipov HPV v različnih vzorcih je naša raziskovalna skupina odkrila več potencialnih kandidatov za nove genotipe HPV, ki pa jih je bilo potrebno dokončno opredeliti (Kocjan in sod., 2004, 2005; Potočnik in sod., 2006). Med njimi je bilo posebno zanimivih devet slovenskih izolatov HPV, ki bi lahko predstavljali nove genotipe HPV na podlagi že določenih 367-474 bp dolgih zaporedij gena L1 (SIBX1, SIBX2, SIBX3, SIBX7, SIBX8 in SIBX9) in 145 bp dolgih zaporedij gena E1 (SIBX4, SIBX5 in SIBX6).

Med raziskovalnim delom za doktorsko nalogo se je izkazalo, da so drugi raziskovalci izolate SIBX3, SIBX4, SIBX6 in SIBX7 že opredelili kot genotipe HPV-120 (Bernard in sod., 2010), HPV-105 (de Villiers in Gunst, 2009), HPV-99 (de Villiers in Gunst, 2009) in HPV-100 (de Villiers in Gunst, 2009), zato smo se v doktorski nalogi osredotočili na preostale slovenske potencialne kandidatne izolate SIBX1, SIBX2, SIBX5, SIBX8 in SIBX9.

1.2 CILJI IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Prvi cilj doktorske naloge je bil z določanjem nukleotidnega zaporedja celotnega genoma pri predhodno delno opredeljenih slovenskih izolatih HPV opredeliti vsaj en nov genotip HPV. Nadaljnji cilj je bil novo opredeljeni/e genotip/e ustrezno klonirati in deponirati v referenčni center v Heidelbergu, kjer bi bil/i uradno sprejet/i. Uradno sprejeti/te genotip/e smo želeli opredeliti tako virološko, z določitvijo virusnih genov, kot tudi epidemiološko, z določitvijo tropizma in patogenega potenciala, na podlagi testiranja kliničnih vzorcev.

Cilji raziskovalne naloge so bili:

- pridobiti celotne genome novih delno opredeljenih slovenskih izolatov HPV v obliki pridelkov verižne reakcije s polimerazo.
- določiti nukleotidno zaporedje celotnega genoma novih genotipov HPV.
- pripraviti referenčne klone celotnega genoma, potrebne za uradno priznanje novih genotipov HPV s strani Referenčnega centra za viruse papiloma v Heidelbergu.
- virološko opredeliti nove genotipe HPV.
- filogenetsko uvrstiti nove genotipe HPV.
- pripraviti kvantitativne teste za dokazovanje novih genotipov HPV.
- epidemiološko opredeliti nove genotipe HPV na podlagi testiranja kliničnih vzorcev.

Glede na zastavljene cilje dela smo postavili naslednje hipoteze:

- da bomo pri nerazrešenih vzorcih, vključenih v doktorsko nalogo, odkrili in opredelili vsaj en nov genotip HPV.
- da bomo na podlagi testiranja kliničnih vzorcev določili prevalenco in nakazali klinični pomen novega/ih genotipa/ov.

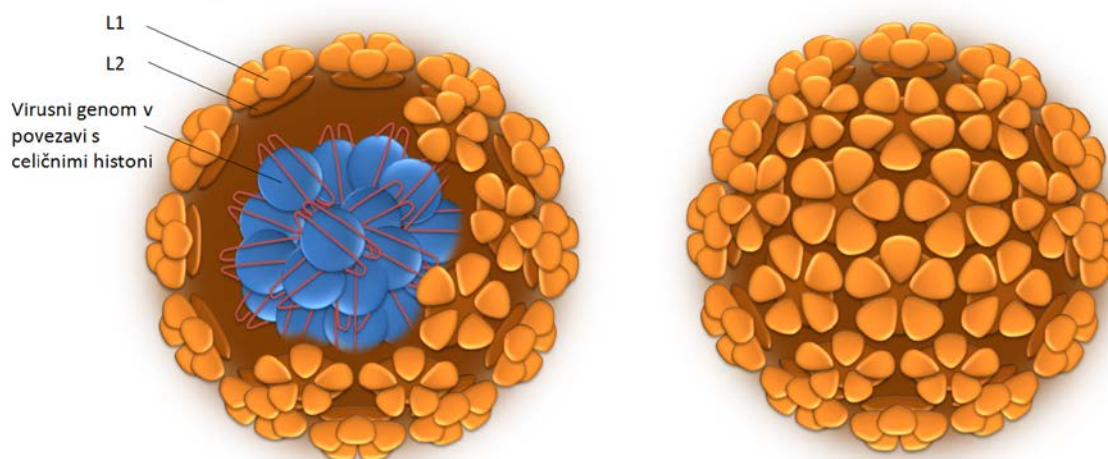
2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUSI PAPILOMA

2.1.1 Zgradba virusnega delca

Virusi papiloma (PV) so virusi brez ovojnice, velikosti približno 55 nm. Virusni genom obdaja ikozaedrična kapsida, ki je sestavljena iz dveh tipov strukturnih beljakovin, t.i. L1 ali velike (54 kDa) ter L2 ali male (74-80 kDa) plaščne beljakovine (Kocjan in Poljak, 2011).

Virusno kapsido sestavlja 360 kopij plaščne beljakovine L1, ki so organizirane v 72 pentamernih kapsomer (slika 1), beljakovine L2 pa je veliko manj in jo najdemo v največ 72 kopijah na kapsido, in sicer pod pentameri L1. (Buck in sod., 2008; Sapp in Bienkowska-Haba, 2009; Wolf in sod., 2010).



Slika 1: Shematski prikaz strukture virusne kapside (slika 5.2. Kovanda, 2011 v: Kocjan in Poljak, 2011)
Figure 1: Structure of the viral capsid (Figure 5.2. Kovanda, 2011 in: Kocjan et Poljak, 2011).

2.1.2 Organizacija genoma virusov papiloma

PV imajo dvovertični krožni DNA genom in jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae*.

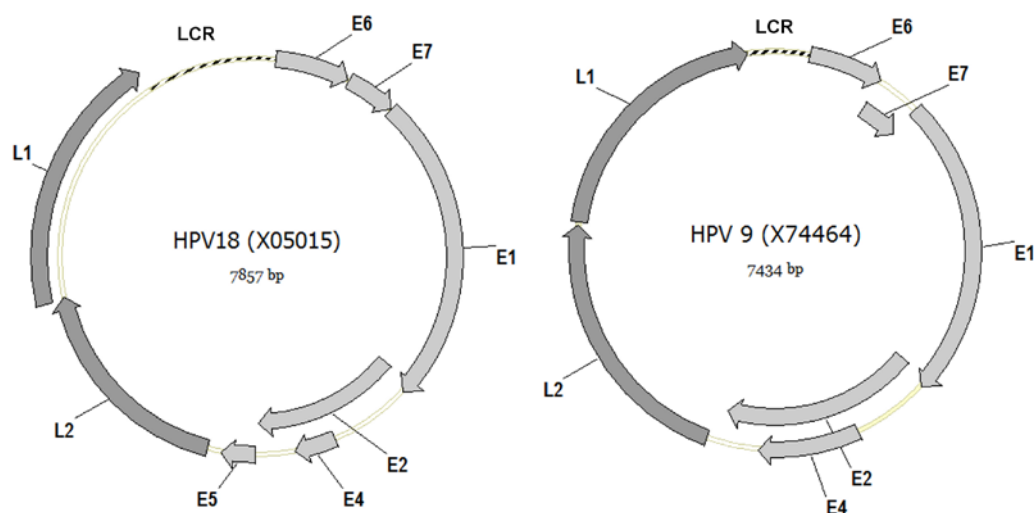
Genom PV predstavlja krožna in dvojno vijačna molekula DNA velikosti 7,5-8 kilo baznih parov (kbp). Znotraj kapside je virusna DNA povezana s histoni iz celice gostitelja (Favre in sod., 1977).

Virusni genom je sestavljen iz regulatornih nekodirajočih in kodirajočih področij. Vsi geni znotraj virusnega genoma se prepisujejo v isti smeri. Kodirajoči področji sta dve, in sicer zgodnje ali E (angl. *early*) ter pozno ali L (angl. *late*) področje.

Zgodnje področje vsebuje zapise za virusne beljakovine, povezane s prepisovanjem in podvojevanjem virusnega genoma (gena E1 in E2), ter transformacijo okuženih celic (geni E4, E5, E6 in E7), pozno področje pa vsebuje zapise za strukturne beljakovine virusne kapside (L1 in L2). Vlogo virusnih beljakovin podrobneje opisuje poglavje 2.1.4 Razmnoževanje virusov papiloma in vloga virusnih beljakovin.

Domneva, da en virusni gen kodira mRNA, ki se prepisuje iz enega odprtega bralnega okvirja (angl. *open reading frame*, ORF), pri PV ne velja (Zheng, 2006). Nasprotno pri transkripciji/prepisovanju PV nastaja veliko število bi- in policistronskih mRNA, tako da za veliko večino virusnih genov še ni razjasnjeno, iz katerih od teh različic mRNA nastajajo funkcionalne beljakovine v sklopu okužbe s PV (Zheng, 2006). Ravno zaradi problema, ki ga predstavlja zapleteno prepisovanje in post-transkripcijsko procesiranje (nekateri introni se pri procesiranju izrežejo, drugi pa ne), večina raziskovalcev lokacijo virusnih 'genov' določa arbitrarno glede na lokacijo genov drugih, sorodnih genotipov, oz. kot ORF-je, ki najbolj ustrezajo izraženi beljakovini. Pri PV kot 'gene' torej upoštevamo tovrstno določene ORF-je (slika 2).

Pri nekaterih genotipih PV (BPV-1, HPV-31 itd.) so poleg že omenjenih genov dodatno našli še dva ORF-ja, E3 in E8, vendar pa naj bi se kot beljakovina izražal le E8 ORF (Choe in sod., 1989; Stubenrauch in sod., 2000, 2001). E8 naj bi pri nekaterih genotipih 'nadomeščal' beljakovino E5, pri zajčjih PV pa naj bi E8 predstavljal virusni onkogen (Harry in Wettstein, 1996; Han in sod., 1998).



Slika 2: Shematski prikaz virusnih odprtih bralnih okvirjev pri rodovih *Alphapapillomavirus* (HPV-18) in *Betapapillomavirus* (HPV-9)

Figure 2: The location of viral open reading frames in genera *Alphapapillomavirus* (HPV-18) and *Betapapillomavirus* (HPV-9).

Nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*) ali URR (angl. *upstream regulatory region*) se nahaja med genoma L1 in E6 ter vsebuje zaporedja DNA, ki so pomembna za uravnavanje virusnega razmnoževanja in prepisovanja virusnih genov. To področje se bistveno razlikuje med posameznimi rodovi, vrstami ter genotipi PV. Znotraj HPV je področje LCR tako najdaljše znotraj virusnega rodu *Alphapapillomavirus* (približno 700 bp), medtem ko je pri preostalih rodovih HPV praviloma bistveno krajše. Področje LCR vsebuje elemente, kot so promotorji za zgodnje virusne gene, vezavna mesta za transkripcijske dejavnike, med katere spadajo NF-1, AP1, Oct-1, SP1, TEF-1, TEF-2, YY1 itd., ter vezavna mesta za virusno beljakovino E2. Lokacije teh vezavnih mest se bistveno razlikujejo med posameznimi rodovi, vrstami ter genotipi, njihovo vlogo v virusnem razmnoževanju in patogenezi pa proučujejo s funkcionalnimi ekspresijskimi preiskavami s pomočjo virusnih mutant.

Za genom E2 (oziroma za genom E5, ki je prisoten samo pri nekaterih rodovih) in pred genom L2 se nahaja še eno nekodirajoče področje, katerega vloga za zdaj še ni pojasnjena. Dolžina tega zaporedja se, tako kot dolžina LCR oz. URR, lahko bistveno razlikuje med različnimi rodovi, vrstami in genotipi PV.

2.1.3 Vezava in vstop virusov papiloma v tarčne celice

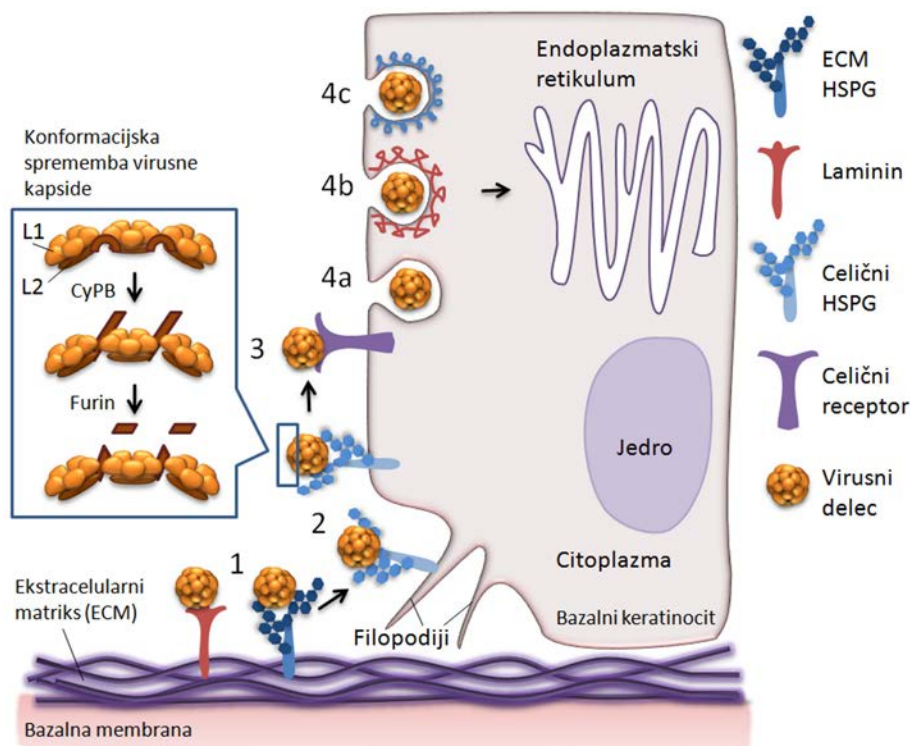
PV okužujejo bazalne celice večskladnega ploščatoceličnega epitela tako, da do bazalnega sloja vstopajo skozi mikrorazpoke oz. mikrotravme. Mehanizem vstopa PV v tarčne celice prikazuje slika 3.

Večina do sedaj opredeljenih PV za svojo primarno vezavo uporablja heparan sulfatne proteoglikane (angl. *heparan sulfate proteoglycan*, *HSPG*). HSPG se nahajajo na ekstracelularnem matriksu (angl. *extracellular matrix*, *ECM*) bazalne membrane in so sestavljeni iz nerazvejanih oligosaharidov, sestavljenih iz disaharidnih enot uronske kisline in glukoamina. HSPG so lahko O- ali N- sulfonirani, kar vpliva na razlike v afiniteti vezave različnih PV. PV se lahko vežejo tudi na druge komponente ekstracelularnega matriksa, HPV-11 na primer na laminin 5 (Sapp in Bienkowska-Haba, 2009) (slika 3-1).

Vezavi na ekstracelularni matriks preko HSPG ali laminina sledi prenos virusnega delca na celični HSPG. Več raziskav je pokazalo, da do prenosa oz. vezave na celico pride preko posebnih struktur, t.i. celičnih filopodijev (slika 3-2), ki naj bi se formirali ob sami vezavi (Schelhaas in sod., 2008; Smith in sod., 2008).

Kot že omenjeno, L1 predstavlja glavni virusni antigen, medtem ko je L2 v veliki meri skrita v notranjosti kapside. Ob vezavi virusnega delca na tarčno celico preko celičnega HSPG pride do konformacijske spremembe kapside (Sapp in Bienkowska-Haba, 2009).

Konformacijska sprememba kapside (slika 3-v okvirju) je posredovana s celično peptidil-prolil cis/trans izomerazo ciklofilinom B (angl. *Cyclophilin B*, CyPB), ki pomaga izpostaviti L2, ter furinom, ki s cepitvijo L2 razkrije vezavno mesto za še neznan celični receptor, kar omogoči vstop v celico (slika 3-3).



Slika 3: Shematski prikaz vezave in vstopa virusnih delcev v tarčno celico
Figure 3: Binding and entry of viral particles into the target cell.

Mehanizem vstopa v celico se med različnimi PV razlikuje, tako HPV-16 lahko vstopa na način, neodvisen od klatrinskih ali kaveolarnih veziklov (slika 3-4a) (Spoden in sod., 2008), medtem ko lahko BPV1 uporablja klatrinske vezikle (slika 3-4b), HPV-33 pa je odvisen od kaveolarnih veziklov (slika 3-4c) (Sapp in Bienkowska-Haba, 2009). Glede na več možnih mehanizmov vstopa je verjetno, da je za vstop različnih genotipov PV odgovornih več različnih, doslej še neopredeljenih, celičnih receptorjev.

Znotraj celice se PV lahko nahajajo v različnih endosomskih razdelkih, kot so zgodnji endosomi in kaveosomi, PV pa so praviloma odsotni iz poznih endosomov oz. lizosomov (Sapp in Bienkowska-Haba, 2009). Do razgradnje virusnega delca pride pred prehodom v jedro, pri čemer naj bi virusna beljakovina L2 posredovala pri 'pobegu' virusne DNA iz endosoma ter prehodu virusne DNA v jedro.

Virusna DNA v jedro okužene celice prehaja s pomočjo virusne beljakovine L2 na še ne povsem pojasnjen način. Pri prehodu v jedro še ni jasno, ali gre za citoplazmatski transport

po mikrotubulih in preko jedrne pore ali pa do prehoda pride v fazi celične delitve med začasno izgubo jedrne membrane (Pyeon in sod., 2009).

2.1.4 Razmnoževanje virusov papiloma in vloga virusnih beljakovin

PV lahko okužijo le bazalne celice večskladnega ploščatoceličnega epitela. Za tovrstne celice je značilno, da njihova celična delitev poteka, dokler so pritrjene na bazalno membrano, in da se pri neokuženih celicah ustavi takoj, ko taka celica začne s procesom diferenciacije. To za PV predstavlja specifičen problem, na katerega so se prilagodili z različnimi mehanizmi. Virusno razmnoževanje znotraj gostiteljskih celic tako poteka glede na stopnjo dozorelosti epitelijskih celic gostitelja in je v veliki meri odvisno od zgodnjih virusnih beljakovin (Kadaja in sod., 2009b).

Razmnoževanje virusnih delcev naj bi potekalo v treh fazah. Pri uspešni okužbi epitela najprej pride do začetne faze razmnoževanja PV v okuženih celicah, ki ji sledi faza stabilnega vzdrževanja genoma PV v okuženih celicah v latentni obliki. V zadnji fazi pride do vegetativnega razmnoževanja virusne DNA in sestavljanja virusnih delcev. Preklop med omenjenimi fazami trenutno še ni razjasnjen, vendar pa se domneva, da so ti procesi tesno povezani s stopnjami diferenciacije gostiteljskih celic (Kadaja in sod., 2009b).

2.1.4.1 Začetna faza razmnoževanja virusov papiloma

Po okužbi celice s PV pride do slačenja virusa in prehoda virusne DNA v jedro, kjer pride do aktivacije promotorjev znotraj področja LCR in izražanja zgodnjih virusnih beljakovin, predvsem E1 in E2.

Podvojevanje virusnega genoma se prične z vezavo dimerov E1 in E2 na mesto začetka podvojevanja (ang. *origin of replication*), kjer se nahajajo vezavna mesta E1 in E2, ter AT-bogata področja.

Virusna beljakovina E1 deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo in v *in vitro* pogojih lahko prepisuje DNA brez prisotnosti beljakovine E2, vendar je le-ta nujno potrebna za prepisovanje *in vivo* (Ustav in Stenlund, 1991). Po vezavi dimerov E1 in E2 na tarčno mesto pride v več stopnjah do formacije heksamera E1 in sprostitve E2 s tarčnega mesta, pri čemer se heksamer E1 namesti okoli razpletene enoverižne DNA. Čeprav še ni popolnoma razjasnjeno, ali heksamer E1 deluje tako, da 'pleza' po DNA, ali pa tako, da jo potiska skozi sebe, strukturne preiskave nakazujejo, da vsaka od šestih podenot heksamera E1 dodaja nukleotide enega za drugim na način, imenovan 'koordinirano spremljanje' (ang. *coordinated escort*) (Enemark in Joshua-Tor, 2006). Vloga celičnih beljakovin pri

procesu ni tako dobro raziskana, beljakovina E1 pa naj bi imela sposobnost interakcije z replikativno beljakovino A, topoizomerazo in polimerazno alfa-primazo.

Prvotno razmnoževanje virusa je hitro in povzroči povečanje števila virusnih genomov na celico, nato pa se kmalu zaključi. Sledi dolgotrajnejše vzdrževanje virusa v latentni obliki v bazalnih celicah.

2.1.4.2 Latentna faza vzdrževanja virusov papiloma v okuženih celicah

Latentno okuženih celic histološko ne moremo ločiti od zdravih celic. Znotraj teh, še nedozorelih, bazalnih epitelijskih celic se virusni genom praviloma nahaja v episomalni obliki, tovrstno obliko okužbe pa imenujemo latentna faza.

Podvojevanje virusnega genoma v latentni fazi tesno sledi celičnemu ciklu gostiteljske celice, tako da se število kopij virusnega genoma v vsaki celici podvoji in ob celični delitvi prenese na hčerinske celice. Poznamo vsaj dva mehanizma za vzdrževanje števila kopij virusnega genoma, ki sta bila dokazana pri različnih genotipih PV (Kadaja in sod., 2009b).

Po prvem mehanizmu naj bi PV za vzdrževanje genoma uporabljali izključno celične mehanizme za podvojevanje, ki se aktivirajo med S-fazo celičnega cika (angl. '*once per S-phase*'), po drugem mehanizmu pa naj bi bilo pomnoževanje PV naključno in posredovano z virusnimi mehanizmi podvojevanja, vendar uravnano tako, da se virus vseeno naključno prenese na obe hčerinski celici (angl. '*random choice 'once-per-cell'*'). V primeru HPV so znotraj človeških celic dokazali oba mehanizma, preklap med njima pa naj bi bil odvisen od nivoja beljakovine E1 (Hoffmann in sod., 2006). Nekateri raziskovalci so glede tega mnenja, da sta dva dokazana mehanizma vzdrževanja PV v gostiteljski celici posledica razlike med podvojevanjem integrirane in episomalne virusne DNA (Ravnan in sod., 1992).

E2 naj bi bil poleg podvojevanja pomembno udeležen tudi pri procesu vzdrževanja PV v okuženih celicah. Beljakovino E2 predstavljata dve funkcionalni domeni, povezani s fleksibilno 'hinge' regijo; N-terminalna transaktivacijska domena (TAD) in C-terminalna domena za vezavo DNA in dimerizacijo (DBD). Poleg klasične oblike E2 obstajata še dve krajši represorski obliki te beljakovine, ki ne moreta začeti prepisovanja in podvojevanja, s svojo DBD regijo pa se lahko vežeta na DNA in tvorita dimere. Čeprav krajši obliki beljakovine E2 pomnoževanje zavirata, sta potrebni za stabilno vzdrževanje PV v celici, z daljšo obliko E2 pa lahko tvorita heterodimere, ki omogočajo pomnoževanje virusne DNA. Od več celičnih dejavnikov so do sedaj kot inhibitorja od E1/E2 odvisnega pomnoževanja potrdili samo TRIM28.

Segregacija oz. delitev virusnih genomov med hčerinske celice se razlikuje med različnimi rodovi PV. Tako pri BPV-1 poteka s pomočjo beljakovine E2, ki se veže na svoja vezavna mesta, na t.i. minikromosomske vzdrževalne elemente (angl. *minichromosomal maintenance elements*, MME) znotraj področja LCR. MME pri BPV-1 sestavlja vsaj šest vezavnih mest za beljakovino E2 (angl. *E2-binding sites*), vendar znotraj LCR pri HPV najdemo največ štiri E2 vezavna mesta, kar nakazuje, da se razlikuje tudi mehanizem segregacije. Pri BPV-1 beljakovine E2 preko MME posredujejo zasidranje virusnih genomov na kromosome celice gostitelja, kar zagotovi prenos virusnih genomov na obe hčerinski celici. Nasprotno pri nekaterih genotipih HPV (HPV-11, HPV-16 in HPV-18) beljakovine E2 virusne genome namesto na kromosome zasidrajo na mitotična vretena (Van Tine in sod., 2004).

Vloga celičnih dejavnikov pri vzdrževanju PV v latentni fazi ostaja slabo raziskana, vendar kaže, da se udeleženi faktorji razlikujejo glede na posamezne vrste PV in njihove gostitelje (Kadaža in sod., 2009b). Do sedaj najbolj raziskana tovrstna dejavnika sta Brd4 v primeru BPV-1 (angl. *bromodomain protein Brd4*) ter ChlR1 (angl. *chromosome loss-related protein 1*) v primeru BPV-1, HPV-11 in HPV-16 (McPhillips in sod., 2006; Parish in sod., 2006).

V latentni fazi vzdrževanja PV v gostiteljski celici je beljakovina E2, poleg že omenjenih funkcij, udeležena tudi pri formaciji kompleksov, ki preprečujejo prevajanje (angl. *transcription repression complexes*). Tako E2 inhibira izražanje virusne onko-beljakovine E6, ki vpliva na izražanje gena za p53 (angl. *tumor suppressor protein 53*). Pri formaciji kompleksa, ki preprečuje prevajanje, naj bi bil vključen tudi celični dejavnik Brd4, vendar njegova vloga še ni dokončno pojasnjena (Kadaža in sod., 2009b).

Nedavne raziskave so pokazale, da se PV lahko v latentni obliki, znotraj izvornih epitelnih celic, na mestu okužbe ohrani tudi potem, ko preide v vegetativno fazo in povzroči klinično očitno lezijo oz. spremembo (Maglennon in sod., 2011). Tovrstna latentna okužba lahko kasneje predstavlja izvor reaktivacije.

2.1.4.3 Vegetativna ali produktivna faza razmnoževanja virusov papiloma

Vegetativna faza predstavlja zadnjo stopnjo razmnoževanja PV, v kateri pride do povečanega pomnoževanja virusnega genoma in izražanja vseh virusnih beljakovin.

V bazalnih epitelnih celicah se proces diferenciacije prične z izgubo kontakta med celicami in bazalno membrano. Vegetativna faza razmnoževanja PV sovpada z začetkom procesa diferenciacije, zaradi česar morajo PV premostiti problem, ki ga predstavlja odsotnost

celične DNA polimeraze in faktorjev, potrebnih za pomnoževanje (prisotnih samo v mitotsko aktivnih celicah), v diferenciranih gostiteljskih celicah.

Proces, skozi katerega PV znotraj terminalno diferenciranih epitelnih celic ustvari pogoje, potrebne za pomnoževanje, ni dokončno razjasnjen, vendar naj bi ključno vlogo igrale interakcije med virusnimi onko-beljakovinami in različnimi regulatornimi beljakovinami gostitelja. Virusni onkogeni (E6, E7 itd.) na različne načine preprečujejo ustrezno delovanje kontrolnih točk celičnega cikla skozi vpletanje v regulacijo ciklinov, od ciklinov odvisnih kinaz (angl. *cyclin-dependend kinases*, cdk) in inhibitorjev cdk (Kadaja in sod., 2009b).

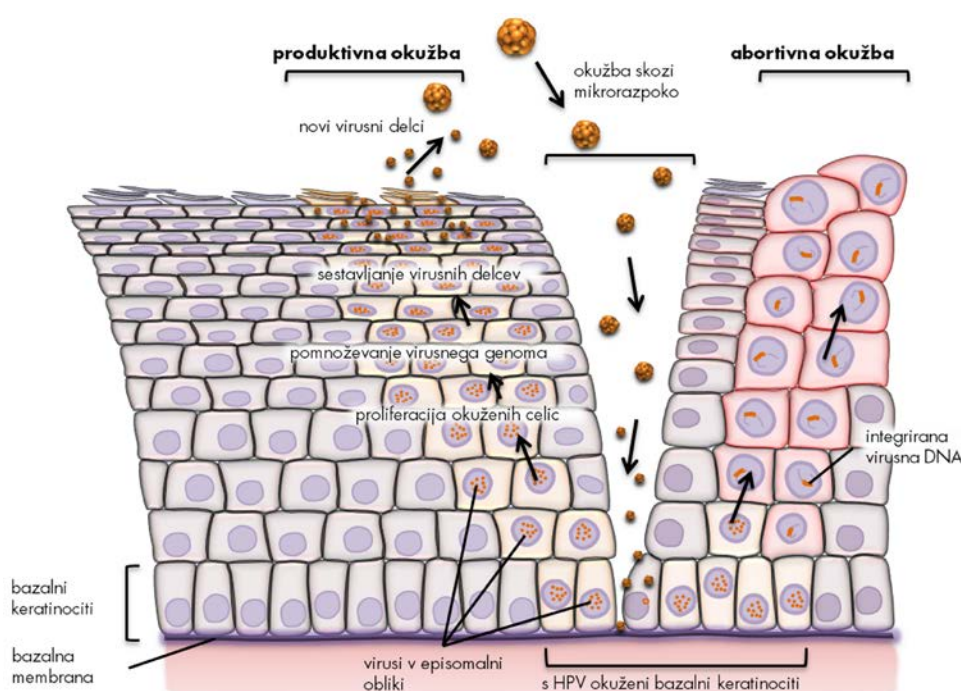
PV zaustavlja celične poti z delovanjem virusnih onko-beljakovin E6 in E7, ki uravnavajo rast gostiteljske celice med diferenciacijo in tako omogočajo ohranjanje znotrajceličnih pogojev za virusno razmnoževanje. Ob tem, da omogočajo pomnoževanje celic v suprabazalnem sloju, PV ne zaustavljajo diferenciacije, saj so za izražanje določenih virusnih beljakovin potrebni prav transkripcijski faktorji, ki se izražajo le v diferenciranih epitelnih celicah. Pri tem E6 preprečuje apoptozo, do katere lahko pride ob nenačrtovanem vstopu v S fazo, medtem ko E7 spodbuja prehod v S fazo v diferenciranih celicah (Doorbar 2005, 2007). Vloga virusnih beljakovin E6 in E7 je podrobneje razložena v sklopu abortivnega razmnoževanja PV.

Čeprav okužene celice kljub diferenciaciji ohranijo sposobnost proliferacije, je v suprabazalnem sloju le malo celic, ki bi se aktivno delile, kar je najverjetneje posledica določenega ravnotežja, ki se v okuženih celicah vzpostavi med celičnimi in virusnimi kontrolnimi mehanizmi celičnega pomnoževanja. Tovrstno situacijo, ko v suprabazalnem sloju ni veliko celic, ki bi se aktivno delile, lahko najdemo pri praktično vseh benignih spremembah, povzročenih s PV (Lazarczyk in sod., 2009). Tovrstno okužbo, ki vodi v nastanek novih, infektivnih virionov, imenujemo tudi produktivna okužba.

Po nekaterih raziskavah naj bi se PV v stopnji vegetativnega razmnoževanja pomnoževali na način kotalečega se kroga (angl. *rolling cycle replication*) (Dasgupta in sod., 1992), vendar tovrstnega načina pomnoževanja niso dokončno potrdili. Virusno pomnoževanje poteka v srednjem in vrhnjem sloju epitela, pri tem pa virusnima beljakovinama E1 in E2 pomagajo tudi druge beljakovine, kot sta E4 in E5. Vloga tako E4 kot E5 še ni dokončno pojasnjena, saj se med različnimi genotipi PV močno razlikujeta; prav tako imata različne vloge pri visoko rizičnih HPV, nizko rizičnih HPV in živalskih PV (Bravo in Alonso, 2004; Longworth in Laimins, 2004). Tako naj bi E4 imela sposobnost vezave na keratinske celične povezave pri visoko rizičnih HPV in sposobnost zaustavitve celičnega cikla pri nekaterih visoko in nizko rizičnih HPV (Longworth in Laimins, 2004). E5 naj bi bila pri nekaterih živalskih PV (BPV) sposobna povzročiti transformacijo, pri HPV pa naj bi imela sposobnost vezave epiteljskega rastnega faktorja (angl. *epithelial growth factor*, EGF)

(Longworth in Laimins, 2004). Dodatne raziskave so pokazale, da lahko pri HPV rodu *Alphapapillomavirus* najdemo vsaj štiri oblike beljakovine E5, ki se med seboj ločijo tudi po svoji funkciji (Bravo in Alonso, 2004).

Vegetativnemu pomnoževanju PV sledi izražanje virusnih beljakovin L1 in L2 ter sestavljanje virusnih delcev v zgornjih slojih okuženega epitela. Kot posledica razmnoževanja HPV nastanejo v vrhnjih epitelnih celicah za PV značilne morfološke spremembe, t.i. koilocitoza, pri čemer naj bi vlogo igrala virusna beljakovina E4 (zur Hausen, 1996; Smith in sod., 1998, Blachon in Demeret, 2003). PV niso litični, zato do sproščanja novih virusov pride pri prehodu okuženih celic na površino epitela (slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz produktivne in abortivne okužbe epitela z virusi papiloma (slika 5.4. Kovanda, 2011 v: Kocjan in Poljak, 2011)

Figure 4: Productive and abortive papillomavirus infection of the epithelium (Figure 5.4. Kovanda, 2011 in: Kocjan et Poljak, 2011).

2.1.4.4 Abortivno razmnoževanje virusov papiloma

V primerih, ko okužba s PV povzroči predrakave in rakave spremembe, v suprabazalnem sloju, v nasprotju s produktivno okužbo, najdemo večje število celic, ki se delijo. Ker ob takem poteku okužbe ne pride do nastanka novih, infektivnih, virusnih delcev, tovrstno okužbo imenujemo tudi abortivna okužba.

Poseben način pomnoževanja, ki je pogost v sklopu abortivne okužbe in vodi v nestabilnost virusnega ter posledično celičnega genoma, je t.i. pomnoževanje na način 'čebulne lupine' (angl. '*onion skin' replication*, OSR). Do njega pride, kadar pomnoževanje zaradi prevelike količine E1 poteka prehitro (Kadaja in sod., 2007, 2009b). Pri takem pomnoževanju nastajajo zapleteni, delno pomnoženi fragmenti virusnega genoma, ki so lahko tudi razvejani, enoverižni, delno dvoverižni ali popolnoma dvoverižni ter modificirani ali rekombinirani s strani celičnih dejavnikov. Tovrstni fragmenti močno spominjajo na nepopolne fragmente virusnega genoma, ki jih lahko najdemo integrirane znotraj celične DNA, vendar njihova povezava s samo integracijo še ni razjasnjena.

Za abortivno okužbo je značilna zgodnja integracija virusne DNA v genom gostitelja ob sočasni prisotnosti episomalne oblike virusnega genoma v jedru (Kadaja in sod., 2009a, 2009b). Pri integraciji krožnega PV genoma se le-ta prekine in s tem linearizira. Mesto prekinitve ni specifično; po navadi do njega pride znotraj genov E1 ali E2, medtem ko gena E6 in E7 ter področje LCR praviloma ostanejo nepoškodovani.

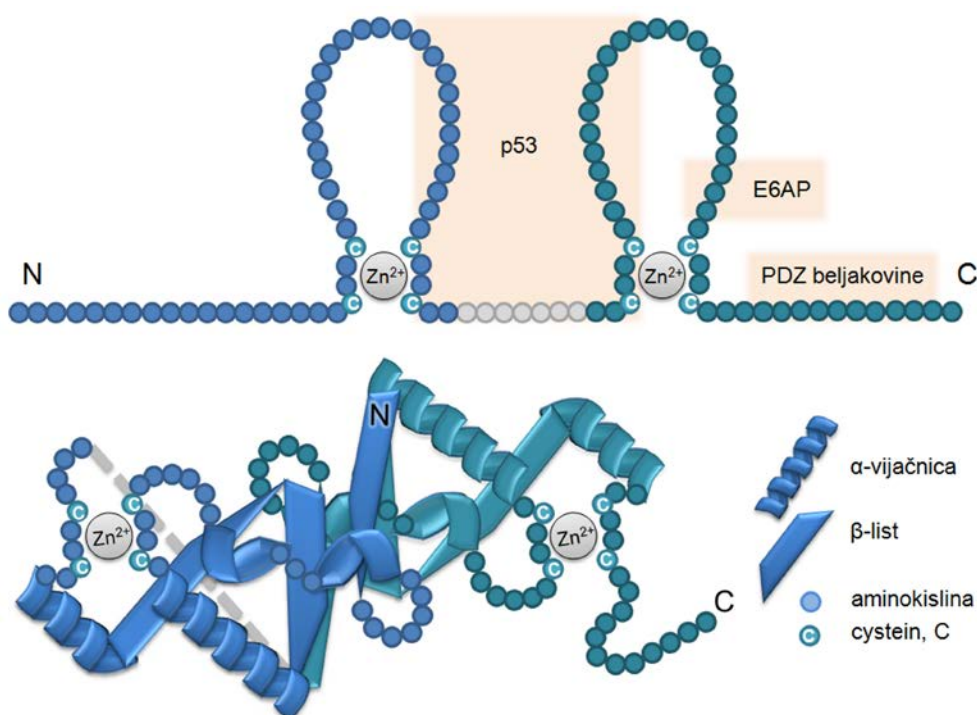
Čeprav sta v jedru na začetku prisotni tako integrirana kot episomalna oblika virusne DNA, naj bi po integraciji postopoma prišlo do izgube episomalne oblike, vendar pa slednja, dokler je še prisotna, še vedno omogoča izražanje virusnih beljakovin E1 in E2.

Po trenutno veljavnem modelu naj bi zaradi integracije virusne DNA in postopne izgube episomalne oblike prišlo do prenehanja izražanja E2, ki represorsko deluje na izražanje E6 in E7 (slika 7), kar vodi v deregulacijo celičnega cikla.

Na izražanje beljakovin E6 in E7 vpliva tudi metilacija vezavnega mesta za E2 znotraj področja LCR. Metilacija vezavnega mesta sterično ovira vezavo E2, ki tako ne more represorsko delovati na izražanje beljakovin E6 in E7 (Bhattacharjee in Sengupta, 2006). Verjetno ima prisotnost tovrstne t.i. CpG metilacije določeno vlogo na začetnih stopnjah abortivne okužbe, kasneje pa ne, saj so nedavno pokazali, da je nivo metilacije nasprotno sorazmeren s stopnjo resnosti intraepitelijskih lezij materničnega vratu (Xi in sod., 2011).

Beljakovini E6 in E7 s svojim delovanjem v sklopu vegetativne okužbe omogočata občasno pomnoževanje diferenciranih celic, medtem ko v sklopu abortivne okužbe, ko njuno izražanje ni uravnano, njuna aktivnost omogoča kaskado dogodkov, ki celico vodijo v genomsko nestabilnost (slika 7). K nastanku maligne transformacije lahko prispeva tudi beljakovina E5, vendar se njeno izražanje zaradi integracije virusnega genoma med maligno transformacijo pogosto zaustavi, tako da njena prisotnost ni nujna za vzdrževanje malignega fenotipa. Zaradi velikega kliničnega pomena največ raziskav poteka na virusnih beljakovinah E6 in E7 t.i. visoko rizičnih genotipov HPV. Prav tovrstne raziskave so pokazale, da imata tako E6 kot E7 več različnih vlog pri različnih stopnjah virusne onkogeneze.

Virusna beljakovina E6 je kratka in jo pri visoko rizičnih HPV sestavlja okoli 150 aminokislin. Vsebuje dve področji t.i. cinkovih prstov (angl. *zinc-finger motif*) in verjetno tvori psevdodimer (slika 5) (Nominé in sod., 2006). E6 ima zanimivo strukturo, ki jo sestavlja močno ohranjeno osnovno ogrodje, na katerem najdemo zelo raznolika področja, ki imajo lahko specifične funkcije pri različnih HPV. Ker je strukturo naravno zvite beljakovine E6, kljub njeni majhnosti, zelo težko analizirati, naše razumevanje le-te še ni dokončno in temelji na psevdodimernem modelu, pripravljenem na podlagi analize dveh polovic te beljakovine (Nominé in sod., 2006).



Slika 5: Virusna beljakovina E6. Vezavna mesta znotraj E6 za različne beljakovine, ključne za virusno onkogenezo, so osenčena na shematskem prikazu aminokislinskega zaporedja (zgoraj). Psevdodimerna struktura E6 je prikazana pod shematskim prikazom. Črtkana siva črta prikazuje strukturno še nerazrešene dele psevdodimera.

Figure 5: Viral protein E6. The E6 binding sites of various proteins crucial for viral oncogenesis are shaded on the schematic representation of the E6 amino acid sequence (above). The pseudo-dimer structure of E6 is displayed below the schematic representation. The dashed grey line depicts the not-yet resolved parts of the pseudodimer.

Glavni učinek pri onkogenezi naj bi beljakovina E6 imela skozi posredovanje proteasomske razgradnje p53, vendar so v zadnjih nekaj letih raziskave pokazale, da je delovanje E6 veliko bolj kompleksno, saj spreminja izražanje več celičnih genov in delovanje celičnih encimov ter stabilnost celičnih beljakovin. S tem povzroča preskok kontrolnih točk znotraj celičnega cikla (angl. *cell cycle checkpoint*), preprečuje celično smrt oz. apoptozo, okuženi celici podaljšuje življenjsko dobo in povzroča spremembe v citoskeletu in polarnosti, kar vodi v nastanek maligne transformacije.

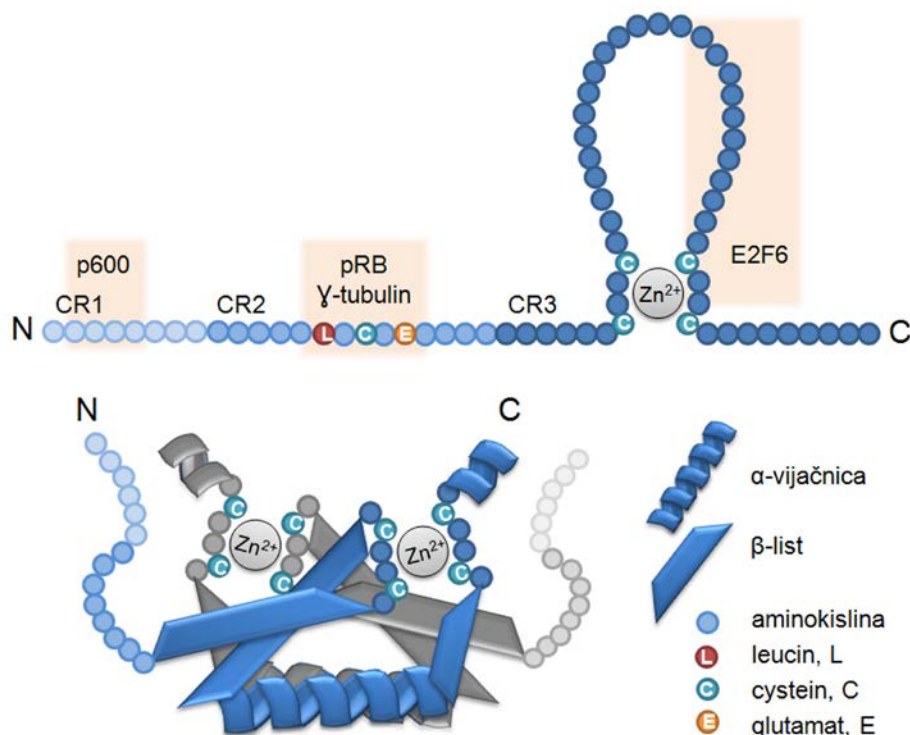
Celična beljakovina p53, na katero učinkuje virusna beljakovina E6, je ena ključnih komponent v kompleksnem sistemu preverjanja kvalitete celične DNA skozi celotni celični cikel. Beljakovina p53 se aktivira ob poškodbah DNA in ustavi celični cikel, dokler se poškodbe ne popravijo, če pa so preobsežne, p53 posreduje prehod v apoptozo. Beljakovina E6 večine PV lahko tvori kompleks s celično E6AP ubikvitinsko ligazo, vendar pa lahko ubikvitinizacijo in posledično razgradnjo p53 posredujejo le kompleksi E6/E6AP, ki vsebujejo beljakovine E6 visoko rizičnih genotipov HPV (McLaughlin-Drubin in Münger, 2009). Odsotnost p53 celici dovoljuje nadaljevanje celičnega cikla v prisotnosti poškodovane DNA, kar omogoča nastanek mutacij in vodi v maligno transformacijo.

Beljakovina E6 visoko rizičnih HPV lahko veže *c-myc* in represor telomeraze NFX1, kar povzroči večje izražanje telomeraze (hTERT), ki ima pomembno vlogo pri nastanku tumorjev. Ker pri normalnih celicah telomeraza ni aktivna, se telomere skrajšajo ob vsaki celični delitvi, to pa predstavlja t.i. 'mitotsko uro', ki določa življenjsko dobo vsake celice. Celice, v katerih je telomeraza aktivna, postanejo nesmrtni, kar je ena od značilnosti rakave preobrazbe.

Pri beljakovinah E6 visoko rizičnih HPV na C-terminalnem koncu najdemo vezavna mesta za PDZ beljakovine. Njihovo poimenovanje je akronim, ki izvira iz imen prvih treh beljakovin, kjer so dokazali t.i. PDZ domeno (angl. *post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, and *zonula occludens-1 protein (zo-1)*). PDZ beljakovine si delijo posebno 80-90 aminokislin dolgo strukturno domeno, vpletene pa so v sidranje transmembranskih beljakovin v citoskeletu in pomagajo držati skupaj različne komplekse, vpletene pri celični signalizaciji tako pri prokariotih kot pri eukariotih. Do sedaj so odkrili, da se lahko E6 visoko rizičnih HPV preko svoje PDZ domene veže na več celičnih tarč ter da so te povezave vpletene v virusno onkogenezo, vendar vsi mehanizmi tega delovanja še niso dokončno pojasnjeni.

Beljakovina E6 naj bi bila, ob vseh ostalih funkcijah, vpletena tudi v t.i. tranzicijo iz epitela v mezenhim (angl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT) in v spodbujanje izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). VEGF je eden najpomembnejših spodbujevalcev angiogeneze, ki je pomembna za nastanek in obstanek tumorjev.

Virusna beljakovina E7 je zelo kratka in jo pri visoko rizičnih HPV sestavlja okoli 100 aminokislin. Glede na homologijo z adenovirusno onkobeljakovino E1A lahko E7 razdelimo na tri domene: CR1, CR2 in CR3 (slika 6). Podobno kot pri E6 tudi pri E7 znotraj domene CR3 najdemo področje cinkovih prstov, ki omogoča dimerizacijo in pravilno delovanje beljakovine E7 (Liu, 2005).



Slika 6: Virusna beljakovina E7. Vezavna mesta znotraj E7 za različne beljakovine ključne za virusno onkogenezo so osenčena na shematskem prikazu aminokislinskega zaporedja (zgoraj). E7 dimer, ki predstavlja funkcionalno obliko beljakovine, je prikazan pod shematskim prikazom.

Figure 6: Viral protein E7. The E7 binding sites of various proteins, crucial for viral oncogenesis, are shaded on the schematic representation of the E6 amino acid sequence (above). The E7-dimer, representing the functional form of E7, is displayed below the schematic representation.

Virusna beljakovina E7 spreminja izražanje celičnih genov in uravnava po-translacijske modifikacije, stabilnost in lokalizacijo celičnih beljakovin znotraj celice. S tem vpliva na povečano pomnoževanje DNA, preprečuje celično smrt oz. apoptozo, spreminja metabolni profil celice, povzroča genomsko nestabilnost in okuženi celici obenem podaljšuje življenjsko dobo, kar vodi v nastanek maligne transformacije (McLaughlin-Drubin in Münger, 2009).

Glavni učinek na onkogenezo naj bi E7 dosegla z vezavo na pRb (angl. *retinoblastoma protein*), vendar so v zadnjih nekaj letih raziskave pokazale, da je delovanje E7 zelo kompleksno, saj lahko veže še druge beljakovine iz družine tumorskih supresorjev (npr. p107 in p130), histonske deacetilaze in acetil transferaze (vpletene v modifikacijo histonov), transkripcijske faktorje (npr. AP-1, TATA-box vezavne beljakovine itd.), cikline, od ciklinov odvisne kinaze in inhibitorje cdk, preko katerih lahko vpliva na pospešeno celično razmnoževanje in diferenciacijo. Tako lahko med drugim E7 HPV-16, celo ovira transkripcijsko aktivnost p53, kar je zanimivo, saj naj bi bila za glavno zaviranje delovanja p53 odgovorna virusna beljakovina E6.

E7, kot je že bilo omenjeno, doseže povečano in nekontrolirano pomnoževanje DNA v okuženi celici z vezavo beljakovine pRb s pomočjo LXCXE motiva (slika 6). Beljakovina pRb skupaj z E2F znotraj neokužene celice tvori kompleks pRb/E2F, ki deluje kot transkripcijski represor. V G1 fazi celičnega cikla cdk4 in/ali cdk6/ciklin D kompleks fosforilira pRb, zaradi česar pride do razpada pRb/E2F kompleksa. Nato lahko prosti E2F deluje kot aktivator transkripcije za gene, ki uravnavajo prehod v S fazo celičnega cikla.

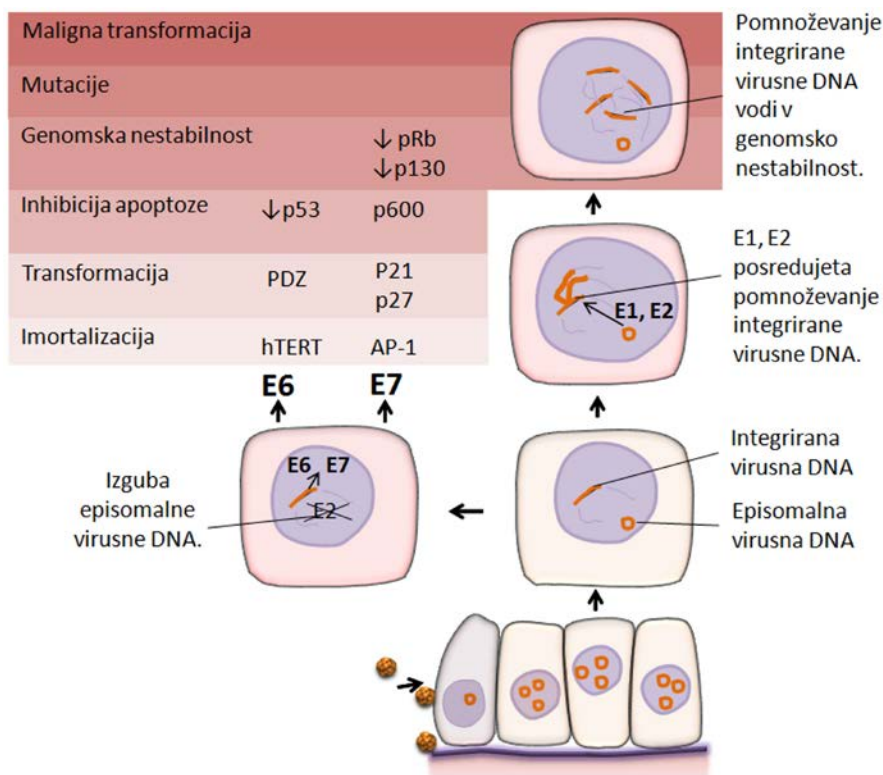
Virusna beljakovina E7 preferenčno veže hipofosforiliran pRb in posreduje njegovo ubikvitinizacijo in razgradnjo v proteasomu, kar vodi v nekontrolirano pomnoževanje celične DNA. Za inaktivacijo pRb zadoščajo zelo nizke koncentracije E7. Dodatno lahko E7 na delovanje E2F vpliva tako, da z vezavo na določene transkripcijske faktorje poveča njegovo izražanje. E7 se lahko s svojo C-terminalno domeno veže tudi na beljakovino E2F6 iz družine E2F beljakovin, ki deluje kot transkripcijski represor in zadržuje prehod iz S faze celičnega cikla v G1 fazo celičnega cikla. E7 s svojo vezavo inaktivira E2F6 in omogoči nadaljnje pomnoževanje celice (McLaughlin-Drubin in Münger, 2009).

Poleg inaktivacije pRb in E2F6 vpliva E7 tudi na povečano izražanje ciklinov E in A ter inhibira inhibitorja cdk, p21 in p27, ki bi se v normalnih okoliščinah aktivirala v pomanjkanju rastnih faktorjev in celičnih stikov ter ob prisotnosti p53. Inhibitorja naj bi imela vlogo tudi pri povezavi med ustavitvijo celičnega cikla in diferenciacijo. Njuna inhibicija s strani E7 verjetno vpliva na deregulacijo obeh procesov, kar je nujno za virusno pomnoževanje tako v sklopu produktivne kot abortivne virusne okužbe. Povečano izražanje ciklinov E in A, ki tvorita podenoti cdk2, vpliva na formacijo večjega števila centrosomov, kar vodi v nastanek aneuploidij, značilnih za rakave celice. E7 onemogoča tvorbo povezav γ -tubulina s centrosomi, prav tako pa dodatno prispeva k nastanku aneuploidij tako, da s svojo povezavo z beljakovino NuMA (angl. *nuclear and mitotic apparatus protein-1*) preprečuje pravilno poravnavo kromosomov med mitozo (McLaughlin-Drubin in Münger, 2009).

E7 sodeluje tudi pri nastanku metabolnega profila, značilnega za tumorske celice, in sicer tako, da aktivira nekatere celične encime (npr. M2-PK piruvatna kinaza, kislinska alfa glukozidaza itd.), ki omogočajo hitrejšo izrabo celičnih zalog glikogena in pospešujejo biosintezo, ter obenem zmanjšujejo potrebo celice po kisiku (Chakrabarti in Krishna, 2003).

Za tumorske celice je značilno, da za uspešno delitev ni potrebna prisotnost medceličnih stikov. Za preprečevanje tovrstnih delitev pri zdravih celicah skrbi posebna različica apoptoze, imenovana anoikis (angl. *anoikis*), ki jo regulira beljakovina p600 na še ne povsem pojasnjen način. Virusna beljakovina E7 lahko veže p600 in tako prepreči anoikis, s čimer dodatno vpliva na razvoj raka.

Beljakovini E6 in E7 se vpletata tudi v delovanje citotoksičnega ali citostatičnega citokinskega signaliziranja, vendar pa mehanizmi njunega delovanja še niso povsem pojasnjeni.



Slika 7: Shematski prikaz mehanizmov nastanka maligne transformacije kot posledice okužbe z virusi papiloma

Figure 7: The mechanisms of malignant transformation caused by papillomavirus infection.

Na nastanek genomske nestabilnosti okužene celice in razvoj raka lahko vpliva tudi sama integracija virusnega genoma v celično DNA, saj integrirana oblika še vedno vključuje mesto začetka virusnega pomnoževanja (slika 7). Čeprav integracija prekine zapise za beljakovini E1 in E2, ki sta ključni za virusno pomnoževanje, kratkotrajni sočasni obstoj virusnih episomov v okuženi celici omogoča izražanje obeh beljakovin, kar vodi v začetek pomnoževanja integrirane DNA. Tako pod vplivom pomnoževanja s pomočjo E1 in E2 iz integrirane virusne DNA nastajajo delni prepisi virusne in bližnje ležeče celične DNA (Kadaja in sod., 2007, 2009a). Tovrstno nenadzorovano pomnoževanje naj bi aktiviralo celične mehanizme popraviljanja, kar naknadno vodi v večje spremembe na nivoju celičnega genoma, kot so translokacije v kromosomih in med njimi.

2.2 FILOGENETSKO RAZVRŠČANJE VIRUSOV PAPILOMA

PV so bili med prvimi virusi, pri katerih se je, zaradi nezmožnosti gojenja in slabega imunskega odziva na okužbo s PV, kar je onemogočalo gojitveni oz. serološki sistem razvrščanja, uveljavilo razvrščanje na podlagi primerjave delnih nukleotidnih zaporedij virusnega genoma.

Filogenetsko razvrščanje PV tako trenutno temelji na primerjavi virusnega gena L1, saj je le-ta relativno ohranjen in omogoča poravnavo vseh poznanih PV. Na podlagi primerjave virusnega gena L1 in drugih virusnih značilnosti tako PV razvrščamo na rodove (označene z grškimi črkami, npr. *Alphapapillomavirus*), vrste in genotipe.

Pri vrstah PV sta, pogosto sočasno, v uporabi dve paralelni poimenovanji: poimenovanje s strani ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (Fauquet, 2005), ki za določitev virusne vrste uporablja ime obstoječega virusa, druge viruse znotraj iste vrste pa obravnava kot seve (angl. *strain*); in poimenovanje s strani Referenčnega centra za viruse papiloma (de Villiers in sod., 2004), ki je virusne vrste znotraj virusnega rodu poimenoval z zaporednimi števkami (preglednica 1). Tako npr. v vrsto 9 rodu *Alphapapillomavirus*, katere tipsko vrsto predstavlja HPV-16, spadajo genotipi HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58 in HPV-67 (preglednica 2).

V smernicah, sprejetih leta 2004, je bilo dodatno določeno, da kot poseben genotip PV lahko opredelimo izolat, katerega nukleotidno zaporedje celotnega gena L1 izkazuje manj kot 90 % ujemanje z genom L1 drugih uradno priznanih genotipov PV. Genotipi PV so bili takrat v vrste in rodove združeni tako na podlagi filogenetskih kot bioloških podobnosti, pri čemer naj bi različni rodovi PV med seboj imeli manj kot 60 % podobnosti v genu L1, vrste znotraj rodov naj bi imele 60-70 % podobnosti nukleotidnega zaporedja gena L1, genotipi znotraj vrst pa naj bi imeli 71-89 % podobnosti nukleotidnega zaporedja gena L1.

V najnovejših smernicah iz leta 2010 so bile, delno zaradi dvojnega poimenovanja in delno zaradi novih dognanj, predvsem pa zaradi velikega števila novih PV, predlagane določene spremembe v razvrščanju PV (Bernard in sod., 2010). Tako bodo, v skladu s konceptom filogenetske vrste, ki v virologiji še ni dobro uveljavljen pojem, v prihodnosti verjetno virusni genotipi prekvalificirani v virusne vrste, virusne vrste pa v pod-rodove, saj trenutna klasifikacija na nivoju vrst slabo odraža biološke lastnosti genotipov PV, ki jih združuje (Bernard in sod., 2010). Prav tako so zaradi premajhnega števila črk v grški abecedi poimenovanje dodatnih PV rodov nadaljevali z uporabo predpone *dyo-*. Razvrstitev PV s trenutno veljavnimi rodovi, vrstami in tipskimi vrstami prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Rodovi in vrste virusov papiloma (de Villiers in sod., 2004; Fauquet, 2005; Bernard in sod., 2010)

Table 1: Genera and species of papillomaviruses (de Villiers et al., 2004; Fauquet, 2005; Bernard et al., 2010).

Rod PV	Vrsta (splošna uporaba)*	Vrsta (ICTV)**
<i>Alphapapillomavirus</i>	1	HPV-32
	2	HPV-10
	3	HPV-61
	4	HPV-2
	5	HPV-26
	6	HPV-53
	7	HPV-18
	8	HPV-7
	9	HPV-16
	10	HPV-6
	11	HPV-34
	12	MmPV-1, <i>Macaca mulata Papillomavirus 1</i>
	13	HPV-54
	14	HPV-90
<i>Betapapillomavirus</i>	1	HPV-5
	2	HPV-9
	3	HPV-49
	4	HPV-92
	5	HPV-96
	6	MfPV-2, <i>Macaca fascicularis Papillomavirus 2</i>
<i>Gammapapillomavirus</i>	1	HPV-4
	2	HPV-48
	3	HPV-50
	4	HPV-60
	5	HPV-88
	6	HPV-101
	7	HPV-109
	8	HPV-112
	9	HPV-116
	10	HPV-121
<i>Deltapapillomavirus</i>	1	AaPV-1, <i>Alces alces Papillomavirus 1</i>
	2	OvPV-1, <i>Odocoileus virginianus Papillomavirus 1</i>
	3	OaPV-1, <i>Ovis aries Papillomavirus 1</i>
	4	BPV-1, <i>Bos taurus Papillomavirus 1</i>
	5	CcPV-1, <i>Capreolus capreolus Papillomavirus 1</i>
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	1	BPV-5, <i>Bos taurus Papillomavirus 5</i>
<i>Zetapapillomavirus</i>	1	EcPV-1, <i>Equus caballus Papillomavirus 1</i>
<i>Etapapillomavirus</i>	1	FcPV-1, <i>Fringilla coelebs Papillomavirus 1</i>
<i>Thetapapillomavirus</i>	1	PePV1, <i>Psittacus erithacus Papillomavirus 1</i>
<i>Iotapapillomavirus</i>	1	MnPV-1, <i>Mastomys natalensis Papillomavirus 1</i>
<i>Kappapapillomavirus</i>	1	OcPV-1, <i>Oryctolagus cuniculus Papillomavirus 1</i>
	2	SfPV-1, <i>Sylvilagus floridanus Papillomavirus 1</i>

se nadaljuje...
to be continued...

Nadaljevanje preglednice 1: Rodovi in vrste virusov papiloma (de Villiers in sod., 2004; Fauquet, 2005; Bernard in sod., 2010)

Table 1 (continued): Genera and species of papillomaviruses (de Villiers et al., 2004; Fauquet, 2005; Bernard et al., 2010).

Rod PV	Vrsta (splošna uporaba)*	Vrsta (ICTV)**
<i>Lambdapapillomavirus</i>	1	FdPV-1, <i>Felis domesticus Papillomavirus 1</i>
	2	CPV-1, <i>Canis familiaris Papillomavirus 1</i>
	3	CPV-6, <i>Canis familiaris Papillomavirus 6</i>
	4	PIPV-1, <i>Procyon lotor Papillomavirus 1</i>
<i>Mupapillomavirus</i>	1	HPV-1
	2	HPV-63
<i>Nupapillomavirus</i>	1	HPV-41
<i>Xipapillomavirus</i>	1	BPV-3, <i>Bos taurus Papillomavirus 3</i>
<i>Pipapillomavirus</i>	1	MaPV-1, <i>Mesocricetus auratus Papillomavirus 1</i>
	2	MmPV-1, <i>Micromys minutus Papillomavirus 1</i>
<i>Rhopapillomavirus</i>	1	TmPV-1, <i>Trichechus manatus latirostris Papillomavirus 1</i>
<i>Sigmapapillomavirus</i>	1	EdPV-1, <i>Erethizon dorsatum Papillomavirus 1</i>
<i>Taupapillomavirus</i>	1	CPV-2, <i>Canis familiaris Papillomavirus 2</i>
<i>Upsilonpapillomavirus</i>	1	TtPV-1, <i>Tursiops truncatus Papillomavirus 1</i>
	2	TtPV-2, <i>Tursiops truncatus Papillomavirus 2</i>
<i>Psipapillomavirus</i>	1	RaPV-1, <i>Rousettus aegyptiacus Papillomavirus 1</i>
<i>Omegapapillomavirus</i>	1	UmPV-1, <i>Ursus maritimus Papillomavirus 1</i>
<i>Dyodeltapapillomavirus</i>	1	SsPV-1, <i>Sus scrofa Papillomavirus 1</i>
<i>Dyoepsilonpapillomavirus</i>	1	FlPV-1, <i>Francolinus leucoscepus Papillomavirus 1</i>
<i>Dyozetapapillomavirus</i>	1	CcPV-1, <i>Caretta caretta Papillomavirus 1</i>
<i>Dyoetapapillomavirus</i>	1	EePV-1, <i>Erinaceus europaeus Papillomavirus 1</i>
<i>Dyothetapapillomavirus</i>	1	FdPV-2, <i>Felis domesticus Papillomavirus 2</i>
<i>Dyoiotapapillomavirus</i>	1	EcPV-2, <i>Equus caballus Papillomavirus 2</i>

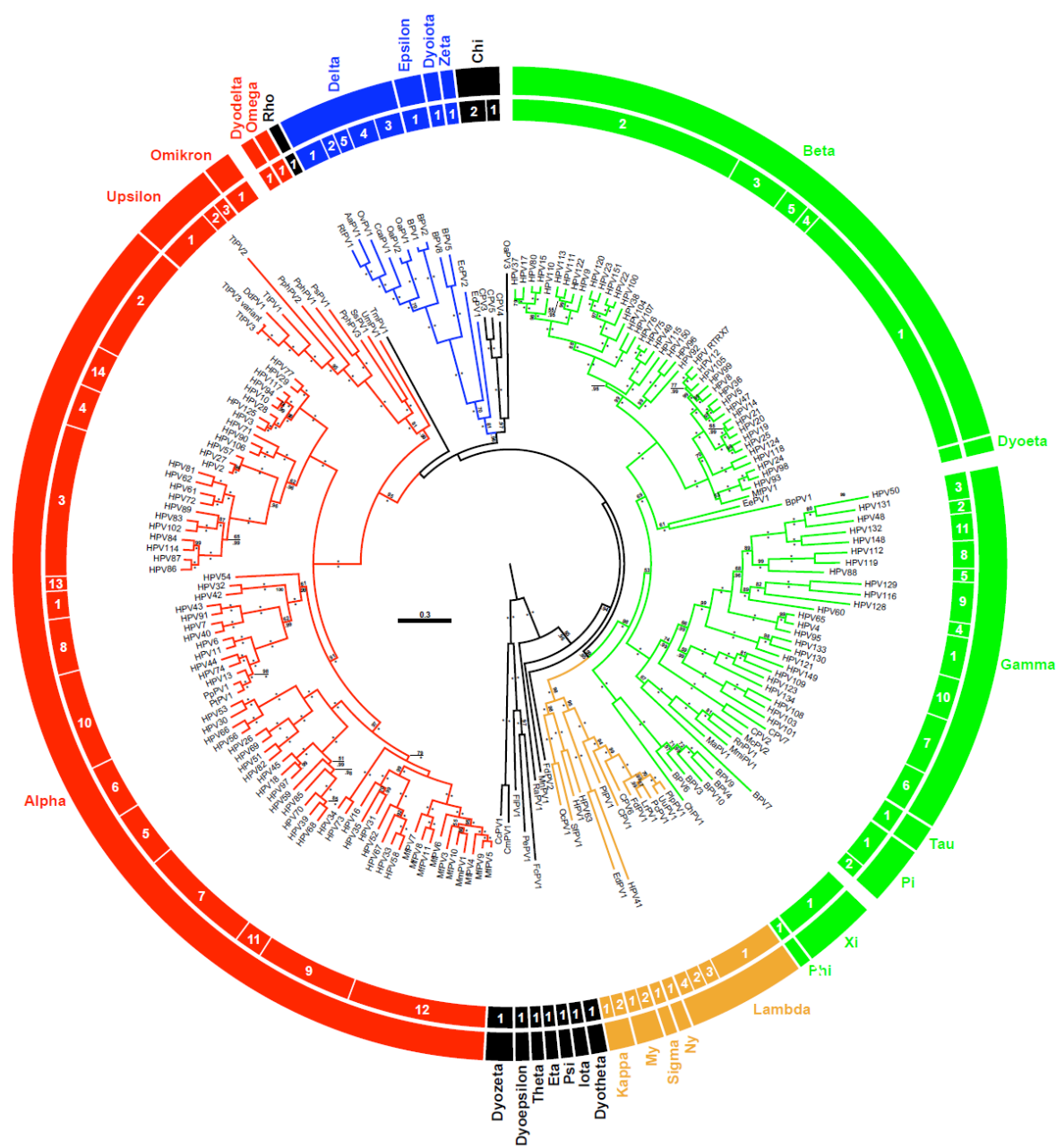
*(de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010). **International Committee on Taxonomy of Viruses (Fauquet et al., 2005). Polno ime je podano samo za živalske PV.

*(de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010). **International Committee on Taxonomy of Viruses (Fauquet et al., 2005). Full names are given for animal PVs only.

Nove smernice so prav tako prinesle novosti na področju poimenovanja živalskih PV. Nove živalske genotipe PV naj bi od sedaj poimenovali glede na kratico, sestavljeno iz latinskega imena živali gostiteljice. Izjema so bovini in pasji PV, kjer sta imeni BPV in CPV že zelo uveljavljeni in bosta zato ohranjeni.

Čeprav je gen L1 primeren za primerjavo PV na nivoju genotipov in vrst, je s sočasno primerjavo več virusnih genov mogoče razrešiti tudi filogenetska razmerja nad nivojem rodov, kar bo pomembno, če bo prišlo do nadgradnje virusnih genotipov v virusne vrste, kot je bilo predlagano v zadnjih smernicah.

Analize združenega zaporedja več virusnih genov (npr. E1-E2-L1) se vedno bolj uveljavljajo in so pokazale obstoj vsaj štirih naravnih 'kronskih' skupin (angl. *crown groups*) pri PV, ki jih odlikujejo podobnosti na nivoju večjega dela virusnega genoma (Bravo in sod., 2010; Gottschling in sod., 2011) (slika 8).



Slika 8: Filogenetsko drevo 207 genotipov virusov papiloma, pripravljeno na podlagi analize združenega aminokislinskega zaporedja genov E1-E2-L1 (Gottschling in sod., 2011). Legenda: rdeča = kronska skupina *Alpha-Omega*, modra = kronska skupina *Delta-Zeta*, zelena = kronska skupina *Beta-Xi*, oranžna = kronska skupina *Lambda-Mu*.

Figure 8: Phylogenetic tree of 207 papillomavirus genotypes, based on the analysis of a concatenated amino acid sequence of E1-E2-L1 viral genes (Gottschling et al., 2011). Legend: red = crown group *Alpha-Omega*, blue = crown group *Delta-Zeta*, green = crown group *Beta-Xi*, orange = crown group *Lambda-Mu*.

Filogenetske analize več virusnih genov so dodatno pokazale, da se različni virusni geni in virusni rodovi razvijajo z različnimi hitrostmi (Chan in sod., 1995; Garcia-Vallve in sod., 2005; Gottschling in sod., 2007a; 2007b). Dodatno so s filogenetsko primerjavo med PV in

njihovimi gostitelji ugotovili, da je kodivergenca (angl. *co-divergence*) med virusi in gostitelji, ki je veljala za glavni mehanizem evolucije pri PV (Van Ranst in sod., 1995; Halpern, 2000; Bernard, 2005), le eden od procesov, udeleženih pri evoluciji PV, ter da k slednji pomembno prispevajo tudi procesi, kot so adaptivna radiacija (angl. *adaptive radiation*) oz. virusne duplikacije znotraj gostitelja, izmenjava virusov med različnimi vrstami gostiteljev (angl. *lateral transfer events*, *host-switch*) ter rekombinacija (Gottschling in sod., 2007b, 2011; Bravo in sod., 2010).

Glede na število HPV pri človeku lahko v prihodnosti pričakujemo opredelitev večjega števila živalskih PV. Nedvomno bodo dodatno odkriti PV prispevali k našemu razumevanju evolucije pri PV, zaradi česar bo na tem področju verjetno sčasoma prišlo tudi do sprememb v sedanjí klasifikaciji.

2.2.1 Humani virusi papiloma

Viruse papiloma, katerih gostitelj je človek, to je HPV, uvrščamo v virusne rodove *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* in *Nupapillomavirus* (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010). Do sedaj je bilo z določitvijo celotnega nukleotidnega zaporedja genoma opredeljenih več kot 150 genotipov HPV, vendar naj bi, po ocenah, pridobljenih na podlagi različnih delnih nukleotidnih zaporedij, dejansko obstajalo več kot 200 različnih genotipov HPV.

Za opredelitev in priznanje novega genotipa HPV je potrebno celoten genom izolata HPV vklonirati v plazmidni vektor in mu določiti celotno nukleotidno zaporedje. Zaporedne številke novo opredeljenih genotipov HPV dodeljuje Referenčni center za viruse papiloma (Deutsches Krebs-Forschungszentrum, DKFz) v Heidelbergu, ki deluje tudi kot zbirka in distribucijski center za klone HPV (de Villiers in sod., 2004). Tradicionalno so genotipi HPV po številkah označeni glede na zaporedje, po katerem so bili prvič opredeljeni, ne glede na filogenetsko sorodnost ali klinični pomen (de Villiers in sod., 2004).

PV pod nivojem genotipa še vedno razvrščamo glede na smernice iz leta 2004. Če je neskladnost v genu L1 dveh PV med 2 % in 10 %, ju štejemo za virusna podtipa, če pa je raznolikost L1 manj od 2 %, ju štejemo kot genomski različici določenega genotipa (de Villiers in sod., 2004).

Različni genotipi HPV pri človeku so etiološko povezani z nastankom malignih in benignih sprememb sluznice in kože, zato ravno genotipi predstavljajo najpomembnejši nivo razvrščanja (Muñoz, 2000). Vrsto razporeditev, tkivni tropizem in bolezni, povezane z genotipi HPV, prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Vrstna razporeditev, tkivni tropizem in bolezni, povezane z genotipi HPV (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010)

Table 2: Species, tissue tropism and diseases associated with HPV genotypes (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010).

Rod PV	Vrsta	Tipska vrsta	Genotipi HPV	Tkivni tropizem, bolezni
Alfa	1	HPV-32 (X74475)	HPV42 (M73236)	Oralna in genitalna sluznica, nizkorizične spremembe
	2	HPV-10 (X74465)	HPV-3 (X74462) HPV-28 (U31783) HPV-29 (U31784) HPV-78 (T. Matsukura) HPV-77 (Y15175) HPV-94 (AJ620211) HPV-117(GQ246950) HPV-125 (FN547152)	Koža, ploščate bradavice, nizkorizične spremembe
	3	HPV-61 (U31793)	HPV-72 (X94164) HPV-81 (AJ620209) HPV-83 (AF151983) HPV-84 (AF293960) HPV 62(AY395706) HPV86 (AF349909) HPV87 (AJ400628) HPV89(AF436128) HPV-102 (DQ080083) HPV-114(GQ244463)	Sluznica, nizkorizične spremembe
	4	HPV-2 (X55964)	HPV-27 (X74473) HPV-57 (X55965)	Navadne kožne bradavice, pogosto v benignih genitalnih lezijah pri otrocih
	5	HPV-26 (X74472)	HPV-51 (M62877) HPV-69 (AB027020) HPV-82 (AB027021)	Sluznica, visoko in nizkorizične spremembe
	6	HPV-53 (X74482)	HPV-30 (X74474) HPV-56 (X74483) HPV-66 (U31794)	Sluznica, visoko in nizkorizične spremembe
	7	HPV-18 (X05015)	HPV-39 (M62849) HPV-45 (X74479) HPV-59 (X77858) HPV-68 (X67161) HPV-70 (U21941) HPV-85 (AF131950) HPV-97 (DQ080080)	Sluznica, visokorizične spremembe
	8	HPV-7 (X74463)	HPV-40 (X74478) HPV-43 (AJ620205) HPV-91 (AF131950)	Sluznica in koža, nizkorizične spremembe. Pogosto jih najdemo pri HIV bolnikih.
	9	HPV-16 (K02718)	HPV-31 (J04353) HPV-33 (M12732) HPV-35 (X74476) HPV-52 (X74481) HPV-58 (D90400) HPV-67 (D21208)	Sluznica, visokorizične in maligne spremembe
	10	HPV-6 (X00203)	HPV-11 (M14119) HPV-13 (X62843) HPV-44 (U31788) , podtip HPV-55 HPV-74 (U40822) PcPV (X62844)	Sluznica, povzročajo genitalne bradavice in nizkorizične spremembe
	11	HPV-34 (X74476), podtip HPV-64	HPV-73 (X94165)	Sluznica, visokorizične spremembe
	13	HPV-54 (U37488)		Sluznica, nizkorizične spremembe
	14	HPV-90 (AY057438)		
	15	HPV-71 (AB040456)	HPV-106(DQ080082)	

se nadaljuje.../to be continued...

Nadaljevanje. Preglednica 2: Vrstna razporeditev, tkivni tropizem in bolezni, povezane z genotipi HPV (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010)

Table 2 (continued): Species, tissue tropism and diseases associated with HPV genotypes (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010).

Rod PV	Vrsta	Tipična vrsta	Genotipi HPV	Tkivni tropizem, bolezni
Beta	1	HPV-5 (M17463)	HPV-8 (M12737) HPV-12 (X74466) HPV-14 (X74467) HPV-19 (X74470) HPV-20 (U31778), podtip HPV-46 HPV-21 (U31779) HPV-24 (U31782) HPV-25 (X74471) HPV-36 (U31785) HPV-47 (M32305) HPV-93(AY382778) HPV-98(NC 012744) HPV-99(NC 012745) HPV-105(NC 012747) HPV-118(GQ246951) HPV-124(GQ845446)	Najpogostejše povzročajo kožne spremembe, vendar so bili najdeni tudi v sluzničnih spremembah. Pogosto so povezani s spremembami pri bolnikih z boleznijo <i>epidermodysplasia verruciformis</i> (EV) in bolnikih z imunosupresijo. Večinoma povzročajo benigne spremembe, vendar so včasih prisotni tudi pri malignih spremembah pri imunokompetentnih osebah.
	2	HPV-9 (X74464)	HPV-15 (X74468) HPV-17 (X74469) HPV-22 (U31780) HPV-23 (U31781) HPV-37 (U31786) HPV-38 (U31787) HPV-80 (Y15176) HPV-100(NC 012746) HPV-104(NC 012750) HPV-107(EF422221) HPV-110(EU410348) HPV-111(EU410349) HPV-113(NC 012748) HPV-120(GQ845442) HPV-122(GQ845444) HPV-151 (FN677756)	
	3	HPV-49 (X74480)	HPV-75 (Y15173) HPV-76 (Y15174) HPV-115(FJ947080)	Koža, benigne spremembe
	4	HPV-92 (AF531420)	-	Koža, benigne, predmaligne in maligne spremembe
	5	HPV-96 (AY382779)	HPV-150 (FN677755)	
Gamma	1	HPV-4 (X70827)	HPV-65 (X70829) HPV-95(AJ620210)	Koža, različne spremembe
	2	HPV-48 (U31789)	-	
	3	HPV-50(U31790)	-	
	4	HPV-60 (U31792)	-	
	5	HPV-88 (EF467176)	-	
	6	HPV-101(NC 008189)	HPV-103(NC 008188) HPV-108(NC 012213)	
	7	HPV-109(NC 012485)	HPV-123(GQ845445) HPV-149(GU117629)	
	8	HPV-112(NC 012486)	HPV-119(GQ845441)	
	9	HPV-116(FJ804072)	-	
	10	HPV-121(GQ845443)	HPV-127(HM011570) HPV-130(GU117630) HPV-133(GU117633)	
	?	HPV-128(GU225708), HPV-129(GU233853), HPV-131(GU117631), HPV-132(GU117632), HPV-134(GU117634), HPV-148(GU129016)		

se nadaljuje.../to be continued...

Nadaljevanje. Preglednica 2: Vrsta razporeditev, tkivni tropizem in bolezni, povezane z genotipi HPV (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010)

Table 2 (continued): Species, tissue tropism and diseases associated with HPV genotypes (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010).

Rod PV	Vrsta	Tipična vrsta	Genotipi HPV	Tkivni tropizem, bolezni
Mu	1	HPV-1 (V01116)	-	Kožne bradavice, benigne spremembe
	2	HPV-63 (X70828)	-	
Nu	1	HPV-41 (X56147)	-	Kožne bradavice, benigne spremembe

Legenda: rdeča = visokorizični HPV, rjava = HPV z etiolško manjšim doprinosom, vijolična = HPV z nejasno vlogo, oranžna = HPV, katerih vključitev v presejalne teste za visoko rizične genotipe se odsvetuje, zelena = nizkorizični genotipi HPV

Legend: red = high risk HPV, brown = HPV with somewhat lesser etiological impact on the development of cervical cancer, violet = HPV with an unclear role in the development of cervical cancer, orange = HPVs that should be excluded from diagnostic tests for the determination of high risk genotypes, green = low risk HPV genotypes.

2.3 ZNAČILNOSTI OKUŽB S HPV

Okužbe s HPV so večinoma subklinične in same izzvenijo, redkeje pa lahko HPV povzročajo tudi dolgotrajnejše oz. perzistentne okužbe, ki so predpogoj za nastanek kliničnih sprememb. Vzpostavitev perzistentne okužbe je povezana z več dejavniki, med drugim z genetskim ozadjem gostitelja, različnimi zunanjimi vplivi (kajenje, imunosupresija) in biološkimi značilnostmi prisotnega genotipa HPV. Glede na anatomsko mesto lahko okužbe s HPV razdelimo na sluznične ali kožne, glede na izid pa na benigne ali maligne klinične spremembe.

2.3.1 Sluznične spremembe, povezane z okužbo s HPV

Sluznične spremembe zaradi HPV povezujemo s tako imenovanimi sluzničnimi oziroma anogenitalnimi genotipi HPV, ki jih uvrščamo v vrste 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 in 15 rodu *Alphapapillomavirus* (preglednica 2).

Glede na njihov onkogeni potencial sluznične genotipe HPV delimo na visoko rizične, verjetno visoko rizične in nizko rizične genotipe ter genotipe z nejasnim onkogenim potencialom (de Villiers in sod., 2004; Munoz in sod., 2003).

2.3.1.1 Benigne sluznične spremembe, povezane z okužbo s HPV

Benigne sluznične spremembe, kot so anogenitalne bradavice, papilomi grla in benigne oralne lezije, povezujemo s t.i. nizko rizičnimi genotipi HPV, od katerih sta najpogostejša HPV-6 in HPV-11, sledijo pa jima genotipi HPV-13, HPV-32, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81 in HPV-89 (preglednica 2).

2.3.1.1.1 Benigne spremembe anogenitalne sluznice, povezane z okužbo s HPV

Veliko večino benignih anogenitalnih sprememb povzročata genotipa HPV-6 in HPV-11 iz vrste 10 virusnega rodu *Alphapapillomavirus*, tovrstne spremembe pa lahko povzročajo tudi preostali nizko rizični genotipi, kot so HPV-40, HPV-41, HPV-43, HPV-44 (podtip HPV-55), HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81 in HPV-89. Anogenitalne bradavice ali kondilomi (*condyloma accuminata*) so benigne lezije, ki zajemajo vse sloje diferenciranega epitela in se lahko pojavljajo na celotnem anogenitalnem predelu kot posamične lezije ali v večjem številu. Kondilomi pod vplivom imunskega sistema pogosto samodejno izginejo po nekaj mesecih, vendar lahko v določenih primerih pride do rekurence oz. so lahko kondilomi prisotni tudi trajno.

Posebna, redka oblika anogenitalnih bradavic so orjaški kondilomi Buscke-Lowenstein, ki se pojavljajo pri bolnikih z določenimi prirojenimi genetskimi spremembami. Pri takih bolnikih lahko po daljšem času pride tudi do maligne transformacije teh sprememb.

2.3.1.1.2 Benigne spremembe ustne votline in grla, povezane z okužbo s HPV

Tako kot kondilome tudi benigne spremembe na grlu oz. papilome grla povzročata predvsem genotipa HPV-6 in HPV-11. Osebe, ki se s HPV-6 ali HPV-11 okužijo ob rojstvu, lahko razvijejo rekurentno respiratorno papilomatozo (angl. *recurrent respiratory papillomatosis*, RRP), za katero je značilna hitra in nenadzorovana rast papilomov grla, ki se lahko razširijo na področje traheje in celo pljuč. Tovrstne hitro rastoče spremembe so nevarne, saj zapirajo zračne poti, zato bolniki potrebujejo zelo pogoste operativne posege.

Fokalna epitelna hiperplazija ustne votline (angl. *oral focal epithelial hyperplasia*, FEH) ali Heckova bolezen je redka benigna bolezen, ki se pojavlja predvsem pri otrocih in je pogostejša pri določenih etničnih skupinah, kot so npr. Inuiti. Za bolezen je značilen pojav privzdignjenih lezij oz. bradavic na predelu ustne sluznice in jezika. Bolezen povzročata genotipa HPV-13 in HPV-32, ki se uvrščata v vrsto 10 (skupaj s HPV-6 in HPV-11) oz. vrsto 1 (skupaj s HPV-42) rodu *Alphapapillomavirus* (Pfister in sod., 1983; Beaudenon in sod., 1987).

2.3.1.2 Maligne spremembe sluznice, povezane z okužbo s HPV

Visoko rizični genotipi HPV, ki jih povezujemo z nastankom malignih sprememb sluznice, se uvrščajo v vrsti 7 in 9 virusnega rodu *Alphapapillomavirus* (preglednica 2).

2.3.1.2.1 Rak materničnega vratu

Najpogostejšo maligno spremembo, povzročeno s HPV, predstavlja rak materničnega vratu (RMV) ki je za rakom dojk drugi najpogostejši rak pri ženskah in letno na novo prizadene okoli pol milijona žensk po svetu. Da je okužba s HPV nujen dejavnik za razvoj RMV, potrjuje dejstvo, da DNA HPV najdemo pri več kot 99 % vseh primerov RMV (Walboomers in sod., 1999; Clifford in sod., 2003).

Za nastanek RMV je ključna dolgotrajna oz. perzistentna okužba z visoko rizičnimi genotipi HPV, ki se kaže kot napredovanje predrakavih sprememb materničnega vratu oz. napredovanje cervikalne intraepitelijske neoplazije od CIN 1 do CIN 3 (angl. *cervical intraepithelial neoplasia*, CIN 1-3). Do razvoja predrakavih sprememb in RMV najpogosteje prihaja znotraj t.i. transformacijske cone, na prehodu iz večskladnega ploščatoceličnega epitela v enoskladni žlezni epitel.

Poleg dolgotrajne perzistentne okužbe z visoko rizičnimi HPV, ki je nujen pogoj za razvoj RMV, so dodatni rizični dejavniki še: večje število spolnih partnerjev, nižja starost pri prvem spolnem odnosu, večje število porodov in splavov, okužbe z drugimi spolno prenosljivimi mikroorganizmi, kajenje in dodatne karcinogene snovi, kot so UV-žarki, obsevanje in različni kemični dejavniki (Syrjänen, 2000; zur Hausen, 2009).

Za razliko od starejše klasifikacije, pri kateri smo za visoko rizične šteli 14 genotipov HPV, glede na smernice Svetovne zdravstvene organizacije (Working Group of the WHO International Agency for Research on Cancer IARC, update 2009) sedaj za nedvoumno visoko rizične štejemo 8 genotipov HPV (preglednica 2) (Bouvard in sod., 2009), za ostale genotipe pa se je pokazalo, da manj prispevajo k razvoju malignih sluzničnih sprememb ali pa je njihov prispevek negotov. Glede na nove smernice je genotip HPV-16 edinstven in najpomembnejši karcinogen med HPV. Sledi mu HPV-18, ki je drugi najpomembnejši karcinogen, posebej kar se tiče adenokarcinoma. Preostali genotipi, ki dopolnjujejo osmerico najpomembnejših visoko rizičnih genotipov pri RMV, pa so HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-52 in HPV-58.

Genotipi HPV-39, HPV-51, HPV-56 in HPV-59 etiološko manj prispevajo k razvoju malignih sluzničnih sprememb, medtem ko ostaja vloga HPV-68 in HPV-73 nejasna. Taka

sta tudi potencialno visoko rizična genotipa HPV-53 in HPV-66, ki sta pogosto prisotna pri spremembah materničnega vratu nižje stopnje, zaradi česar se njuno vključevanje v molekularne teste za dokazovanje visoko rizičnih genotipov odsvetuje, saj testom znižujeta specifičnost in napovedno vrednost.

2.3.1.2.2 Preostali raki anogenitalne sluznice

Okužbo z visoko rizičnimi HPV lahko dokažemo pri okoli 40-60 % rakov penisa, vagine in vulve ter 90 % rakov anusa (Daling in sod., 2004; Parkin in Bray, 2006; Sutton in sod., 2008; Madsen in sod., 2008; Insinga in sod., 2008; De Vuyst in sod., 2009).

Tako kot pri RMV tudi pri ostalih rakih anogenitalne sluznice najpogosteje prihaja do maligne transformacije zaradi dolgotrajne okužbe z visoko rizičnimi genotipi HPV v t.i. transformacijski coni.

2.3.1.2.3 Maligne spremembe ustnega dela žrela, povezane z okužbo s HPV

Visoko rizične genotipe HPV, od katerih je daleč najpogostejši genotip HPV-16, lahko najdemo pri približno 25 % vseh malignih sprememb ustnega dela žrela, praviloma pri mlajših bolnikih brez klasičnih rizičnih dejavnikov, kot sta dolgotrajno kajenje in prekomerno uživanje alkohola (Fakhry and Gillison, 2006). Dokazovanje prisotnosti visoko rizičnih HPV v malignih spremembah ustnega dela žrela je pomembno, saj naj bi bil pri HPV pozitivnih bolnikih izid zdravljenja boljši kot pri HPV negativnih bolnikih.

2.3.2 Kožne spremembe, povezane z okužbo s HPV

Kožne spremembe, ki jih povzroča HPV, povezujemo s tako imenovanimi kožnimi ali kutanimi (angl. *cutaneous HPV*) genotipi, ki se uvrščajo v vseh pet rodov HPV (preglednica 2).

Genotipi HPV iz vrst 2 in 4 rodu *Alphapapillomavirus* okužijo poroženjavajoči večskladni ploščatocelični epitel kože in povzročajo različne benigne spremembe (npr. navadne kožne bradavice, *verrucae vulgaris*) (Jabłońska in sod., 1985, 1997).

Genotipe HPV iz rodu *Betapapillomavirus* lahko najdemo tako v benignih kot malignih spremembah kože, medtem ko genotipi iz virusnih rodov *Gamma-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus* povzročajo različne, predvsem benigne spremembe kože (de Villiers in sod., 2004) (preglednica 2).

2.3.2.1 Benigne kožne spremembe, povezane z okužbo s HPV

Tako imenovani kožni genotipi HPV lahko povzročajo navadne (angl. *common warts*), plantarne (angl. *plantar warts*), ploščate (angl. *flat warts*) in obnohtne (angl. *periungual warts*) bradavice, ki so benigne, vendar so lahko za bolnike zelo moteče. Čeprav gre za pogoste in razširjene spremembe, za različne benigne kožne lezije, nimamo tako dobrih epidemioloških podatkov glede genotipov, ki jih povzročajo, kot jih imamo za sluznične spremembe. Najpogostejši genotipi, povezani z navadnimi kožnimi bradavicami pri imunokompetentnih osebah, naj bi bili HPV-1, HPV-2, HPV-27 in HPV-57 (Schmitt in sod., 2011), medtem ko naj bi bili z nastankom ploščatih bradavic povezani predvsem genotipi vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus*, kot sta HPV-3 in HPV-10 (Jabłońska in sod., 1985).

Benigne kožne spremembe so problematične predvsem pri bolnikih s pridobljeno ali prirojeno imunsko pomanjkljivostjo, kot so npr. bolniki po presaditvi organov ali bolniki z dedno boleznijo *Epidermodysplasia verruciformis*, saj so pri njih bradavice lahko perzistentne in se pojavljajo v večjem številu, dolgotrajna okužba pa pri takih bolnikih lahko vodi tudi v maligno transformacijo.

2.3.2.2 Maligne kožne spremembe, povezane z okužbo s HPV

Maligne kožne spremembe so bile prve maligne spremembe, ki so jih že leta 1966 povezali z okužbo s HPV, in sicer pri bolnikih z dedno boleznijo *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) (Jabłońska in sod., 1966). Za EV je značilen pojav velikega števila perzistentnih kožnih in sluzničnih lezij kot posledica okužbe s HPV in imunske pomanjkljivosti gostitelja. Med t.i. EV genotipe uvrščamo genotipe iz rodu *Betapapillomavirus*, ki so naravno prisotni pri imunokompetentnih osebah, kjer ne povzročajo kliničnih sprememb, medtem ko pri imunokompromitiranih bolnikih, kot so bolniki z EV, bolniki po presaditvi organov, bolniki s HIV, bolniki z WHIM (angl. *wart-hypogammaglobulinemia-infection-myelokathexis*, WHIM) sindromom itd., kronične okužbe s temi genotipi vodijo v nastanek nemelanomskega raka kože (angl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC) (Nindl in sod., 2007; Lazarczyk in sod., 2009).

Glede na vrsto transformiranih celic pri NMSC ločimo ploščatocelični rak kože (angl. *squamous cell carcinoma*, SCC) ter bazalnocelični rak kože (angl. *basal cell carcinoma*, BCC).

Mehanizem nastanka maligne transformacije kože se bistveno razlikuje od mehanizma nastanka maligne transformacije sluznice, kar ni presenetljivo, glede na to, da spadajo povzročitelji v povsem drug virusni rod kot povzročitelji malignih sluzničnih sprememb.

HPV iz rodu *Betapapillomavirus* naj bi bili vpleteni predvsem v začetne faze maligne transformacije, pri čemer ne pride do integracije, tipične za t.i. visoko rizične HPV. V začetni fazi maligne transformacije naj bi tako HPV iz rodu *Betapapillomavirus* s svojimi onkobeljakovinami E6 in E7 zavirali celične mehanizme, ki omogočajo popravljanje poškodb DNA, povzročenih z UV-svetlobo, kar vodi v nastanek aktinične keratoze in sčasoma do razvoja NMSC (Nindl in sod., 2007; Bouwes Bavinck in sod., 2010; Viariso in sod., 2011).

Za razliko od visoko rizičnih HPV prisotnost HPV iz rodu *Betapapillomavirus* ni nujno potrebna za vzdrževanje nastalih malignih celic kože. Kot posledica je za maligne spremembe kože značilno, da so HPV prisotni v bistveno manjših koncentracijah kot pri predrakavih spremembah kože, npr. v aktinični keratozi, kar se bistveno razlikuje od stanja pri raku materničnega vratu (Berkhout in sod., 2000; Orth, 2005; Purdie in sod., 2005; Weissenborn in sod., 2005; Vasiljević in sod., 2007).

2.3.3 Subklinične okužbe s HPV in komenzalizem

V zadnjem desetletju je več preiskav pokazalo, da nekaterih od novih genotipov ni mogoče povezati z nobeno klinično manifestacijo (Antonsson in sod., 2000, 2003a), da so HPV pri človeku prisotni od rane mladosti (Antonsson in sod., 2003b; Castellsague in sod., 2009) in da je sočasna okužba z več genotipi zelo pogosta (Potočnik in sod., 2006; Hazard in sod., 2007; Plasmeyer in sod., 2010), kar nakazuje, da nekateri genotipi HPV tvorijo del normalne virusne 'flore' pri človeku.

Naravna virusna 'flora' oz. t.i. potniški (angl. *passenger*) ali komenzalni genotipi HPV lahko predstavljajo problem, saj njihova naključna prisotnost otežuje povezovanje novih genotipov HPV s kliničnimi lezijami (Antonsson in sod., 2000; Orth, 2005).

Enega najbolj poznanih rezervoarjev HPV pri človeku predstavljajo dlačni mešički, v katerih so lahko trajno oz. perzistentno prisotni tako komenzalni kot patogeni genotipi HPV (Boxman in sod., 1997; Kocjan in sod., 2005; Potočnik in sod., 2006; Poljak in sod., 2009). Iz omenjenih razlogov je pri opredeljevanju kliničnega pomena novih genotipov potrebno upoštevati tudi vzorce brez kliničnih sprememb.

2.4 OPREDELJEVANJE NOVIH VIRUSOV PAPILOMA

HPV je zaradi bioloških posebnosti (virus se produktivno razmnožuje le v diferenciranih epitelih celicah) mogoče gojiti le v posebnih celičnih kulturah (angl. *organotypic raft culture*). Zaradi tega so celotna genomska zaporedja novih genotipov PV tradicionalno pridobivali direktno iz epiteljskih lezij z uporabo direktnega kloniranja, kar je bilo mogoče le pri tistih genotipih, ki so bili v kliničnih vzorcih prisotni v visokem številu kopij (de Villiers in sod., 2004).

Kloni celotnega genoma novih genotipov PV dodatno predstavljajo preprost način trajnega shranjevanja referenčnega nukleotidnega zaporedja, tako da pridobitev t.i. referenčnega klona ostaja nujen pogoj za uraden sprejem vsakega novega genotipa PV (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010).

Sočasno s hitrim razvojem na področju molekularnih metod so se pri opredeljevanju novih genotipov postopoma uveljavile tudi novejšje metode, kot so verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), metoda krožnega pomnoževanja (angl. *rolling-circle amplification*, RCA; *whole genome amplification*, WGA) in celo t.i. hitri postopek določanja nukleotidnega zaporedja (angl. *shot-gun sequencing*) (Li in sod., 2009). Ravno te novejšje tehnologije so omogočile identifikacijo in karakterizacijo mnogih izmed novoodkritih PV, posebej tistih, ki so v kliničnih vzorcih prisotni v zelo majhnih količinah.

Kljub velikemu tehnološkemu napredku na področju metodologije, opredeljevanje novih genotipov HPV pogosto ostaja težavno predvsem zaradi pogoste sočasne prisotnosti različnih genotipov HPV v izolatih iz kliničnih sprememb, majhnega števila kopij virusa v določenih kužninah (npr. dlačni mešički) in ne nazadnje tudi zaradi prisotnosti drugih, še neopredeljenih genotipov HPV z neznanim kliničnim pomenom.

2.4.1 Direktno kloniranje

Direktno kloniranje je ena prvih metod, ki se je uporabljala tako za določanje nukleotidnega zaporedja kot tudi za shranjevanje novih genotipov HPV. Izvedba direktnega kloniranja je mogoča le, če je v klinični leziji prisotna zadostna količina virusa (slika 9). Pri tej metodi je najprej potrebna izolacija celotne DNA iz klinične lezije, ki ji sledi iskanje restrikcijskih nukleaz, ki krožni virusni genom cepijo na enega ali manjše število fragmentov. Pripravi fragmentov sledi vključitev (ligacija) le-teh v plazmide ter kloniranje v bakterije, kar omogoča pridobitev večje količine kloniranih fragmentov in določanje njihovega nukleotidnega zaporedja.

Z direktnim kloniranjem brez predhodne uporabe PCR so se raziskovalci v osemdesetih letih prejšnjega stoletja poskušali izogniti napakam, ki bi jih v nukleotidno zaporedje lahko vnesle prve, še ne natančne, polimeraze (Stewart in sod., 1995). Zaradi napak, ki bi jih v nukleotidno zaporedje lahko vnesla PCR, so leta 2004 predlagali poimenovanje novih genotipov, opredeljenih na ta način, kot 'kandidatne' genotipe HPV (angl. *candidate HPV*, *candHPV*) (de Villiers in sod., 2004), vendar pa zaradi izjemne natančnosti novodobnih polimeraz v najnovejši klasifikaciji PV odpravljajo tako poimenovanje (Bernard in sod., 2010).

Čeprav je direktno kloniranje včasih bilo zlati standard, lahko pri restrikciji celotnega genoma pride do izgube krajših odsekov genoma iz referenčnih klonov, kar ima za posledico obstoj nekaterih napak v referenčnih zaporedjih prvih genotipov HPV (Meissner, 1995; Kocjan in sod., 2009a).

2.4.2 Kloniranje s pomočjo pomnoževanja s polimerazo

Kloniranje s pomočjo predhodnega PCR je omogočilo opredelitev novih genotipov HPV, ki v kliničnih spremembah niso prisotni v veliki količini (slika 9). Da bi zagotovili vključitev celotnega genoma v referenčne klone, sta se pri kloniranju s pomočjo PCR uveljavili metodi t.i. reverznega PCR (angl. *reverse PCR*) in prekrivajočih se pridelkov PCR (angl. *overlapping PCR*).

Pri metodi reverznega PCR na podlagi krajšega poznane nukleotidnega zaporedja novega genotipa pripravimo tipsko specifične oligonukleotidne začetnike, ki krožni genom HPV pomnožujejo v nasprotni smeri. S tem zagotovimo, da smo s PCR pomnožili celotni genom, ki mu lahko nato določimo nukleotidno zaporedje in ga vključimo v referenčne klone.

Metoda prekrivajočih se pridelkov PCR je po svoje nadgradnja metode reverznega PCR in temelji na pripravi dveh ali več pridelkov PCR, katerih konci se prekrivajo, kar zagotavlja vključitev celotnega genoma v referenčne klone (Forslund in Hansson, 1996).

Tako pri metodi reverznega PCR kot pri metodi prekrivajočih se pridelkov PCR gre za pomnoževanje relativno dolgih pridelkov PCR (od 4000-8000 bp). To zahteva uporabo t.i. *long-range* polimeraz, ki so na srečo dostopne tudi v komercialnih kompletih kemikalij. Poleg specifičnih pogojev pomnoževanja, ki ga take polimeraze zahtevajo, je za pridobitev tako dolgih pridelkov PCR nujna zadostna količina izhodiščne DNA. Ta količina je sicer bistveno manjša, kot je potrebno za direktno kloniranje, vendar pa v določenih kliničnih

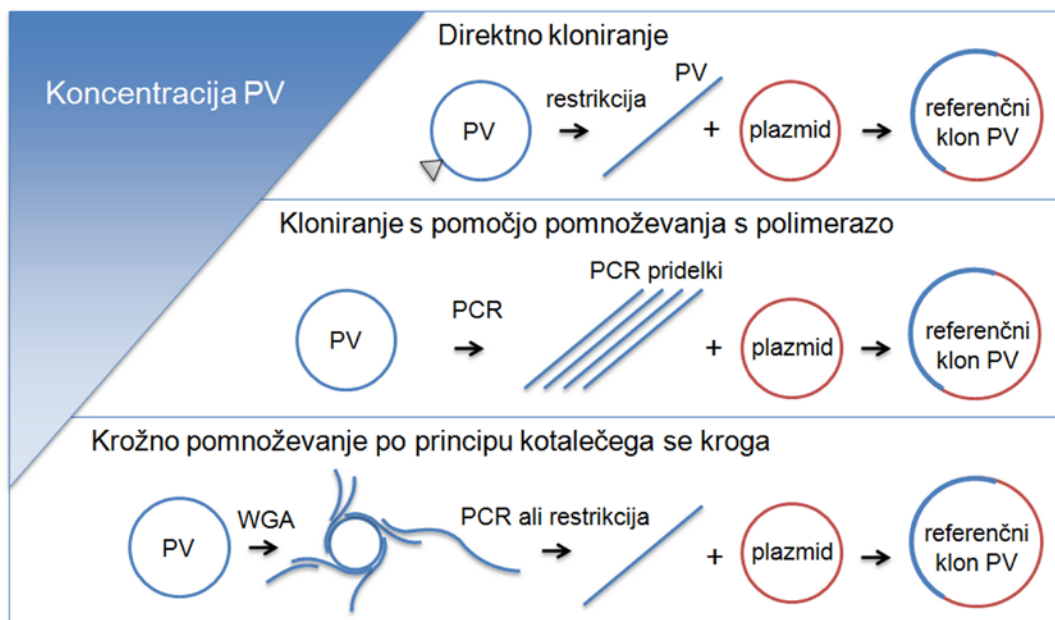
vzorcih kljub temu pogosto ne zadostuje, posebej kadar gre za nove genotipe iz rodov *Betapapillomavirus* in *Gammapapillomavirus*.

2.4.3 Krožno pomnoževanje celotnega genoma po principu kotalečega se kroga

Izotermalno krožno pomnoževanje po principu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle amplification*, RCA), poimenovano tudi pomnoževanje celotnega genoma (angl. *whole genome amplification*, WGA), temelji na pomnoževanju vseh krožnih molekul DNA s pomočjo bakteriofagne polimeraze (Rector in sod., 2004). Tovrstno pomnoževanje ni odvisno od nukleotidnega zaporedja krožne DNA molekule, zato je zelo uporabno, kadar želimo pomnožiti izjemno majhno količino neznane DNA (slika 9).

Pridelki izotermalne RCA oz. WGA reakcije so konkatemerne ponovitve krožnega genoma v količini, ki omogoča direktno določanje nukleotidnega zaporedja, nadaljnje pomnoževanje s PCR, analizo s pomočjo restrikcijskih endonukleaz ter 'direktno' kloniranje.

Ravno uporaba RCA oz. WGA reakcije je v zadnjem času omogočila opredelitev velikega števila novih genotipov, predvsem tistih iz virusnih rodov (*Betapapillomavirus* in *Gammapapillomavirus*), ki so v kliničnih spremembah prisotni v zelo nizkih koncentracijah ali pa so prisotni kot komenzali (Köhler in sod., 2011).



Slika 9: Shematski prikaz molekularnih metod v uporabi pri opredeljevanju novih virusov papiloma
Figure 9: Molecular methods used in the characterization of novel papillomaviruses.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZVOR IZHODIŠČNIH KANDIDATNIH IZOLATOV IN OBRAZLOŽITEV IZBIRE KANDIDATNIH IZOLATOV SIBX1, SIBX2 IN SIBX9

V predlog teme za doktorsko raziskovalno nalogo je bilo začetno vključenih devet slovenskih izolatov HPV (SIBX1-9), ki so bili v predhodnih raziskavah (Kocjan in sod., 2004, 2005; Potočnik in sod., 2006) na podlagi določanja krajših (145-474 bp) nukleotidnih zaporedij identificirani kot potencialni kandidati za nove genotipe HPV (preglednica 3).

Medtem ko je potekalo raziskovalno delo, so druge raziskovalne skupine izolate SIBX3, SIBX4, SIBX6 in SIBX7 opredelile kot genotipe HPV-120 (Bernard in sod., 2010), HPV-105 (de Villiers in Gunst, 2009), HPV-99 (de Villiers in Gunst, 2009) in HPV-100 (de Villiers in Gunst, 2009).

Preglednica 3: Osnovne značilnosti izhodiščnih kandidatnih izolatov za nove genotipe HPV

Table 3: Properties of the original candidate isolates of novel HPV genotypes.

Ime izolata	GenBank ID	Lokacija (gen) in dolžina (bp) nuk. zaporedja	Vir izolata	Genotip HPV	Referenca	Prisotnost zadostne količine tarčne virusne DNA v vzorcu
SIBX1	AJ606880	L1, 373 bp	Dlačni mešiček			Da
SIBX2	AJ606879	L1, 367 bp	Dlačni mešiček			Da
SIBX3	AJ606878	L1, 370 bp	Dlačni mešiček	HPV-120	Bernard in sod., 2010.	Da
SIBX4	AJ606876	E1, 145 bp	Dlačni mešiček	HPV-105	de Villiers in Gunst, 2009.	Da
SIBX5	AJ606877	E1, 145 bp	Dlačni mešiček			Ne
SIBX6	AJ619985	E1, 145 bp	Dlačni mešiček	HPV-99	de Villiers in Gunst, 2009.	Ne
SIBX7	AJ646893	L1, 373 bp	Dlačni mešiček	HPV-100	de Villiers in Gunst, 2009.	Da
SIBX8	AJ646892	L1, 371 bp	Dlačni mešiček			Ne
SIBX9	AJ810860	L1, 474 bp	Kožna bradavica			Da

bp - bazni pari, ID – identifikacijska oznaka. Osenčeni izolati so bili izbrani za nadaljnje delo.

bp - base pairs, ID – identifier. The shaded isolates were chosen for further characterization.

Za izolata SIBX5 in SIBX8, ki sta bila pridobljena iz dlačnih mešičkov leta 2003/04, na žalost kakovost in količina prisotne DNA nista omogočali nadaljnjega dela, saj celo z nespecifičnim izotermalnim pomnoževanjem nismo uspeli pomnožiti virusne DNA. Zato smo se v doktorski nalogi osredotočili na preostale tri slovenske potencialne kandidatne izolate SIBX1, SIBX2 in SIBX9 (preglednica 3).

3.1.1. Kandidatni izolat SIBX9 (HPV-125)

Kandidatni izolat SIBX9 je bil izoliran iz kožne bradavice, ki je bila odvzeta z roke 19-letnega imunokompetentnega bolnika na Dermatovenerološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Skupna DNA je bila iz originalnega vzorca izolirana s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Originalno, 474 bp dolgo nukleotidno zaporedje je bilo pridobljeno z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) z oligonukleotidnimi začetniki HVP2 (5'-TCNMGNGGNCANCCNYTNGG-3') (Shamanin in sod., 1994b) ter B5 (5'-AYNCCRTTTRTTGTGNCCTG-3') (Shamanin in sod., 1994a) in kompletom kemikalij FastStart Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). Nukleotidno zaporedje odseka izolata SIBX9 je bilo določeno s pomočjo naprave ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija) in avgusta 2004 deponirano v GenBank pod identifikacijsko oznako AJ810860 (Kocjan in sod., 2004).

Poleg novega genotipa HPV-125 sta bila v izolatu prisotna še dva genotipa HPV, HPV-8 in HPV-22, ki sta bila identificirana s pomočjo PCR ter z določanjem nukleotidnega zaporedja, z začetnimi oligonukleotidi Ma/Ha (Boxman in sod., 1997) ter CPI/CPIIs (Tieben in sod., 1993).

3.1.2. Kandidatni izolat SIBX1 (HPV-150)

Kandidatni izolat SIBX1 je bil pridobljen iz dlačnega mešička obrvi 28-letnega imunokompetentnega bolnika v sklopu preiskave, ki je proučevala porazdelitev HPV v obrvah pri bolnikih z genitalnimi bradavicami (Kocjan in sod., 2005).

Skupna DNA je bila iz originalnega vzorca izolirana s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij High Pure PCR Template Preparation kit po navodilih proizvajalca.

Originalno, 373 bp dolgo nukleotidno zaporedje je bilo pridobljeno s PCR s setom oligonukleotidnih začetnikov Ma/Ha (Boxman in sod., 1997) in kompletom kemikalij FastStart Taq DNA polymerase. Delno nukleotidno zaporedje izolata SIBX1 je bilo določeno s pomočjo naprave ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System in marca 2005 deponirano v GenBank pod identifikacijsko oznako AJ606879 (Kocjan in sod., 2005).

3.1.3. Kandidatni izolat SIBX2 (HPV-151)

Kandidatni izolat SIBX2 je bil pridobljen iz dlačnega mešička obrvi 25-letnega imunokompetentnega bolnika v sklopu preiskave, ki je proučevala porazdelitev HPV v obrveh pri bolnikih z genitalnimi bradavicami (Kocjan in sod., 2005), vendar kvaliteta DNA v originalnem izolatu ni dopuščala nadaljnje analize, zato smo za kloniranje uporabili izolat pridobljen leta 2003 iz dlačnega mešička, odvzetega s skrotuma 23-letnega moškega (Potočnik in sod., 2006).

Skupna DNA je bila iz originalnega vzorca izolirana s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij High Pure PCR Template Preparation kit po navodilih proizvajalca.

Originalno, 367 bp dolgo nukleotidno zaporedje je bilo pridobljeno s PCR s setom oligonukleotidnih začetnikov Ma/Ha (Boxman in sod., 1997) in kompletom kemikalij FastStart Taq DNA polymerase. Nukleotidno zaporedje odseka izolata SIBX2 je bilo določeno s pomočjo naprave ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System in marca 2005 deponirano v GenBank pod identifikacijsko oznako AJ606880 (Kocjan in sod., 2005).

3.2 POMNOŽEVANJE CELOTNEGA GENOMA NOVIH GENOTIPOV

3.2.1 Izotermalno pomnoževanje izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov

Pomnoževanje daljših odsekov (>1000 bp) DNA s PCR zahteva bistveno višje koncentracije DNA kot PCR pomnoževanje fragmentov velikosti <1000 bp.

Izjemno majhna količina virusne DNA v izolatih SIBX1 in SIBX2, pridobljenih iz dlačnih mešičkov, ni omogočala pomnoževanja celotnega genoma (7000-8000 bp). Zato smo koncentracijo DNA v vzorcu povišali z metodo izotermalnega pomnoževanja po principu kotalečega se kroga oz. metodo krožnega pomnoževanja celotnega genoma (RCA oz. WGA).

WGA smo izvedli s pomočjo kompleta kemikalij Illustra™ TempliPhi 100 Amplification (GE Healthcare, Amersham, Velika Britanija) po navodilih proizvajalca.

Ker gre za forenzično metodo, kjer je za nastanek ustreznih pridelkov ključna nepoškodovana, krožna tarčna DNA, smo vsak vzorec testirali desetkrat sočasno z majhno količino izolata (cca. 0,1-0,5 µl) v vsaki od ponovitev.

Reakcijo smo izvedli tako, da smo 0,1-0,5 µl vzorca dodali 5µl Sample Buffer in mešanico denaturirali 3 min pri 95 °C, nato pa jo ohladili na hladnem bloku. Mešanici smo nato dodali 5µl Reaction Buffer, 0,2 µl Enzyme Mix in 1 µl dNTP (10 mM). Končno reakcijsko mešanico smo inkubirali 4-16 ur pri 30 °C. Po končani inkubaciji smo reakcijo ustavili z inkubacijo 10 min pri 65 °C.

Ker gre za reakcijo, ki je izjemno občutljiva na kontaminacijo iz okolice (omogoča pomnoževanje iz pg začetne DNA) in ki obenem proizvede veliko količino DNA (1-1,5 µg), je pri izvedbi izredno važno upoštevati vse varnostne ukrepe za preprečevanje kontaminacije, posebej t.i. kratko centrifugiranje oz. 'spin down' pred vsakim odpiranjem posodice, v kateri je tekla reakcija.

Po izotermalnem pomnoževanju in pred nadaljnjim pomnoževanjem s PCR smo pridelke WGA redčili 200-krat z destilirano vodo.

3.2.2 Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov

Uspešnost WGA pomnoževanja smo preverjali s pomočjo kratkega PCR-ja z začetnimi oligonukleotidi, pripravljenimi na podlagi že znanega krajšega zaporedja DNA kandidatnih izolatov.

3.2.2.1 Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolata SIBX1

Uspešnost WGA pomnoževanja SIBX1 smo preverjali s PCR pomnoževanjem s pomočjo kompleta kemikalij FastStart High Fidelity (Roche Applied Science) na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 1 pmol oligonukleotidnih začetnikov X1-1f in X1-1r (preglednica 4); 200 µM dNTP; 2,5 µl 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with MgCl₂; 1,25 U FastStart High Fidelity Enzyme; 5 µl redčenega pridelka WGA in vodo do končnega volumna 25 µl.

Inkubaciji 2 min pri 95 °C je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 30 s pri 95 °C, 30 s pri 56 °C in 1 min pri 72 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 7 min pri 72 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Prisotnost SIBX1 specifičnih pridelkov smo dokazovali z gelsko elektroforezo na komercialno pripravljenih gelih za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific, Cham, Švica) na napravi SEA 2000 ® (Elchrom Scientific) pri sobni temperaturi, 20 minut pod napetostjo 120 V. Za gelsko elektroforezo smo uporabljali pufer, pripravljen iz 1950 ml dvojno destilirane vode in 50 ml 40x pufra TAE (Elchrom Scientific) in 100 ul etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics, Ghent, Belgija), kot velikostni standard (angl. *size marker*) pa smo uporabili DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche Applied Science).

Po končani elektroforezi smo gele pregledali pod UV-svetlobo in jih fotografirali z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael).

3.2.2.2 Preverjanje uspešnosti izotermalnega pomnoževanja izolata SIBX2

Uspešnost WGA pomnoževanja SIBX2 smo preverjali s PCR s pomočjo kompleta kemikalij FastStart High Fidelity na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System 2700.

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 1 pmol oligonukleotidnih začetnikov X2-1f in X2-1r (preglednica 5); 200 µM dNTP; 2,5 µl 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with MgCl₂; 1,25 U FastStart High Fidelity Enzyme; 5 µl redčenega pridelka WGA in vodo do končnega volumna 25 µl.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 10 min pri 95 °C. Sledilo je 40 ciklov pomnoževanja; 15 s pri 95 °C, 15 s pri 55 °C in 1 min pri 72 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 5 min pri 72 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Prisotnost SIBX2 specifičnih pridelkov smo preverjali s pomočjo gelske elektroforeze, kot je opisano v poglavju 3.2.2.1.

3.2.3 Pomnoževanje celotnega genoma HPV-125

Začetne oligonukleotide za pomnoževanje dolgih tarčnih zaporedij (angl. *long-template PCR*) smo pripravili ročno na podlagi že znanega, 474 bp dolgega zaporedja SIBX9.

7700 bp velik pridelek PCR smo pridobili iz originalnega izolata s pomočjo kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System (Roche Applied Biosystems) na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor (Applied Biosystems).

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 3 pmol oligonukleotidnih začetnikov 125-fpw2 in 125-rpw2 (preglednica 6); 500 μ M dNTP; 2,5 μ l 10x Expand Long Template buffer s 27,5 mM $MgCl_2$; 0,75 U Expand Long Template Enzyme Mix; 7,1 μ l originalnega izolata in vodo do končnega volumna 25 μ l.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 58 °C in 9 min (z dodatkom 20 s/cikel) pri 68 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 10 min pri 68 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

3.2.4 Pomnoževanje celotnega genoma HPV-150

Začetne oligonukleotide za pomnoževanje dolgih tarčnih zaporedij smo pripravili ročno na podlagi že znanega, 373 bp dolgega zaporedja SIBX1.

7367 bp velik pridelek PCR smo pridobili iz originalnega izolata s pomočjo kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor.

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 3 pmol oligonukleotidnih začetnikov X1-longF in X1-longR (preglednica 4); 500 μ M dNTP; 2,5 μ l 10x Expand Long Template buffer s 27,5 mM $MgCl_2$; 0,75 U Expand Long Template Enzyme Mix; 5 μ l redčenega pridelka WGA in vodo do končnega volumna 25 μ l.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 53 °C in 8 (z dodatkom 20 s/cikel) min pri 68 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 10 min pri 68 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

3.2.5 Pomnoževanje celotnega genoma HPV-151

Za razliko od HPV-125 in HPV-150 pri HPV-151 na podlagi že znanega, 367 bp dolgega zaporedja SIBX2 nismo mogli pripraviti ustreznih oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje preostanka genoma HPV-151. Da bi premostili zaplet, smo za pomnoževanje HPV-151 pripravili dodatne degenerirane začetne oligonukleotide, in sicer

na podlagi poravnave nukleotidnih zaporedij najbolj sorodnih genotipov. Ustreznost le-teh smo testirali tako, da smo s pari pripravljenih degeneriranih začetnih oligonukleotidov izvedli kratek PCR, pri čemer smo uporabili komplet kemikalij DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x) (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, Vilna, Litva) po navodilih proizvajalca.

Uspešnost kratkega PCR smo preverjali na gelu in tako identificirali več parov oligonukleotidnih začetnikov, na podlagi katerih so nastali pridelki pričakovane velikosti (med 100 in 1,328 bp, glede na lokacijo začetnih oligonukleotidov). Po določanju nukleotidnega zaporedja tem krajšim pridelkom smo na podlagi novo pridobljenih zaporedij pripravili dodatne začetne oligonukleotide, specifične za HPV-151.

Začetna oligonukleotida X2-L1For in X2-longR2 (preglednica 5), uporabljena za pomnoževanje 6256 bp fragmenta HPV-151, smo pripravili na podlagi nukleotidnega zaporedja, pridobljenega z uporabo oligonukleotidnih začetnikov HPV22-L1f1mix in HPV22-L1r1mix (preglednica 5). 6256 bp velik PCR pridelek HPV-151 smo nato iz originalnega izolata pridobili z uporabo kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System, na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cycler.

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 3 pmol oligonukleotidnih začetnikov X2-L1For in X2-longR2 (preglednica 5); 500 µM dNTP; 2,5 µl 10x Expand Long Template buffer s 27,5 mM MgCl₂; 0,75 U Expand Long Template Enzyme Mix; 5 µl redčenega pridelka WGA in vodo do končnega volumna 25 µl.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 55 °C in 7 min (z dodatkom 20 s/cikel) pri 68 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 7 min pri 68 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

3.2.6 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja dolgih pridelkov PCR

Prisotnost specifičnih pridelkov PCR smo preverjali s pomočjo gelske elektroforeze, kot je opisano v poglavju 3.2.2.1, z razliko, da smo uporabili 1 % agarozni gel, ki omogoča ločevanje večjih fragmentov DNA. 1 % agarozni gel smo pripravili iz 0,5 g agaroze Agarose for routine use (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), 50 ml 50x TAE pufra in 5 µl etidijevega bromida. Velikost specifičnih pridelkov PCR smo določali z velikostnim standardom High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija). Po končani elektroforezi smo gele pregledali pod UV-svetlobo in jih fotografirali z napravo BIS 303 PC.

3.3 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA NOVIM GENOTIPOM

Določanje nukleotidnega zaporedja referenčnih klonov smo izvedli z metodo sprehajanja začetnih oligonukleotidov (angl. *primer-walking*) z ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki (za vsak genotip in klon) s pomočjo naprave ABI Prism®310 Genetic Analyzer System in kompleta kemikalij Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). 'Primer-walking' poteka tako, da na podlagi že znanih nukleotidnih zaporedij pripravimo oligonukleotidne začetnike za naslednji del zaporedja in tako v manjših korakih določimo celotno nukleotidno zaporedje genoma. Ker smo se želeli izogniti morebitnim napakam v zaporedju, nastalim zaradi same PCR reakcije, smo genomu določali nukleotidno zaporedje v obeh smereh, tako da smo vsakemu odseku določili nukleotidno zaporedje z uporabo dveh različnih oligonukleotidov.

3.3.1 Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-125

Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-125 smo izvedli z 38 oligonukleotidnimi začetniki (preglednica 6) s pomočjo naprave ABI Prism®310 Genetic Analyzer System in kompleta kemikalij Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit. Celotno genomsko zaporedje HPV-125 smo deponirali v GenBank skozi EMBL septembra 2009 in je dostopno pod identifikacijsko oznako FN547152.

3.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-150

Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-150 smo izvedli z 20 oligonukleotidnimi začetniki (preglednica 4) s pomočjo naprave ABI Prism®310 Genetic Analyzer System in kompleta kemikalij Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit. Celotno genomsko zaporedje HPV-150 smo deponirali v GenBank skozi EMBL marca 2010 in je dostopno pod identifikacijsko oznako FN677755.

3.3.3 Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-151

Določanje nukleotidnega zaporedja HPV-151 smo izvedli z 20 oligonukleotidnimi začetniki (preglednica 5) s pomočjo naprave ABI Prism®310 Genetic Analyzer System in kompleta kemikalij Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit. Celotno genomsko zaporedje HPV-151 smo deponirali v GenBank skozi EMBL marca 2010 in je dostopno pod identifikacijsko oznako FN677756.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-150

Table 4: Primers used for PCR amplification and sequencing of the complete genome of HPV-150.

Ime	Zaporedje (5' - 3')	Genomska lokacija (bp)	Usmeritev primerja
X1-longF	CTCTCCAGATAATCCAATTAGCGAC	7097-7121	cw
X1-longR	GGCTCCAAAGGTACAATACATAGTTG	7002-7027	ccw
X1-F5	CAGACAGAAATGATTGGGAAAGAAG	749-773	cw
X1-R5	CGTGATGGTTTTTGAAGGAATAAG	5100-5123	ccw
X1-F18	CAACACCTCCCAGGCGAAC	4985-5003	cw
X1-R18	ACAGCAACAGATTCTCCAAACAAC	990-1013	ccw
X1fw.2	CGAATGTTGACGAAGGAG	1453-1470	cw
X1rev.2	TCTGGTCAGCAATTGTTG	4376-4393	ccw
X1fw.3	AATATGTGAGATTCCAAG	2245-2262	cw
X1rev.3	TGCAGGAGCTCCTGATAC	3604-3621	ccw
X1fw.4	TAAAGATGAACCTTGGAC	3066-3083	cw
X1rev.4	TTCTTGGTCACTTAGGTC	2775-2792	ccw
X1fw.5	CCGACCAAGCCACTGCAC	3674-3691	cw
X1rev.5	ATCCATTTGGACATACTC	2174-2191	ccw
X1fw.6	GAAC TAAGCGTGATTCTG	4286-4303	cw
X1rev.6	ATATTTCTTACAAAGTTC	1584-1601	ccw
X1fw.7	GCAGATCAAGTGGTAGTG	4870-4887	cw
X1rev.7	GAATTCCCAATCGAGAAG	972-989	ccw
X1-F3	GCTACCAGATGTCCAGACAAAGTAACAC	7146-7173	cw
X1-R3	CATTCTCTAACAGCCCATAACCAAC	6137-6161	ccw
X1-F1	TTGTTGGGGTAATCAAATCTTTT	6839-6861	cw
X1-R1	GGGATCTGATTTTTCCTTGG	7173-7193	ccw
X1-F5	CAGACAGAAATGATTGGGAAAGAAG	749-773	cw
X1-R5	CGTGATGGTTTTTGAAGGAATAAG	5100-5123	ccw
X1-longR	GGCTCCAAAGGTACAATACATAGTTG	7002-7027	ccw

cw: smer urinega kazalca, ccw: obratna smer urinega kazalca
cw: clock-wise, ccw: counter clock-wise.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-151

Table 5: Primers used for PCR amplification and sequencing of the complete genome of HPV-151.

Ime	Zaporedje (5' - 3')	Genomska lokacija (bp)	Usmeritev
HPV22-L1-f1mix	TGGCTTCCANCNTCNGGTAAG	5686-5706	cw
HPV22-L1-r1mix	GGTAATAGATGTCAGTNCTNTCCAC	5761-5785	ccw
X2-1Lfor	CCGAAACACAAAAAGAAGACCC	6995-7016	cw
x2-longR2	GGTAATAGATGTCAGTTCTCTCCAC	5761-5785	ccw
X2-F3	GTCAACACCAGTAACCGCACC	7298-7318	cw
X2-R3	TCAACATAATCTTCCAATAACCAATC	5367-5392	ccw
X2-F17	GAGGAGCCACCCGACAGAGAC	5025-5045	cw
X2-R17	GAAGCATACGCACACCCACTG	403-423	ccw
X2-L2F1-1	TATTTGCCTCCTACGCCACC	5710-5729	cw
X2-LongR	GAGTCGCCATACACATCATTAGAC	6390-6413	ccw
X2-F1	GTTACAGTGGCTGATAACACACG	6688-6710	cw
X2-R2	CACTGTGCTACTATCACTGGC	6736-6756	ccw
X2-R1	GGGTCTTCTTTTGTGTTTCGG	6995-7016	cw
X2-for2	GTTCTTGAAGAGCTTGTC	676-693	ccw
X2-rev2	CACTACGTCTAAATGGAG	4600-4617	ccw
X2-for3	TTAAAGACGCATATGGAG	1443-1459	cw
X2-rev3	CCAGGTGTGCTGATAAG	3840-3857	ccw
X2-for4	TTCAGCATGTCCCTAATG	2258-2275	cw
X2-rev4	TTACATTTTCAGGATCTC	3061-3078	ccw
X2-for5	GTAGAAACCAGTTTGGAG	2976-2993	cw
X2-for6	CCGCTCCCGATCGCGATC	3614-3631	ccw
X2-for7	TAAAATATGGCAGTGTTG	4219-4236	cw
X2-for8	CAATTGAGAGAATTAGTC	4834-4851	cw
X2-rev5	ATCATCTAAAAGGGCAAG	2354-2371	ccw
X2-rev6	ATAATGCAGCTATCATAC	1740-1757	ccw
X2-rev7	CCTCACTTTGCTGTTGAC	1128-1145	ccw
X2-rev8	AGCAAATCAAGAGACTTC	535-552	ccw

cw: smer urinega kazalca, ccw: obratna smer urinega kazalca

cw: clock-wise, ccw: counter clock-wise.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za PCR in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma HPV-125

Table 6: Primers used for PCR amplification and sequencing of the complete genome of HPV-125.

Ime	Zaporedje (5' - 3')	Genomska lokacija (bp)	Usmeritev
125-fpw1	GTTAGAAGACACAGAAAATTCCACA	5,999-6,023	cw
125-fpw2	CGTGCCCTTAGACATTTGC	6,278-6,296	cw
125-fpw3	CAACCAACTGTTTGTAAGTGTGG	6,605-6,627	cw
125-fpw4	CCAGTTTCCCCTTGGTAGG	7,004-7,022	cw
125-fpw5	GTATTGTGTGCTTTCAAATCTCC	7,602-7,624	cw
125-fpw6	GACGCCTGAAACACTGGG	216-235	cw
125-fpw7	GGTACAGAGGGGGACGAAT	708-726	cw
125-fpw8	GGGACGGACAGGAAGTGG	877-894	cw
125-fpw9	AAAGCATCCTGTGGAGTGTAG	1,296-1,317	cw
125-fpw10	TTGTAGTGAAGTGTATGGGGAA	1,715-1,736	cw
125-fpw11	TTGGAGGATGAAAAATTGAAG	2,442-2,462	cw
125-fpw12	CTAGCGAACCGTTTAGATGTG	2,632-2,652	cw
125-fpw13	ATCTCGGGAAATGTGGGAC	2,913-2,931	cw
125-fpw14	GAAGGACCGGAGCAAAAG	3,316-3,333	cw
125-fpw15	GTGTTTGTTTTGGCTGTGTG	3,821-3,840	cw
125-fpw16	GCGTGCATCCGCCACA	4,246-4,261	cw
125-fpw17	CCTGCTTTTACAGAACCTTCC	4,697-4,717	cw
125-fpw18	CTACAAAGTATGGCAATGTCACC	5,385-5,425	cw
125-fpw19	AAGGTGTCCGCCTTTCAATA	5,814-5,833	cw
125-rpw1	ATACAAGGCGTCAGGGATTG	6,430-6,449	ccw
125-rpw2	CCATACCCAGTGTCCACCAT	6,219-6,238	ccw
125-rpw3	GGTAACCGCACCTAAACAC	5,838-5,857	ccw
125-rpw4	AGGAGACACAAAGGGAATGG	5,406-5,425	ccw
125-rpw5	CTGTGAGGGGGAGTAAGGC	5,020-5,038	ccw
125-rpw6	AGACCTCCCAAATAAACACCA	4,366-4,386	ccw
125-rpw7	TGAGAACCAGGGGGTACATAG	3,954-3,974	ccw
125-rpw8	TTACATTAGTCAAAAATTCATCCC	3,680-3,703	ccw
125-rpw9	GGTCTCCATCATATCTAACTTCAA	2,972-2,995	ccw
125-rpw10	TGGTCCTCAAGATTGTTGCTAT	2,687-2,708	ccw
125-rpw11	GCATCGTCCAGCAAACC	2,286-2,302	ccw
125-rpw12	CATCCTTTACATACTTTGCCTG	1,923-1,944	ccw
125-rpw13	CCAAACACACACACCACCC	1,438-1,456	ccw
125-rpw14	CTTCCTGTCCGTCCCCTAC	873-891	ccw
125-rpw15	AAAGCTCCTCAAATGCCCT	627-645	ccw
125-rpw16	GTTTTCGGTCCCTCCCTAC	7,736-7,754	ccw
125-rpw17	ACATTACAGACGTGCCAAGG	7,489-7,507	ccw
125-rpw18	CCCACACCTACCTGCATCA	7,030-7,048	ccw
125-rpw19	CGTCATGTTAGTACTTCGTGTGG	6,634-6,656	ccw

cw: smer urinega kazalca, ccw: obratna smer urinega kazalca

cw: clock-wise, ccw: counter clock-wise.

Delna nukleotidna zaporedja novih genotipov, pridobljena z metodo sprehajanja začetnih oligonukleotidov, smo sestavili v nukleotidna zaporedja celotnega genoma s pomočjo programa ContigExpress iz programskega paketa Vector NTI AdvanceTM v11.0 (Invitrogen).

Pri sestavljanju celotnih genotipov HPV-125 in HPV-151 smo za oporo uporabili genoma HPV-3 in HPV-22, ki sta se kazala kot najbolj sorodna novim genotipom na podlagi poravnave delnih nukleotidnih zaporedij. Pri sestavljanju HPV-150 žal najbolj sorodni genotip, HPV-96, ni bil zadosti podoben HPV-150, da bi omogočal dobro oporo, zato smo slednjega sestavljali počasneje. Sestavljanje delnih nukleotidnih zaporedij novih genotipov v celotne genome prikazujejo slika 10, slika 11 in slika 12.

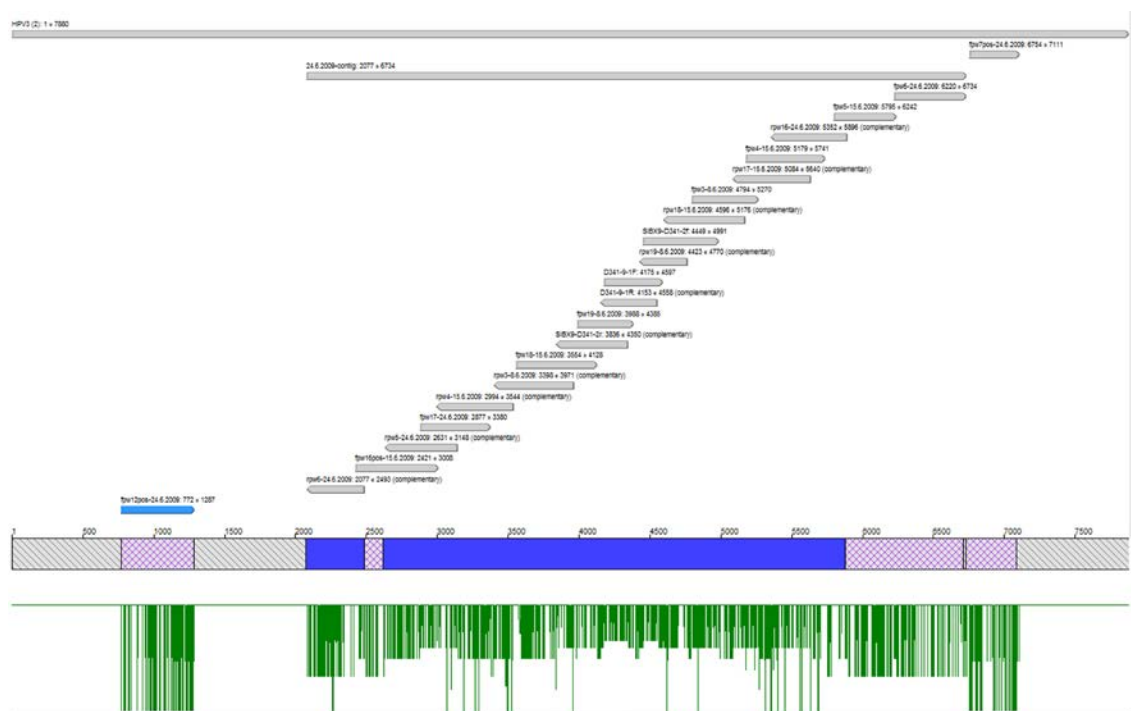
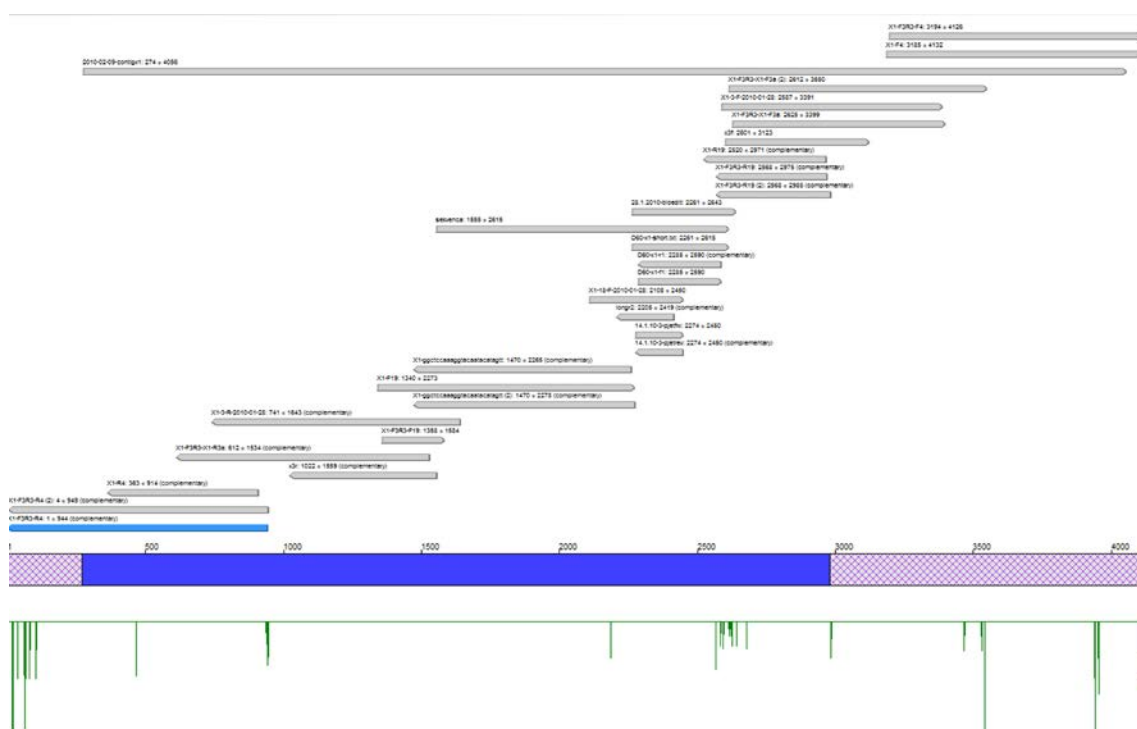
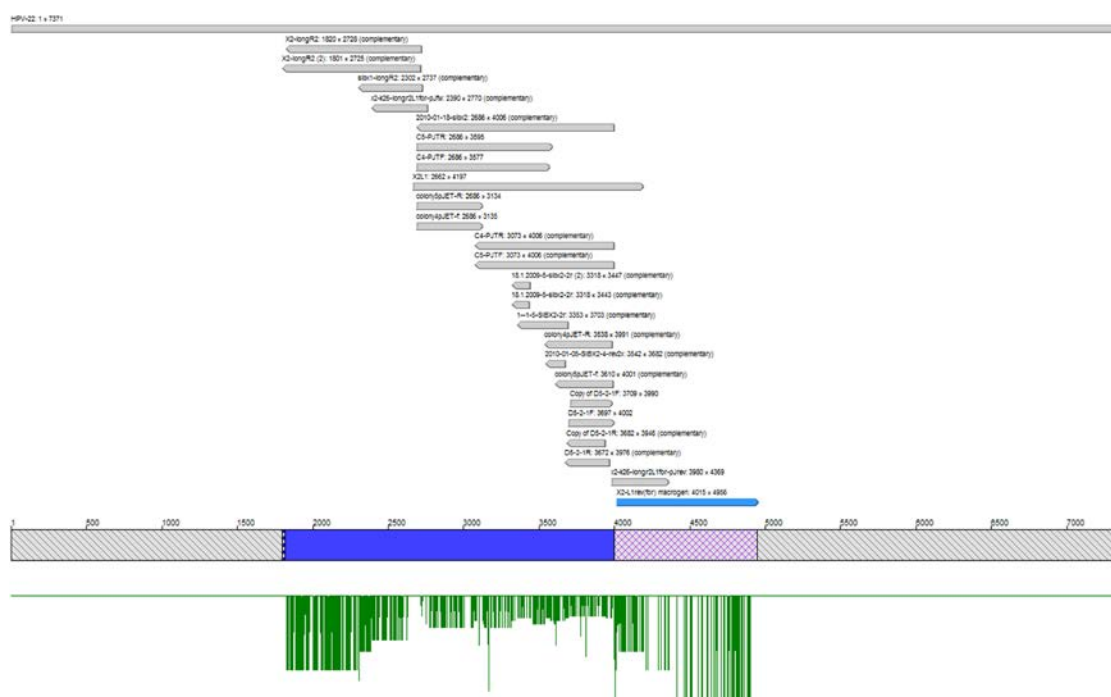


Figure 10: Assembly of the complete genome of HPV-125 from shorter nucleotide sequences using ContigExpress.



Slika 11: Sestavljanje celotnega genoma HPV-150 iz krajših nukleotidnih zaporedij s pomočjo programa ContigExpress

Figure 11: Assembly of the complete genome of HPV-150 from shorter nucleotide sequences using ContigExpress.



Slika 12: Sestavljanje celotnega genoma HPV-151 iz krajših nukleotidnih zaporedij s pomočjo programa ContigExpress

Figure 12: Assembly of the complete genome of HPV-151 from shorter nucleotide sequences using ContigExpress.

3.4 KLONIRANJE NOVIH GENOTIPOV

3.4.1 Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-125

Pridelke PCR za kloniranje celotnega genoma HPV-125 smo pripravili iz originalnega izolata s pomočjo kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cycler.

Za pripravo dveh prekrivajočih se fragmentov genoma HPV-125 velikosti 4594 bp in 5140 bp smo uporabili oligonukleotidne začetnike 125-fpw5 in 125-rpw6 ter 125-fpw14 in 125-rpw 15 (preglednica 6).

Obe PCR reakciji smo izvedli v končnem volumnu 25 μ l, vsebovali pa sta po 5 μ l originalnega izolata, 2,5 μ l 10x Expand Long Template buffer 2 s 27,5 mM $MgCl_2$, 500 μ M dNTP, 0,75 U Expand Long Template Enzyme Mix in 3 pmol vsakega oligonukleotidnega začetnika.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 56 °C in 6 min pri 68 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 10 min pri 68 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Pred kloniranjem smo s pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja preverili, da se nukleotidni zaporedji obeh fragmentov skladata z originalnim 7700 bp velikim pridelkom PCR genoma HPV-125.

3.4.2 Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-150

Pridelke PCR za kloniranje celotnega genoma HPV-150 smo pripravili iz redčenega pridelka WGA s pomočjo kompleta kemikalij KOD XtremeTM Hot Start DNA Polymerase (Toyobo Novagen, EMD Biosciences Inc., San Diego, CA), ki omogoča nastanek pridelkov PCR s topimi konci, na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cycler.

Za pripravo dveh prekrivajočih se fragmentov genoma HPV-150 velikosti 3465 bp in 4375 bp smo uporabili oligonukleotidne začetnike X1F18 in X1R18, ter X1F5 in X1R5 (preglednica 4).

Obe PCR reakciji smo izvedli v končnem volumnu 25 μ l, vsebovali pa sta po 1 μ l redčenega pridelka WGA, 12,5 μ l 2x Xtreme Buffer, 500 μ M dNTP, 0,02 U KOD XtremeTM Hot Start DNA Polymerase in 0,6 pmol vsakega oligonukleotidnega začetnika.

Reakcijski mešanici smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 60 °C in 3 min oz. 6 min pri 68 °C. Po končanem cikličnem pomnoževanju smo reakcijski mešanici ohladili na 4 °C.

Pred kloniranjem smo s pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja preverili, da se nukleotidni zaporedji obeh fragmentov skladata z določenim nukleotidnim zaporedjem celotnega genoma HPV-150.

3.4.3 Priprava pridelkov PCR za kloniranje HPV-151

Pridelke PCR za kloniranje celotnega genoma HPV-151 smo pripravili iz redčenega pridelka WGA s pomočjo kompleta kemikalij KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cycler.

Za pripravo dveh prekrivajočih se fragmentov genoma HPV-151 velikosti 2785 bp in 5481 bp smo uporabili oligonukleotidne začetnike X2F17 in X2R17 ter X2F3 in X2R3 (preglednica 5).

Obe PCR reakciji smo izvedli v končnem volumnu 25 µl, vsebovali pa sta po 1 µl redčenega pridelka WGA, 12,5 µl 2x Xtreme Buffer, 500 µM dNTP, 0,02 U KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase in 0,6 pmol vsakega oligonukleotidnega začetnika.

Reakcijski mešanici smo inkubirali 2 min pri 94 °C, čemur je sledilo 40 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 60 °C in 3 min oz. 6 min pri 68 °C. Po končanem cikličnem pomnoževanju smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Pred kloniranjem smo s pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja preverili, da se nukleotidni zaporedji obeh fragmentov skladata z določenim nukleotidnim zaporedjem celotnega genoma HPV-151.

3.4.4 Čiščenje pridelkov PCR na gelu

Za gelsko elektroforezo pridelkov PCR, namenjenih za kloniranje, smo uporabili 1 % agarozni gel, ki omogoča ločevanje večjih fragmentov DNA. 1 % agarozni gel smo pripravili iz 0,5 g agaroze Agarose for routine use, 50 ml steriliziranega 50x TAE pufra in 5 µl etidijevega bromida. Velikost specifičnih pridelkov PCR smo določali z velikostnim standardom High DNA Mass Ladder oz. z velikostnim standardom MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

Po končani elektroforezi smo gele, da smo kar najmanj poškodovali DNA, kratko pogledali pod UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm na napravi 3UVTM Benchtop Transilluminator (UVP, Upland, Kalifornija) ter pridelke PCR ustrezne velikosti izrezali iz gela s pomočjo sterilnega skalpela.

Izrezane pridelke PCR smo agaroze in drugih nečistoč očistili z uporabo kompleta kemikalij GeneJETTM Gel Extraction Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca.

3.4.5 Kloniranje

Za kloniranje smo uporabili komercialno dostopen komplet kemikalij CloneJETTM PCR Cloning Kit (Fermentas), s katerim smo prekrivajoče se pridelke PCR, ki so skupaj tvorili celotne genome HPV-125, HPV-150 in HPV-151, vsakega posebej vključili v vektorski plazmid pJET1.2 (Fermentas).

Vektorski plazmid pJET1.2/blunt cloning vector, ki smo ga uporabili, omogoča vključitev pridelkov PCR velikosti do 10 kbp. Kloniranje dodatno olajša s tem, da je v kompletu kemikalij CloneJETTM PCR Cloning Kit dostopen v linearizirani obliki, kar poveča delež uspešno vključenih pridelkov PCR.

Mesto vključitve pridelka PCR znotraj plazmida pJET1.2/blunt leži znotraj gena *eco47IR*, ki kodira za *E. coli* smrtonosno beljakovino. Ta gen se v primeru uspešne vključitve pridelka PCR prekine in omogoči preživetje transformant s plazmidom, v katerega je vključen pridelek PCR, medtem ko transformante s plazmidom brez vključenega pridelka PCR ne preživijo. Poleg tega vsebuje pJET1.2/blunt cloning vector tudi zapis *bla*(Ap^R) za rezistenco na antibiotik ampicilin, s čimer lahko izvršimo selekcijo med kompetentnimi celicami, ki so plazmid prejele, in tistimi, ki ga niso prejele.

Uporaba omenjenega plazmida tako omogoča ločevanje med celicami *E. coli*, ki plazmida niso prejele (ne morejo rasti na mediju z ampicilinom); tistimi, ki so prejele plazmid brez vključenega pridelka PCR (imajo zapis za rezistenco proti ampicilinu, vendar ne morejo rasti zaradi izražanja smrtonosnega gena); ter tistimi, ki so prejele plazmid z vključenim pridelkom PCR (imajo zapis za rezistenco proti ampicilinu, ne izražajo smrtonosnega gena, ker je le-ta prekinjen z vključitvijo pridelka PCR).

Postopek kloniranja se je med HPV-125 in HPV-150 ter HPV-151 razlikoval zaradi uporabe dveh različnih kompletov kemikalij. Pridelki PCR za kloniranje HPV-125 so bili pomnoženi s polimerazno mešanico Expand Long Template Enzyme Mix, zato so imeli klasične 'TA' (timin-adenin) konce, medtem ko so bili pridelki PCR za HPV-150 in HPV-

151 pomnoženi s pomočjo arhejske polimeraze (KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase), ki pri pridelkih PCR posreduje nastanek topih koncev (angl. *blunt-end*).

3.4.5.1 Kloniranje pridelkov PCR s 'TA' konci za HPV-125

Kloniranje pridelkov PCR s 'TA' konci sestavljata dve stopnji; priprava topih koncev (angl. *blunting*) in ligacijska reakcija.

Pripravo topih koncev smo izvedli s pomočjo termostabilne DNA polimeraze s popravljalno (angl. *proofreading*) aktivnostjo, ki je sposobna odstranitve enoverižnih 3' koncev in dopolnitve štrlečih enoverižnih 5' koncev pridelkov PCR.

Reakcijska mešanica za pripravo topih koncev je vsebovala 5-6 µl pridelka PCR, 10 µl 2x reaction buffer, 1 µl blunting enzyme in vodo do končnega volumna 18 µl. Mešanico smo vorteksirali ter na kratko centrifugirali, nato pa smo jo inkubirali 5 min pri 70 °C. Po segrevanju smo jo hitro ohladili na hladni ploščici in nadaljevali z ligacijsko reakcijo.

Reakcijsko mešanico za ligacijsko reakcijo smo pripravili tako, da smo v 18 µl reakcijske mešanice za pripravo topih koncev dodali 1 µl pJET1.2/blunt cloning vektorja in 1 µl T4 DNA ligaze. Mešanico smo vorteksirali ter na kratko centrifugirali, nato pa smo jo 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C).

3.4.5.2 Kloniranje pridelkov PCR s topimi konci za HPV-150 in HPV-151

Reakcijska mešanica za pripravo topih koncev je vsebovala 5-8 µl pridelka PCR, 10 µl 2x reaction buffer, 1 µl T4 DNA ligaze, 1 µl pJET1.2/blunt cloning vektorja in vodo do končnega volumna 20 µl. Mešanico smo vorteksirali ter na kratko centrifugirali, nato pa smo jo 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C).

3.4.5.3 Preverjanje uspešnosti ligacijske reakcije

Uspešnost ligacijske reakcije smo preverjali s pomočjo gelske elektroforeze, pri čemer smo uporabili 1 % agarozni gel, ki omogoča ločevanje večjih fragmentov DNA. 1 % agarozni gel smo pripravili iz 0,5 g agaroze Agarose for routine use, 50 ml steriliziranega 50x TAE pufra in 5 µl etidijevega bromida. Velikost specifičnih pridelkov PCR smo določali z velikostnim standardom High DNA Mass Ladder.

Po končani elektroforezi smo gele pregledali pod UV-svetlobo in jih fotografirali z napravo BIS 303 PC. Pozitiven rezultat oz. uspešno kloniranje je bilo razvidno iz prisotnosti fragmentov, večjih od velikosti pridelka PCR, vključenega v ligacijsko mešanico.

3.4.6 Transformacija

Za transformacijo bakterijskih celic *Escherichia coli* seva JM107 (Fermentas) smo uporabili komplet kemikalij TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas), s katerim smo pripravili kemo-kompetentne celice, v katere smo prenesli plazmide z vključenimi pridelki PCR virusnih genomov HPV-125, HPV-150 in HPV-151.

Pred začetkom postopka smo pripravili kemikalije iz kompleta TransformAid™ Bacterial Transformation Kit. Gojišče C-medium smo odtajali in razparcelirali, raztopino T-solution pa smo pripravili tako, da smo odtajani raztopini T-solution(A) in T-solution(B) pred vsakim postopkom med seboj zmešali v enakem razmerju.

Kemo-kompetentne celice *Escherichia coli* seva JM107 smo pripravili tako, da smo posamezne kolonije s plošč LB nacepili v 1,5 ml gojišča C-medium in jih inkubirali na stresalniku 2 uri pri 37 °C. Po inkubaciji smo gojišče centrifugirali in zavrgli supernatant, bakterijske celice, zbrane v obliki peleta, pa smo resuspendirali v 300 µl ledeno ohlajene T-solution in mešanico inkubirali 5 minut na ledu. Po inkubaciji smo mešanico zopet centrifugirali in zavrgli supernatant, bakterijske celice, zbrane v obliki peleta, pa smo vnovič resuspendirali v 120 µl ledeno ohlajene T-solution in mešanico inkubirali 5 minut na ledu. Med drugo inkubacijo smo v sveže epice pripravili po 5 µl ali manj ligacijske mešanice (vsebujoče 10-100 ng vektorske DNA) in jih hladili na ledu vsaj 2 minuti. Po drugi inkubaciji smo v vsako epico z ligacijsko mešanico dodali po 50 µl pripravljenih kemo-kompetentnih celic in mešanico inkubirali 30 minut na ledu. Po končani inkubaciji smo mešanico hitro nacepili na predhodno ogrete agarske plošče LB z ampicilinom, ki smo jih prejšnji dan pripravili s pomočjo agarske mešanice FastMedia™ LB Agar Amp (Fermentas). Nacepljene transformante smo čez noč inkubirali v termostatski komori pri 37 °C.

3.4.7 Preverjanje uspešnosti kloniranja

Če je bila transformacija kemokompetentnih bakterij uspešna, smo lahko naslednji dan že videli posamične kolonije. Posamične kolonije (vsaj 8) iz uspelih transformacij smo nacepili na nove agarske plošče LB z ampicilinom in inkubirali do vidne konfluentne rasti

(nekaj ur). V nadaljevanju bomo tovrstno pridobljene precepke iz posameznih kolonij imenovali kloni.

Uspešnost kloniranja smo določali tako, da smo najprej preverjali prisotnost ustreznih pridelkov PCR v plazmidih precepljenih kolonij s pomočjo t.i. PCR na osnovi kolonij (angl. *colony PCR*). Precepljene kolonije, za katere se je izkazalo, da njihovi plazmidi vsebujejo pridelke PCR ustrezne velikosti, smo izolirali ter jim določili nukleotidno zaporedje, kar je dokončno potrdilo ustreznost teh klonov za depozicijo v referenčni center.

3.4.7.1 PCR na osnovi kolonij

Vključitev ustreznih pridelkov PCR v plazmide smo preverjali z uporabo PCR na osnovi kolonij, za kar smo uporabili komplet kemikalij DreamTaqTM Green PCR Master Mix (2x) po navodilih proizvajalca. Uporabo PCR na osnovi kolonij nam je omogočala prisotnost mest za oligonukleotidne začetnike na plazmidu pJET1.2/blunt v bližini mesta vključitve pridelka PCR.

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 5 µl DreamTaqTM Green PCR Master Mix (2x), po 1 pmol začetnih oligonukleotidnih začetnikov pJET1.2 forward sequencing primer (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') in pJET1.2 reverse sequencing primer (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') ter vodo do 10 µl končnega volumna. Plazmidno DNA smo v reakcijo vnesli tako, da smo se posameznih klonov dotaknili s sterilnim plastičnim tipsom, ki smo ga nato potopili v reakcijsko mešanico. Za vsak klon smo uporabili nov, sterilni tips, ki smo ga nato zavrgli. Prisotnost kontaminacije smo preverili z negativno kontrolo, tako da smo v reakcijsko mešanico potopili sterilni tips.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 3 min pri 94 °C, čemur je sledilo 25 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 94 °C, 30 s pri 60 °C in 6 min pri 72 °C. Po končni stopnji podaljševanja, 6 min pri 72 °C, smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Prisotnost pridelkov PCR specifičnih velikosti smo preverjali s pomočjo gelske elektroforeze, kot je opisano v poglavju 3.2.6.

Tisti kloni, katerih pridelki PCR na osnovi kolonij so po velikosti ustrezali pridelkom PCR, vključenim v kloniranje, so bili izbrani za izolacijo plazmidov in določanje nukleotidnega zaporedja.

3.4.7.2 Izolacija plazmidov iz transformirane bakterijske kulture

Plazmide smo izolirali iz precepljene kulture iz kolonij, za katere smo z uporabo komercialno dostopnega kompleta kemikalij GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca dokazali prisotnost ustreznih pridelkov PCR.

3.4.7.3 Določanje nukleotidnega zaporedja referenčnih klonov

Določanje nukleotidnega zaporedja referenčnih klonov smo izvedli na t.i. način sprehajanja (angl. *primer-walking*) z ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki (za vsak genotip in klon) s pomočjo naprave ABI Prism®310 Genetic Analyzer System in kompleta kemikalij Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit.

Nukleotidno zaporedje klonov za HPV-150 in HPV-151 smo pred pošiljanjem v referenčni center dodatno potrdili še s komercialnim določanjem nukleotidnega zaporedja s strani MacroGen Inc. (Seoul, Koreja) in Microsynth AG (Balgach, Švica).

3.4.8 Depozicija klonov in potrditev celotnega nukleotidnega zaporedja novih genotipov s strani Referenčnega centra

Oba referenčna klona za HPV-125 smo septembra 2009 deponirali v Referenčni center za viruse papiloma (Reference Centre for Papillomaviruses) v Heidelbergu, kjer so klonom še enkrat neodvisno določili nukleotidno zaporedje in oktobra 2009 genotip HPV-125 uradno poimenovali.

Referenčne klone za HPV-150 in HPV-151 smo marca 2010 deponirali v Referenčni center za viruse papiloma, kjer so aprila 2010 vse klone neodvisno preverili in oba genotipa uradno poimenovali.

3.5 DOLOČANJE ODPRTIH BRALNIH OKVIRJEV

Pridobljena delna nukleotidna zaporedja novih genotipov smo sestavili v nukleotidna zaporedja celotnega genoma s pomočjo programa ContigExpress iz programskega paketa Vector NTI AdvanceTM v11.0.

Odperte bralne okvirje (angl. *open reading frames*, *ORF*) znotraj celotnega genoma smo za vsak genotip posebej določili s pomočjo aplikacije ORF finder programskega paketa Vector NTI AdvanceTM v11.0. Najdene ORF smo naknadno potrdili še s primerjavo z ORF najbolj sorodnih genotipov s pomočjo poravnave zaporedij s programom BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

3.6 FILOGENETSKE ANALIZE

Filogenetske analize za tri nove genotipe smo opravili glede na zmožnosti, ki smo jih imeli v času opredelitve, in se tako nekoliko razlikujejo med prvim opredeljenim genotipom HPV-125 in preostalima genotipoma HPV-150 in HPV-151, za katera smo analize izvedli leto pozneje.

3.6.1 Filogenetska analiza HPV-125

Filogenetsko analizo HPV-125 smo izvedli tako, da smo s pomočjo programa Alignment explorer iz programskega paketa MEGA4 (Tamura in sod., 2007) pripravili multiplo poravnavo med nukleotidnim zaporedjem gena za L1 HPV-125 ter nukleotidnimi zaporedji genov za L1 116 ostalih genotipov HPV, ki so bili na voljo konec leta 2009. Pri tem so bila znotraj poravnanih zaporedij odstranjena vsa mesta, ki so vsebovala presledke, tako da je bilo v končno analizo vključenih 1171 nukleotidnih pozicij oz. mest. Nadaljnje analize so bile prav tako opravljene s pomočjo programskega paketa MEGA 4 in sicer smo za določanje evolucijskega poteka uporabili metodo minimalne evolucije (angl. *minimum evolution*, ME) (Rzhetsky and Nei, 1992). Pri tem smo za določanje evolucijske razdalje (v enotah števila substitucij na mesto) uporabili metodo Maximum Composite Likelihood (Tamura in sod., 2004), za izdelavo izhodiščnega drevesa pa smo uporabili algoritem združevanja sosedov (angl. *neighbour-joining*, NJ) (Saitou and Nei, 1987). Izhodiščno ME drevo je bilo določeno s pomočjo algoritma Close-Neighbour-Interchange ali CNI (Nei and Kumar, 2000) z nivojem iskanja 1.

Pridobljeno optimalno drevo prikazuje slika 27. Zanesljivost drevesa smo testirali s pomočjo t.i. 'bootstrap' analize in izvedli 1000 ponovnih vzorčenj izhodiščnih podatkov.

Ker imajo lahko filogenetske analize z uporabo navedenih metod (NJ) določene pomanjkljivosti, posebej kadar gre za določanje finih filogenetskih razmerij, smo poleg omenjene analize izračunali še podobnosti med posameznimi geni (E6, E7, E1, E2, L2 in L1) HPV-125 in geni sedmih najbolj sorodnih genotipov (HPV-3, HPV-10, HPV-28, HPV-29, HPV-77, HPV-94 in HPV-117) z objavljenimi zaporedji. Primerjavo med nukleotidnimi in aminokislinskimi zaporedji genov omenjenih genotipov smo izvedli s pomočjo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

3.6.2 Filogenetska analiza HPV-150 in HPV-151

Za filogenetsko analizo HPV-150 in HPV-151 na podlagi gena L1 smo uporabili novejšo metodo, ki temelji na računanju največje verjetnosti za določeno evolucijsko pot (angl. *Maximum likelihood*, ML). Ker je metoda računsko zelo zahtevna, smo zelo hvaležni g. Sergeju Rožmanu, ki nam je omogočil brezplačno uporabo superračunalnika podjetja ABAKUS plus iz Kranja.

Najprej smo nukleotidna zaporedja gena L1 za 200 PV (tako človeških kot živalskih), ki so bila javno dostopna konec leta 2010, pripravili tako, da smo jih prevedli v aminokislinska zaporedja in jih poravnali s pomočjo programa MAFFT v6.832b (Kato in sod., 2002). Pridobljena poravnana zaporedja smo prevedli nazaj v nukleotidna zaporedja oz. v poravnavo na podlagi kodonov s pomočjo programa Pal2Nal (Suyama in sod., 2006). Poravnavo smo nato prečistili kodonskih mest, ki niso informativna, s pomočjo programa Gblocks (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007).

ML analizo pripravljene poravnave smo izvedli s pomočjo programa RAxML v7.2.8 alfa (PTHREADS version) (Stamatakis, 2006; Ott in sod., 2007; Stamatakis in sod., 2008) na računalniku 2x CPR 6 core AMD Opteron 2431 z 12 GB RAM DDR2-800 (ABAKUS plus, Kranj, Slovenija). Za izračune smo uporabili t.i. model GTR (angl. *general time-reversible model*) s štirimi gama diskretnimi stopnjami in tremi particijami (eno na vsako pozicijo znotraj kodona). Da bi določili podporo za razvejišča drevesa, smo naredili 1000 ponovitev 'bootstrap'.

3.7 PRIPRAVA TIPSKO SPECIFIČNIH PCR V REALNEM ČASU

3.7.1 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za PCR v realnem času

Začetne oligonukleotide in probe za tipsko specifične PCR v realnem času smo izbrali s pomočjo spletnega programa ProbeFinder (Roche Applied Science). Program omogoča izbiro med že pripravljenimi in testiranimi reagenti za PCR v realnem času, kar olajša postopek optimizacije oz. priprave testa in prenos le-tega na pol-avtomatiziran sistem.

3.7.1.1 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času

Za HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času smo izbrali začetna oligonukleotida 125-RT-L1-F (5'-GGT TAC CCG ACC CAA ATA AGT-3', nukleotidna mesta 5851-5871) in 125-RT-L1-R (5'-TCG GCG TCA GGA TTA TAG ATG-3', nukleotidna mesta 5891-5911), ki pomnožujeta 61 bp veliko zaporedje znotraj gena L1. Za detekcijo pridelka PCR v realnem času smo uporabili univerzalno probo, označeno s FAM barvilom Universal Probe #14 (Roche Applied Science).

3.7.1.2 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času

Za HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času smo izbrali začetna oligonukleotida RT-150-F (5'-AGG CCT TAC CTT GTG CTG AA-3', nukleotidna mesta 6355-6374) in RT-150-R (5'-TTA ATT CTA AAG GAG GAC ATG AAC C -3', nukleotidna mesta 6390-6414), ki pomnožujeta 60 bp veliko zaporedje znotraj gena L1. Za detekcijo pridelka PCR v realnem času smo uporabili univerzalno probo, označeno s FAM barvilom Universal Probe #50 (Roche Applied Science).

3.7.1.3 Izbira začetnih oligonukleotidov in prob za HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času

Za HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času smo izbrali oligonukleotidna začetnika RT-151-F (5'-ATC AGC AAC AGA TGG AGC AA-3', nukleotidna mesta 5838-5857) in RT-151-R (5'-GCT CTA TAC TGG TTC CCT GAC AC-3', nukleotidna mesta 5875-5897), ki pomnožujeta 60 bp veliko zaporedje znotraj gena L1. Za detekcijo pridelka PCR

v realnem času smo uporabili univerzalno probo, označeno s FAM barvilom Universal Probe #127 (Roche Applied Science).

3.7.2 Optimizacija kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Za optimizacijo kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času smo uporabili referenčne klone treh novih genotipov. Količino plazmidne DNA smo določili z uporabo naprave NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija), število kopij plazmida/ μ l pa smo izračunali s pomočjo enačbe Whelana in sod. (Whelan in sod., 2003).

Vse tri kvantitativne tipsko specifične PCR v realnem času smo izvedli s pomočjo kompleta kemikalij LightCycler® Probes Master (Roche Applied Science) na napravi LightCycler® 480 real-time PCR instrument (Roche Applied Science). Pri tej napravi PCR v realnem času poteka na posebni plastični ploščici, ki jo zapremo s prozorno folijo, njena dodatna prednost pa je, da omogoča sočasno pomnoževanje 96 vzorcev.

3.7.2.1 Kvantitativni HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času

Optimizirana reakcijska mešanica za HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času je vsebovala 10 μ l LightCycler® Probes Master 2x conc., 0.2 μ M vsakega od začetnih oligonukleotidov, 0.05 μ M Universal Probe #14, 1 U LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (Roche Applied Science), tarčno DNA in vodo do končnega volumna 20 μ l.

HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času so sestavljali naslednji koraki: aktivacija N-uracil-glikozilaze 10 min pri 40 °C, predinkubacija 10 min pri 95 °C, 45 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 95 °C (denaturacija) in 30 s pri 60 °C (naleganje/podaljševanje). Merjenje fluorescenčnega signala (valovna dolžina FAM 465-510 nm) je potekalo med vsako stopnjo naleganja/podaljševanja na t.i. 'single mode' način. Po končanem cikličnem pomnoževanju smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

3.7.2.2 Kvantitativni HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času

Optimizirana reakcijska mešanica za HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času je vsebovala 10 μ l LightCycler® Probes Master 2x conc., 0.2 μ M vsakega od začetnih oligonukleotidov, 0.05 μ M Universal Probe #50, 1 U LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase, tarčno DNA in vodo do končnega volumna 20 μ l.

HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času so sestavljali naslednji koraki: aktivacija N-uracil-glikozilaze 10 min pri 40 °C, predinkubacija 10 min pri 95 °C, 45 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 95 °C (denaturacija), 30 s pri 59 °C (naleganje) in 1 s pri 72 °C (podaljševanje). Merjenje fluorescenčnega signala (valovna dolžina FAM 465-510 nm) je potekalo med vsako stopnjo naleganja/podaljševanja na način '*single mode*'. Po končanem cikličnem pomnoževanju smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

3.7.2.3 Kvantitativni HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času

Optimizirana reakcijska mešanica za HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času je vsebovala 10 µl LightCycler® Probes Master 2x conc., 0.2 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov, 0.05 µM Universal Probe #127, 1 U LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase, tarčno DNA in vodo do končnega volumna 20 µl.

HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času so sestavljali naslednji koraki: aktivacija N-uracil-glikozilaze 10 min pri 40 °C, predinkubacija 10 min pri 95 °C, 45 ciklov pomnoževanja; 10 s pri 95 °C (denaturacija), 30 s pri 59 °C (naleganje) in 1 s pri 72 °C (podaljševanje). Merjenje fluorescenčnega signala (valovna dolžina FAM 465-510 nm) je potekalo med vsako stopnjo naleganja/podaljševanja na način '*single mode*'. Po končanem cikličnem pomnoževanju smo reakcijsko mešanico ohladili na 4 °C.

Pogoji za pomnoževanje tipsko specifičnega PCR v realnem času za HPV-150 in HPV-151 so bili namenoma identični, saj je to omogočalo istočasno testiranje vzorcev za oba genotipa in bolj optimalno uporabo naprave LightCycler® 480.

3.7.3 Evaluacija kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Vse serijske redčine referenčnih plazmidov HPV-125, HPV-150 in HPV-151, ki smo jih uporabili za evaluacijo, smo pripravili v vodni raztopini s prenašalno oz. '*carrier*' RNA (1 µl/ml) v 1,5 ml DNA LoBind tubicah (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

3.7.3.1 Ugotavljanje linearnosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Linearnost vseh treh kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času smo določali s testiranjem desetkratnih serijskih redčin referenčnih plazmidov HPV-125, HPV-150 in HPV-151 v triplikatu.

3.7.3.2 Določanje meje detekcije kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Mejo detekcije (angl. *limit-of-detection*, *LOD*) smo določali na podlagi testiranja 15 replikatov redčin referenčnih plazmidov, ki so ustrezali 25, 13, 6, 3, 1,5, 0,8 in 0,4 kopijam na reakcijo. Mejo detekcije s 95 % intervalom zaupanja smo izračunali z uporabo analize Probit s pomočjo programskega paketa PASW Statistics v.18.0.0.0. software (SPSS Software, Munich, Nemčija).

3.7.3.3 Določanje ponovljivosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Ponovljivost znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi (angl. *intra- and inter-assay reproducibility*) smo določali tako, da smo testirali triplikate plazmidnih redčin, ki so ustrezale 100 oziroma 10 kopijam referenčnega plazmida na reakcijo v treh neodvisnih poskusih. Koeficient variacije (angl. *coefficient of variation*, *CV*) smo izračunali po formuli:

$$CV (\%) = (\text{standardna deviacija} / \text{povprečni Ct}) * 100$$

3.7.3.4 Določanje specifičnosti in preverjanje navzkrižne reaktivnosti kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času

Specifičnost HPV-125 tipsko specifičnega PCR v realnem času smo ugotavljali tako, da smo testirali 10^7 - 10^8 kopij referenčnih klonov (za katere se zahvaljujemo prof. de Villiers, prof. Matsukura in prof. Burk) ali sintetičnih L1 zaporedij HPV-2, HPV-3, HPV-7, HPV-10, HPV-27, HPV-28, HPV-29, HPV-40, HPV-43, HPV-77, HPV-78 in HPV-91 (po naročilu vstavljenih v plazmid pUC57 s strani podjetja Genscript, Piscataway, ZDA).

Specifičnost HPV-150 in HPV-151 tipsko specifičnih PCR v realnem času smo ugotavljali tako, da smo testirali 10^7 - 10^8 kopij sintetičnih L1 zaporedij HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-38, HPV-80, HPV-92, HPV-96, HPV-100, HPV-111, HPV-113, HPV-120 in HPV-122 (vstavljenih v plazmid pUC57 s strani podjetja Genscript).

3.8 TESTIRANJE KLINIČNIH VZORCEV

Klinični vzorci, ki smo jih testirali, da bi določili prevalenco novih genotipov, so bili izbrani tako, da so predstavljali najpogostejše s HPV povezane benigne ter maligne kožne in sluznične spremembe pri človeku. Vsi vzorci tkiv so bili histološko pregledani in so bili zbrani bodisi v okviru preteklih raziskav naše raziskovane skupine (Kocjan in sod., 2005, 2009a; 2009b; Potočnik in sod., 2006, 2007; Jančar in sod., 2009) bodisi so bili pridobljeni iz arhivske zbirke Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili anonimizirani, s čimer je bila zaščitena identiteta bolnikov. Dostopni so ostali samo podatki o spolu, starosti in imunskem statusu bolnikov, kadar so bili le-ti podatki zbrani v okviru originalne preiskave. Kot skupino vzorcev brez kliničnih sprememb smo vzeli dlačne mešičke, ki so znan rezervoar HPV.

Glede na tip vzorca je bila DNA izolirana po protokolih, opisanih v prejšnjih raziskavah naše raziskovalne skupine (Kocjan in sod., 2005, 2009a; 2009b; Potočnik in sod., 2006, 2007; Jančar in sod., 2009). Kvaliteto DNA v vzorcih in odsotnost inhibitorjev PCR smo preverjali s pomnoževanjem 110 bp oz. 268 bp velikega fragmenta gena za človeški beta-globin (Jančar in sod., 2009). S pomočjo izmerjene koncentracije beta-globina smo pri HPV-125, HPV-150 in HPV-151 pozitivnih vzorcih izračunali število humanih celic na μ l kliničnega vzorca (Hazard in sod., 2006). S pomočjo dobljenega števila pa smo lahko določili razmerje med številom virusnih genomov in številom humanih celic.

3.8.1 Testiranje kliničnih vzorcev na HPV-125

V testiranje na HPV-125 je bil vključen 601 vzorec: 104 vzorci raka materničnega vratu, 85 vzorcev papilomov grla, 71 vzorcev genitalnih bradavic, 102 vzorca navadnih kožnih bradavic, 52 vzorcev ploščatoceličnega raka kože, 49 vzorcev bazalnoceličnega raka kože in 138 vzorcev dlačnih mešičkov.

Vzorci smo testirali na napravi LightCycler® 480 po protokolu za tipsko specifični PCR v realnem času, ki je opisan v poglavju 3.7.2.1.

V vzorcih, pozitivnih na HPV-125, smo prisotnost drugih genotipov HPV preverjali z uporabo komercialno dostopnih testov, ki temeljijo na hibridizaciji pridelkov PCR s specifičnimi tarčnimi probami, nanesenimi na trakce; RHA skin (beta) HPV (Diassay B.V., Rijswijk, Nizozemska), ki omogoča prepoznavanje 26 različnih genotipov HPV iz rodu *Betapapillomavirus*; ter INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics), ki omogoča identifikacijo 28 različnih genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus*. Dodatno smo prisotnost drugih genotipov HPV preverjali še z uporabo 'in-house' PCR reakcij z Ma/Ha (Boxman in sod., 1997), CPI/CPIIs (Tieben in sod., 1993) in GP 5+/6+ (de Roda Husman

in sod., 1995) seti začetnih oligonukleotidov in naknadnim določanjem nukleotidega zaporedja.

3.8.2 Testiranje kliničnih vzorcev na HPV-150 in HPV-151

V testiranje na HPV-150 in HPV-151, ki je potekalo sočasno, smo vključili 540 vzorcev: 100 vzorcev raka materničnega vratu, 78 vzorcev papilomov grla, 71 vzorcev genitalnih bradavic, 101 vzorec navadnih kožnih bradavic, 52 vzorcev SCC, 49 vzorcev BCC in 89 vzorcev dlačnih mešičkov.

Vzorci smo testirali na napravi LightCycler® 480 po protokolih za tipsko specifični PCR v realnem času, opisanih v poglavjih 3.7.2.2. in 3.7.2.3.

Prisotnost drugih genotipov HPV v vzorcih, pozitivnih na HPV-150 oz. HPV-151, smo preverjali z uporabo komercialno dostopnih testov, ki temeljijo na hibridizaciji pridelkov PCR s specifičnimi tarčnimi probami, nanesenimi na trakce; RHA skin (beta) HPV, ki omogoča prepoznavanje 26 različnih genotipov HPV iz rodu *Betapapillomavirus*; ter INNO-LiPA HPV Genotyping Extra, ki omogoča identifikacijo 28 različnih genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus*. Dodatno smo prisotnost drugih genotipov HPV preverjali še z uporabo 'in-house' reakcij PCR z GP 5+/6+ (de Roda Husman in sod., 1995) setom začetnih oligonukleotidov in naknadnim določanjem nukleotidega zaporedja.

Pri HPV-150 smo lahko preverjali tudi prisotnost dolgotrajne oz. perzistentne okužbe, saj smo imeli za eno od oseb s HPV-150 pozitivnim vzorcem dlačnega mešička na razpolago skupaj 28 vzorcev dlačnih mešičkov, ki smo jih v enem letu sedemkrat odvzeli s štirih različnih anatomskih mest. Vseh 28 vzorcev smo testirali s kvantitativnim tipsko specifičnim testom PCR v realnem času, na enak način kot je potekalo testiranje drugih vzorcev.

3.8.3 Delna opredelitev kandidatnega izolata za novi genotip SI-HPV-Beta5, identificiranega pri testiranju kliničnih vzorcev na HPV-125, HPV-150 in HPV-151

Pri testiranju kliničnih vzorcev na HPV-125, HPV-150 in HPV-151 smo pri vzorcu SCC, odvzetem 64-letnemu imunokompromitiranemu moškemu, identificirali prisotnost kandidatnega izolata za nov genotip, ki smo ga poimenovali SI-HPV-Beta5.

Izolatu smo z uporabo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za HPV-150 v reakciji PCR z nižjo temperaturo naleganja, določili 354 bp dolgo nukleotidno zaporedje. Pridobljeno nukleotidno zaporedje smo primerjali z drugimi genotipi HPV z nukleotidno poravnavo s spletnim programom Nucleotide BLAST (NCBI, 2011).

4 REZULTATI

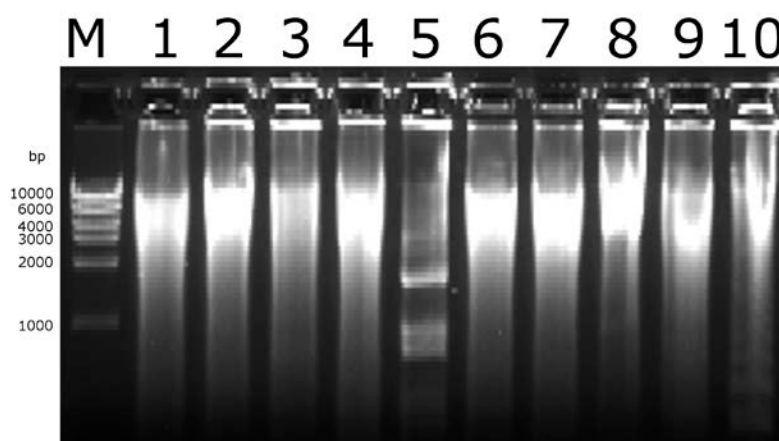
4.1 REZULTATI POMNOŽEVANJA CELOTNEGA GENOMA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151

4.1.1 Rezultati izotermalnega pomnoževanja izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov

Za pomnoževanja izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov, smo zaradi majhne količine DNA uporabili metodo izotermalnega pomnoževanja po principu kotalečega se kroga (RCA oz. WGA).

Izolat SIBX9 je izviral iz vzorca tkiva in je tako predstavljal edini kandidatni izolat, za katerega zaradi zadostne količine virusne DNA v vzorcu izotermalna amplifikacija ni bila potrebna.

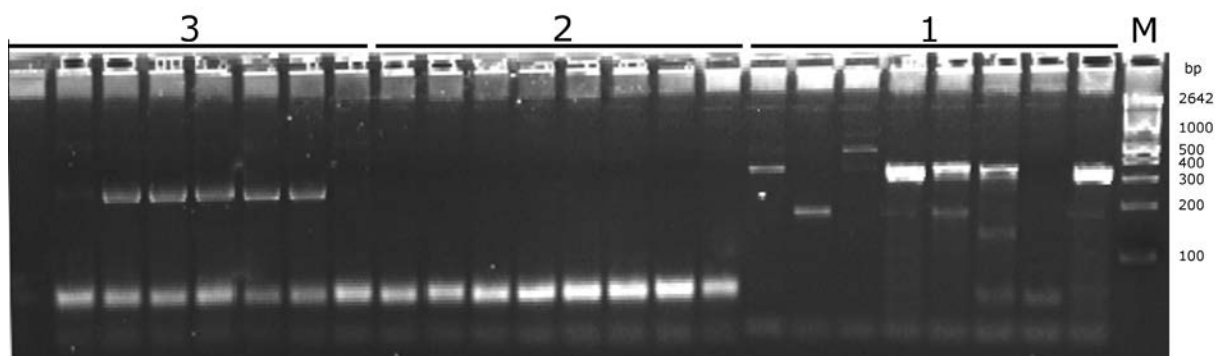
Zaradi predhodne opredelitve izolatov SIBX3, SIBX4, SIBX6 in SIBX7 kot genotipov HPV-120 (Bernard in sod., 2010), HPV-105 (de Villiers in Gunst, 2009), HPV-99 (de Villiers in Gunst, 2009) in HPV-100 (de Villiers in Gunst, 2009) smo se osredotočili na izotermalno amplifikacijo preostalih izolatov iz dlačnih mešičkov; SIBX1, SIBX2, SIBX5 in SIBX8. Primer pridelkov izotermalnega pomnoževanja izolatov iz dlačnih mešičkov prikazuje slika 13.



Slika 13: Pridelki izotermalnega pomnoževanja izolatov iz dlačnih mešičkov. M: Velikostni standard High DNA Mass Ladder. 1-10: Vzorci, pomnoženi z WGA metodo. Elektroforeza je potekala na 1 % agaroznem gelu 30 minut.

Figure 13: Products of isothermal amplification of hair follicle isolates. M: High DNA Mass Ladder. 1-10: WGA amplified samples. Electrophoresis was run for 30 min on an 1 % agarose gel.

Ker iz samih pridelkov WGA ni razvidno, ali se je pomnožil iskani genotip HPV, smo njegovo prisotnost preverjali s pomočjo kratkega tipsko specifičnega PCR. Rezultate takšnega pomnoževanja prikazuje slika 14.



Slika 14: Pridelki kratkega tipsko specifičnega PCR, pripravljeni iz razredčenih pridelkov izotermalnega pomnoževanja (WGA). M: Velikostni standard DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder). 1,2,3: pridelki kratkih tipsko specifičnih PCR reakcij iz po 8 WGA reakcij iz posameznega vzorca (1, 2 ali 3). Pri nekaterih ponovitvah vzorcev 1 in 3 vidimo pridelke tipsko specifične PCR reakcije, kar kaže da smo s predhodno WGA reakcijo uspešno pomnožili želeni genotip HPV. Vzorec 2 predstavlja WGA reakcijo, pri kateri nam ni uspelo pomnožiti želenega genotipa HPV, saj je tipsko specifični PCR negativen. Elektroforeza je potekala na 2 % gelu za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini 20 minut.

Figure 14: Products of short type-specific PCR from diluted isothermal amplification (WGA) products. M: DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder). 1,2,3: PCR products of short type-specific PCR reactions from 8 WGA reactions each (1, 2 or 3). Appropriate products can be observed in several reactions from samples 1 and 3, indicating the novel genotype was successfully amplified by the respective WGA reaction. The WGA reaction failed to amplify the novel HPV genotype from sample 2, as no type-specific PCR products are present. Electrophoresis was run for 20 minutes on a 2 % gel for multiple use PCR Check IT Wide Mini.

Za izolata SIBX5 in SIBX8, ki sta bila pridobljena iz dlačnih mešičkov leta 2003/04, na žalost niti z nespecifičnim izotermalnim pomnoževanjem nismo uspeli pomnožiti virusne DNA, zato smo se v doktorski nalogi osredotočili na preostale tri slovenske potencialne kandidatne izolate; SIBX1 in SIBX2 izolirana iz dlačnih mešičkov, ter SIBX9, ki je bil izoliran iz vzorca tkiva.

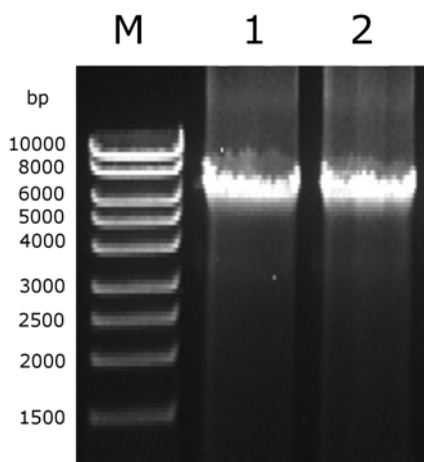
4.1.2 Rezultati PCR pomnoževanja celotnega genoma in dolgih nukleotidnih odsekov novih genotipov za pripravo referenčnih klonov

7700 bp velik PCR pridelek HPV-125 smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov 125-fpw2 in 125-rpw2 (preglednica 6) in kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cycler. 4594 bp in 5140 bp velika pridelka PCR za pripravo referenčnega klona HPV-125 smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov 125-fpw5 in 125-rpw6, ter 125-fpw14 in 125-rpw 15 (preglednica 6) in

kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor.

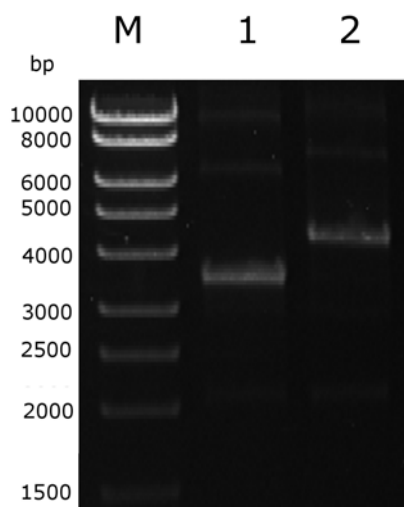
7367 bp velik pridelek PCR HPV-150 smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov X1-longF in X1-longR (preglednica 4) in kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor. 3465 bp in 4375 bp velika pridelka PCR za kloniranje smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov X1F18 in X1R18, ter X1F5 in X1R5 (preglednica 4) in kompleta kemikalij KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor. Preverjanja uspešnega pomnoževanja dolgega pridelka PCR z gelsko elektroforezo prikazuje slika 15, preverjanje uspešnega pomnoževanja pridelkov PCR za kloniranje pa prikazuje slika 16.

6256 bp velik PCR pridelek HPV-151 smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov X2-L1For in X2-longR2 (preglednica 5) in kompleta kemikalij Expand Long Template PCR System na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor. 2785 bp in 5481 bp velika pridelka PCR za kloniranje smo pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov X2F17 in X2R17, ter X2F3 in X2R3 (preglednica 5) in kompleta kemikalij KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase na cikličnem termostatu PE9700 Thermo Cyclor.



Slika 15: Preverjanja uspešnega pomnoževanja dolgega pridelka PCR HPV-150. M: Velikostni standard MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use. 1, 2: 7367 bp velika PCR pridelka HPV-150. Elektroforeza je potekala na 1 % agaroznem gelu 30 minut.

Figure 15: Successful amplification of near full-length PCR product of HPV-150. M: MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use. 1, 2: 7367 bp PCR product of HPV-150. Electrophoresis was run for 30 min on an 1 % agarose gel.



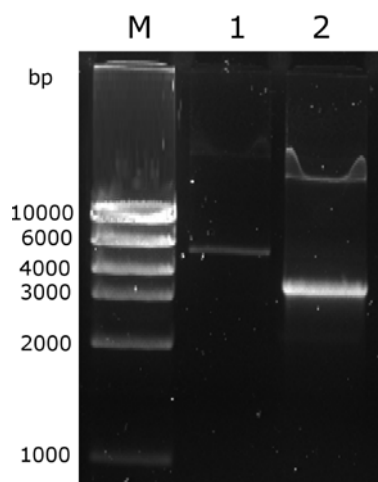
Slika 16: Preverjanje uspešnega pomnoževanja pridelkov PCR za kloniranje HPV-150. M: Velikostni standard MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use. 1, 2: 3465 bp in 4375 bp velika pridelka PCR HPV-150. Elektroforeza je potekala na 1 % agaroznem gelu 30 minut.

Figure 16: Successful amplification of PCR products for cloning of HPV-150. M: MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use. 1, 2: 3465 bp and 4375 bp PCR products of HPV-150. Electrophoresis was run for 30 min on an 1 % agarose gel.

4.2 REZULTATI KLONIRANJA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151

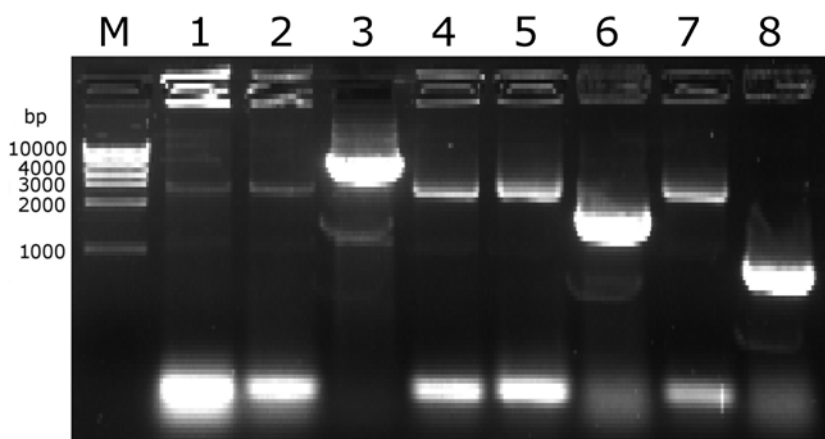
Uspešnost kloniranja genotipov HPV-125, HPV-150 in HPV-151 smo preverjali na dveh stopnjah, in sicer smo z elektroforezo na gelu preverjali uspeh ligacijske reakcije, s PCR na osnovi kolonij pa smo preverjali prisotnost ustreznega fragmenta genoma (pridelka PCR za kloniranje) v pridobljenih klonih. Primer uspele ligacijske reakcije prikazuje slika 17.

Po kloniranju smo prisotnost plazmidov z vključenim ustreznim pridelkom PCR preverjali s PCR na osnovi kolonij. Primer pridelkov PCR na osnovi kolonij, nastalih pri pripravi referenčnega klona za HPV-151, prikazuje slika 18.



Slika 17: Preverjanje uspeha ligacijske reakcije med plazmidom pJET/blunt in pridelkom PCR za pripravo referenčnega klona HPV-151. M: Velikostni standard High DNA Mass Ladder. 1: 5481 bp velik PCR pridelek HPV-151. 2: Uspela ligacijska reakcija. Viden je plazmid pJET/blunt, velikosti 3128 bp (brez vključenega pridelka PCR), ter plazmid z vključenim pridelkom PCR (zgoraj). Zaradi zaokrožene oblike je potovanje plazmida z vključenim pridelkom PCR (8609 bp) počasnejše. Elektroforeza je na 1 % agaroznem gelu potekala 30 minut.

Figure 17: Validation of the ligation reaction, between the pJET/blunt and PCR product, used to prepare the reference clone of HPV-151. M: High DNA Mass Ladder. 1: 5481 bp PCR product of HPV-151. 2: A successful ligation reaction. The 3128 bp linear pJET/blunt plasmid can be seen below the plasmid with the inserted PCR product (8609 bp). The plasmid with the PCR product travels slower than expected, due to its circular form. Electrophoresis was run for 30 min on an 1 % agarose gel.



Slika 18: Gelska elektroforeza pridelkov PCR na osnovi kolonij. M: Velikostni standard High DNA Mass Ladder. 1,2,4,5,6,7,8: pridelki PCR na osnovi kolonij iz klonov oz. njihovih plazmidov, ki ne vsebujejo ustreznega pridelka PCR. 3: pridelek PCR klona, v katerega plazmidu je vključen ustrezen pridelek PCR HPV-151 (5481 bp). Elektroforeza je na 1 % agaroznem gelu potekala 20 minut.

Figure 18: Gel electrophoresis of colony PCR products. M: High DNA Mass Ladder. 1,2,4,5,6,7,8: Colony PCR products from clones without the appropriate PCR product. 3: PCR product of clone containing the appropriate PCR product of HPV-151 (5481 bp). Electrophoresis was run for 30 min on an 1 % agarose gel.

Značilnosti uspešno pripravljenih referenčnih klonov novih genotipov HPV-125, HPV-150 in HPV-151 prikazuje preglednica 7.

Preglednica 7: Značilnosti referenčnih klonov novih genotipov humanih virusov papiloma

Table 7: Properties of reference clones of novel HPV genotypes.

Genotip	Ime klona*	Dolžina vključenega pridelka PCR (bp)	Odgovarjajoči del genoma (bp)	Skupna dolžina klona (bp)
HPV-125	125-fpw5rpw6	4594	7602-4386	7722
	125-fpw14rpw15	5140	3316-6456	8268
HPV-150	X1-F18R18	3465	4985-1013	6593
	X1-F5R5	4375	749-5123	7503
HPV-151	X2-F17R17	2785	5025-423	5913
	X2-F3R3	5481	7298-5392	8609

* Ime klonov izhaja iz začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za pripravo pridelkov PCR za kloniranje.

* The name of the clones is based on the name of the PCR primers used for cloning.

4.3 ZNAČILNOSTI GENOMA NOVIH GENOTIPOV HPV-125, HPV-150 IN HPV-151

4.3.1 Organizacija genoma novih genotipov

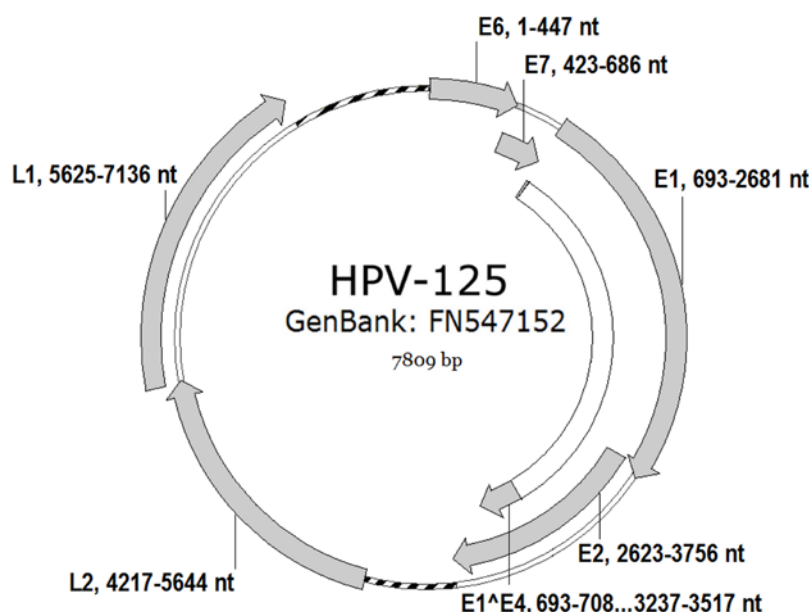
Celotna nukleotidna zaporedja genomov novih genotipov smo prvotno pridobili z določanjem nukleotidnega zaporedja iz dolgih pridelkov PCR, naknadno pa smo zaporedja potrdili še z določanjem nukleotidnega zaporedja referenčnim klonom. Nukleotidna zaporedja referenčnih klonov so bila dodatno neodvisno potrjena s strani Referenčnega centra za viruse papiloma v Heidelbergu.

4.3.1.1 Organizacija genoma HPV-125

Celotni genom HPV-125 vsebuje 7809 bp in ima 46,4 % delež GC nukleotidov. Celotno nukleotidno zaporedje smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijsko oznako FN547152.

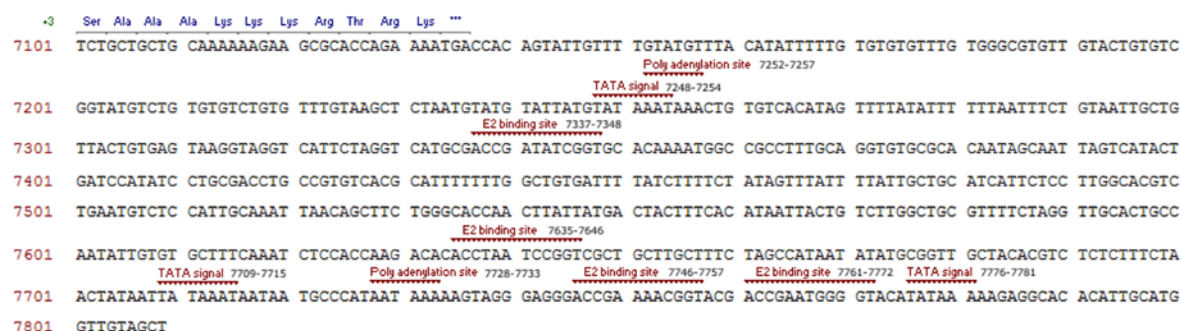
Določitev lokacije ORF oz. genov je pokazala, da je genom HPV-125 organiziran na način, ki je tipičen za predstavnike rodu *Alphapapillomavirus* (slika 19). Genom HPV-125 tako vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E7, E6, E1, E2 in E4 ter pozni beljakovini L2 in L1. Za razliko od nekaterih ostalih PV iz tega rodu HPV-125 nima zapisa za beljakovino E5.

Genom HPV-125 vsebuje tudi dve nekodirajoči področji, t.i. nekodirajočo dolgo kontrolno regijo (angl. *long control region*, LCR), imenovano tudi zgornje regulatorno področje (angl. *upper regulatory region*, URR), ki se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7137-7809 bp, dolžina 673 bp), ter krajše nekodirajoče področje, ki se nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 3757-4216 bp, dolžina 460 bp). Nukleotidno zaporedje in različna karakteristična vezavna mesta področja LCR prikazuje slika 20.



Slika 19: Organizacija genoma HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a). Genomske lokacije virusnih genov E6, E7, E1, E2, E4 (E1^ΔE4), L2 in L1 so prikazane ob vsakem genu. Nekodirajoča področja so označena s črtkano črto.

Figure 19: Genomic organization of HPV-125 (Kovanda et al., 2011a) showing genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, E4 (E1^ΔE4), L1, L2, and the non-coding regions located between L1 and E6 (LCR); and E2 and L2 (dotted line).



Slika 20: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a). Genomske lokacije vezavnih mest za E2 (ACC-N₅₋₇-GGT), poliadenilacijskih mest (AATAAA) in TATA signalov (TATAAA ali TATA(A/T)A(A/T)) so prikazane nad kodirajočo verigo nukleotidnega zaporedja.

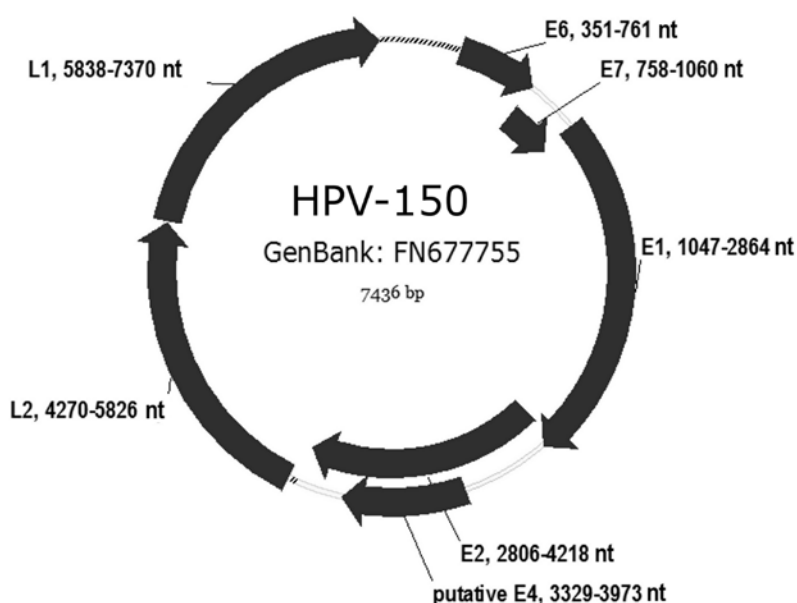
Figure 20: Characteristic features of the long control region of HPV-125 (Kovanda et al., 2011a), showing genomic locations of E2 binding sites (ACC-N₅₋₇-GGT), polyadenylation sites (AATAAA), and TATA signals (TATAAA or TATA(A/T)A(A/T)) above the coding DNA strand.

4.3.1.2 Organizacija genoma HPV-150

Celotni genom HPV-150 vsebuje 7436 bp in ima 39,70 % delež GC nukleotidov. Celotno nukleotidno zaporedje smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijsko oznako FN677755.

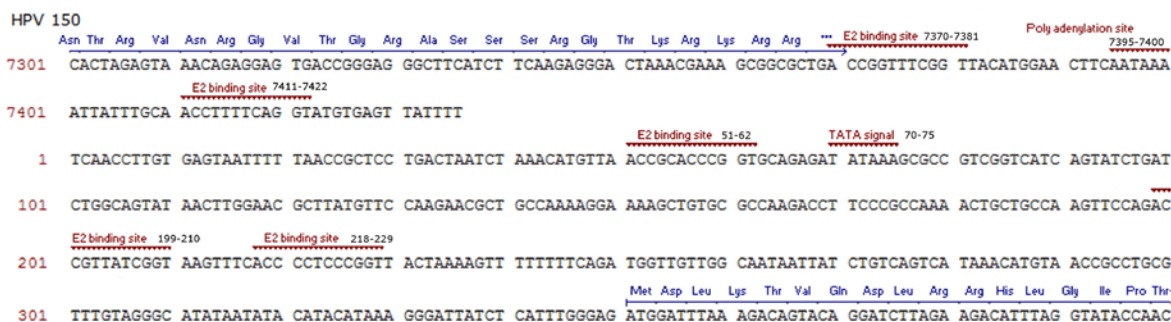
Določitev lokacije ORF oz. genov je pokazala, da je genom HPV-150 organiziran na način, ki je tipičen za predstavnike rodu *Betapapillomavirus* (slika 21). Genom HPV-150 tako vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E7, E6, E1, E2 ter pozni beljakovini L2 in L1, verjetno pa tudi zapis za beljakovino E4, medtem ko je zapis za beljakovino E5 odsoten.

Genom HPV-150 vsebuje dve nekodirajoči področji, LCR, ki se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7371-350 bp, dolžina 416 bp), ter, za rod *Betapapillomavirus* značilno, zelo kratko nekodirajoče področje, ki se nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 4219-4269 bp, dolžina 51 bp). Nukleotidno zaporedje in različna karakteristična vezavna mesta področja LCR prikazuje slika 22.



Slika 21: Organizacija genoma HPV-150 (Kovanda in sod., 2011b). Genomske lokacije virusnih genov E6, E7, E1, E2, predvidenega E4, L2 in L1 so prikazane ob vsakem genu. Nekodirajoča področja so označena s črtkano črto.

Figure 21: Genomic organization of HPV-150 (Kovanda et al., 2011b) showing genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, putative E4, L1, L2, and the non-coding regions located between L1 and E6 (LCR); and E2 and L2 (dotted line).



Slika 22: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-150 (Kovanda in sod., 2011b). Genomske lokacije vezavnih mest za E2 (ACC-N₅₋₇-GGT), poliadenilacijskih mest (AATAAA) in TATA signalov (TATAAA ali TATA(A/T)A(A/T)) so prikazane nad kodirajočo verigo nukleotidnega zaporedja.

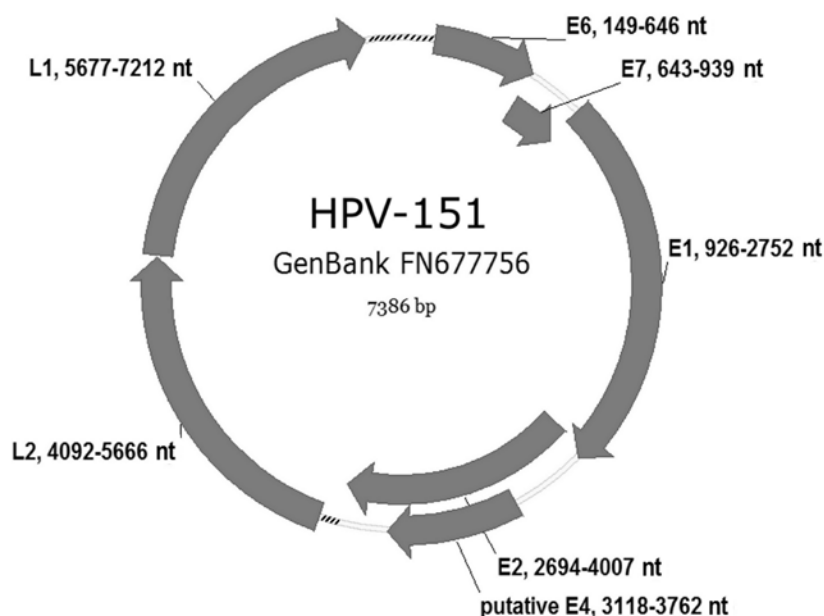
Figure 22: Characteristic features of the long control region of HPV-150 (Kovanda et al., 2011b), showing genomic locations of E2 binding sites (ACC-N₅₋₇-GGT), polyadenylation sites (AATAAA), and TATA signals (TATAAA or TATA(A/T)A(A/T)) above the coding DNA strand.

4.3.1.3 Organizacija genoma HPV-151

Celotni genom HPV-151 vsebuje 7386 bp in ima 39,79 % delež GC nukleotidov. Celotno nukleotidno zaporedje smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijsko oznako FN677756.

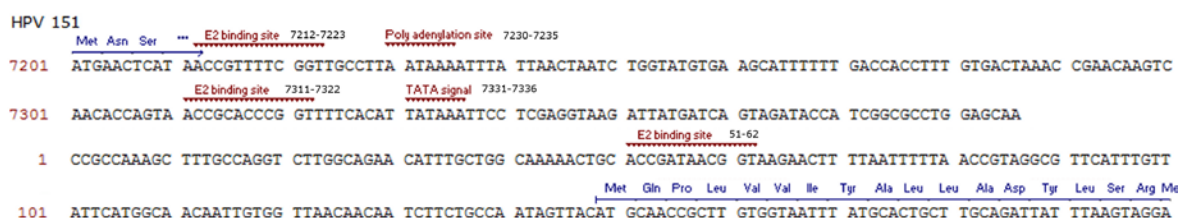
Določitev lokacije ORF oz. genov je pokazala, da je genom HPV-151 organiziran na način, ki je tipičen za rod *Betapapillomavirus* (slika 23). Genom HPV-151 tako vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E7, E6, E1, E2 ter pozni beljakovini L2 in L1, verjetno pa tudi zapis za beljakovino E4. Zapis za beljakovino E5 je odsoten.

Genom HPV-151 vsebuje tudi dve nekodirajoči področji. LCR se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7213-148 bp, dolžina 322 bp), medtem ko se drugo, zelo kratko nekodirajoče področje nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 4008-4091 bp, dolžina 84 bp). Nukleotidno zaporedje in različna karakteristična vezavna mesta področja LCR prikazuje slika 24.



Slika 23: Organizacija genoma HPV-151 (Kovanda in sod., 2011b). Genomske lokacije virusnih genov E6, E7, E1, E2, predvidenega E4, ter L2 in L1 so prikazane ob vsakem genu. Nekodirajoča področja so označena s črtkano črto.

Figure 23: Genomic organization of HPV-151 (Kovanda et al., 2011b), showing genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, putative E4, L1, L2 and the non-coding regions located between L1 and E6 (LCR); and E2 and L2 (dotted line).



Slika 24: Organizacija dolgega nekodirajočega področja pri HPV-151 (Kovanda in sod., 2011b). Genomske lokacije vezavnih mest za E2 (ACC-N₅₋₇-GGT), poliadenilacijskih mest (AATAAA) in TATA signalov (TATAAA ali TATA(A/T)A(A/T)) so prikazane nad kodirajočo verigo nukleotidnega zaporedja.

Figure 24: Characteristic features of the long control region of HPV-151 (Kovanda et al., 2011b), showing genomic locations of E2 binding sites (ACC-N₅₋₇-GGT), polyadenylation sites (AATAAA), and TATA signals (TATAAA or TATA(A/T)A(A/T)) above the coding DNA strand.

4.3.2 Značilnosti virusnih genov in beljakovin novih genotipov

4.3.2.1 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-125

Virusne gene E6, E7, E1, E2, L1 in L2 HPV-125 smo s pomočjo poravnave v parih (angl. *pair-wise alignment*) primerjali z ustreznimi geni sedmih genotipov vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus*, kamor se uvršča sam HPV-125. Odstotke podobnosti nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja med posameznimi geni in genotipi ponazarja preglednica 8.

Preglednica 8: Odstotki podobnosti med geni E6, E7, E1, E2, L1 in L2 HPV-125 in najbolj sorodnih genotipov HPV iz vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* (Kovanda in sod., 2011a)

Table 8: Percentage similarity between E6, E7, E1, E2, L1 and L2 of HPV-125 and closely related HPV genotypes from species 2 of *Alphapapillomavirus* (Kovanda et al., 2011a).

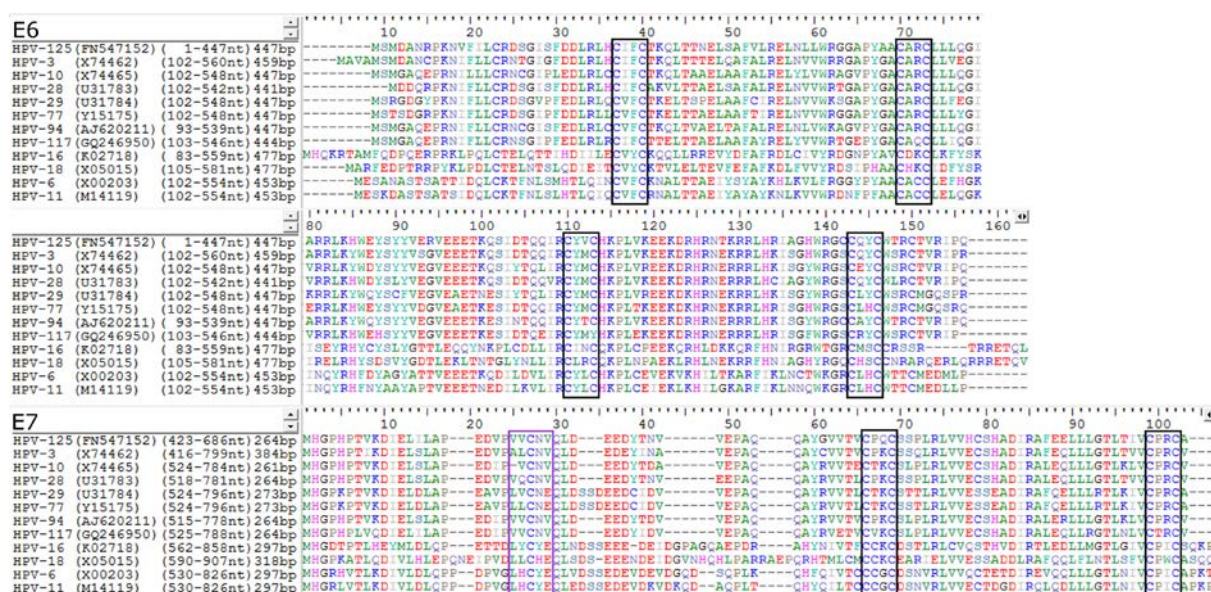
HPV-125	HPV-3	HPV-10	HPV-28	HPV-29	HPV-77	HPV-94	HPV-117
E6							
nt	84,8 ^a	79,9 ^a	83,2 ^a	71,8 ^a	76,7 ^a	80,8 ^a	77,9 ^a
aa	82,4	73,8	83,0	65,1	74,5	77,9	72,5
E7							
nt	90,2 ^a	86,4	90,9	81,0	81,0	89,4	86,4
aa	81,8	80,7	86,4	73,6	73,6	85,2	78,4
E1							
nt	88,6	81,0	86,0	80,9	80,1	80,6	80,9
aa	87,5	79,8	88,1	82,7	80,6	80,3	80,2
E2							
nt	86,4	77,8	84,3	75,0	75,7	78,7 ^a	79,7
aa	82,3	74,0	79,2	69,2	70,0	73,5	74,5
L1							
nt	85,4	80,0	83,9	74,4 ^a	74,3 ^a	79,3	80,3
aa	90,8	86,4	88,7	81,9	80,0	84,0	85,4
L2							
nt	85,6	79,9	82,9	74,8	75,0 ^a	75,0	76,7
aa	90,1	85,3	87,6	78,6	77,4	80,9	82,0

nt – nukleotidno zaporedje, aa – aminokislinsko zaporedje, ^a odprti bralni okvirji niso enake dolžine, podobnost smo računali od prvega skupnega ATG obeh genotipov.

nt – nucleic acid sequence, aa – amino acid sequence, ^a ORFs are not equal in length – similarity was calculated from the first common ATG of the two genotypes.

Primerjava nukleotidnih zaporedij poznih genov L1 in L2 ter zgodnjega gena E2 pri HPV-125 je pokazala največjo podobnost z ustrežajočimi geni HPV-3. Zgodnji gen E7 HPV-125 je, nasprotno, izkazoval večjo podobnost genu E7 HPV-28 kot genu E7 HPV-3, tako na nivoju nukleotidnega kot aminokislinskega zaporedja. Zgodnja gena E6 in E1 HPV-125 sta, zanimivo, na nivoju nukleotidnega zaporedja izkazovala najvišji nivo podobnosti z ustreznima genom HPV-3, medtem ko sta na nivoju aminokislinskega zaporedja izkazovala višji nivo podobnosti ustrezna gena HPV-28.

Računalniška oz. *in silico* analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-125 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 29 in 102, medtem ko E7 vsebuje eno tako domeno na mestu 50 (slika 25). Kot pri več drugih predstavnikih vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* je tipično zaporedje za vezavo pRb (LxCxE) odsotno tudi pri HPV-125.



Slika 25: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovin E6 in E7 HPV-125 z drugimi predstavniki vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* ter klinično pomembnimi sluzničnimi genotipi HPV-16, HPV-18, HPV-6 in HPV-11 (Kovanda in sod., 2011a). Črni okvirji prikazujejo mesta domen za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC), vijolični okvir pa prikazuje lokacijo pRb vezavnega mesta (LxCxE), odsotnega pri več predstavnikih vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus*.

Figure 25: Amino acid alignment of HPV-125 E6 and E7 proteins with corresponding proteins of closely related genotypes from *Alphapapillomavirus* species 2 and genotypes HPV-16, HPV-18, HPV-6 and HPV-11. (Kovanda et al., 2011). Black boxes indicate the location of zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CXXC) in both E6 and E7 amino acid alignments. The purple box indicates the location of the pRb-binding core sequence (LxCxE), absent in several *Alphapapillomavirus* species 2 genotypes.

Genom HPV-125, tako kot HPV-28, vsebuje približno 300 bp dolg ORF E4 na mestu 3215-3517, vendar se najverjetneje mRNA za E4 HPV-125 dejansko prepisuje iz procesirane, t.i. 'spliced' mRNA, vsebujoče prvih nekaj kodonov ORF E1, povezanih z ORF E4. Glede na primerjavo z drugimi, bolj podrobno opredeljenimi genotipi iz te skupine je zapis E1^ΔE4 HPV-125 verjetno sestavljen iz povezave genomskega pozicij 693-708 in 3237-3517 (slika 19).

4.3.2.2 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-150

Virusni geni so pri rodu *Betapapillomavirus*, kamor se uvršča HPV-150, doslej slabo raziskani in zanje še ni točno ugotovljeno, kako se prepisujejo in po prepisovanju procesirajo, zato smo se pri analizi HPV-150 omejili na beljakovini E6 in E7, ki sta najkrajši in poleg L1 najbolj opredeljeni pri sorodnih genotipih.

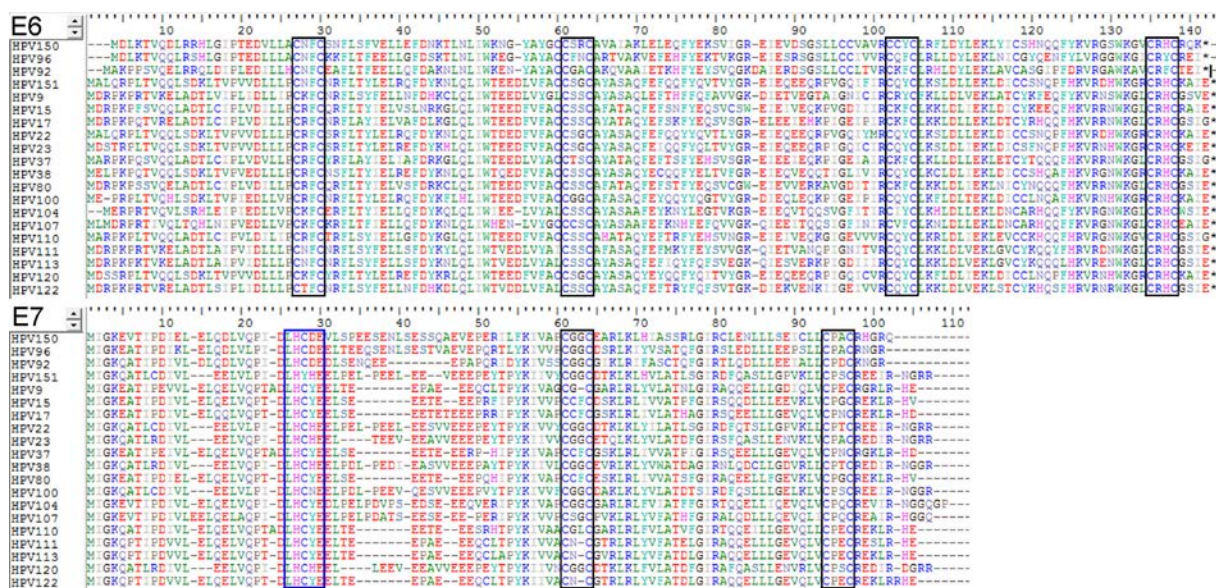
HPV-150 ima v enem najbolj ohranjenih virusnih genov L1 le 79,59 % podobnosti na nivoju nukleotidnega zaporedja z L1 najbolj sorodnega genotipa HPV-96. To je relativno nizek delež podobnosti, kar se tiče vrst pri HPV, zato ni gotovo, da se bo v nadaljnjih filogenetskih uvrščanjih HPV-150 uvrstil oz. ohranil znotraj virusne vrste 5 rodu *Betapapillomavirus*. Zaradi tega ni bila smiselna podrobna primerjava vseh virusnih genov, saj pri HPV-150 in HPV-96 ne gre za bližnje sorodne genotipe.

Računalniška oz. *in silico* analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-150 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 24 in 98, medtem ko vsebuje E7 eno tako domeno na mestu 59 (slika 26). Kot sorodna HPV-96 in HPV-92 tudi HPV-150 vsebuje tipično zaporedje za vezavo pRb (LxCxE) na aminokislinskem mestu 24.

4.3.2.3 Značilnosti virusnih genov in beljakovin HPV-151

Virusni geni so pri rodu *Betapapillomavirus*, kamor se uvršča HPV-151, za zdaj slabo raziskani in zanje še ni točno ugotovljeno kako se prepisujejo in po prepisovanju procesirajo, zato smo se pri analizi HPV-151 omejili na beljakovini E6 in E7, ki sta najkrajši in poleg L1 najbolj opredeljeni pri sorodnih genotipih.

Analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-151 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 27 in 101, medtem ko vsebuje E7 eno tako domeno na mestu 53 (slika 26). Za razliko od ostalih predstavnikov vrste 2 rodu *Betapapillomavirus* HPV-151 ne vsebuje tipičnega zaporedja za vezavo pRb (LxCxE) (slika 26). Morebitnega kliničnega pomena odsotnosti klasičnega vezavnega mesta za pRb pri HPV-151 na žalost v sklopu doktorske naloge nismo mogli ugotoviti, saj bi za to bile potrebne funkcionalne ekspresijske preiskave.



Slika 26: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovin E6 in E7 HPV-150 in HPV-151 z drugimi predstavniki vrst 2, 4 in 5 rodu *Betapapillomavirus* (Kovanda in sod., 2011b). Črni okvirji prikazujejo mesta domen za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC), modri okvir pa prikazuje lokacijo pRb vezavnega mesta (LxCxE).

Figure 26: Amino acid alignment of HPV-150 and HPV-151 E6 and E7 proteins with corresponding proteins of closely related genotypes from *Betapapillomavirus* species 2, 4 and 5 (Kovanda et al., 2011b). The locations of zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CxxC) are indicated by black boxes, and the location of the pRb-binding core sequence (LxCxE) is indicated with a blue box.

4.4 FILOGENETSKA UVRSTITEV NOVIH GENOTIPOV

4.4.3 Filogenetska uvrstitev HPV-125

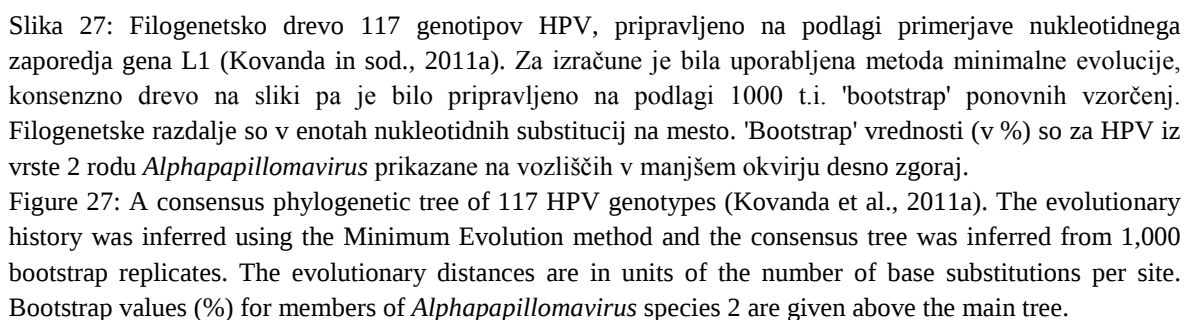
Na podlagi multiple poravnave L1 gena 117 HPV se HPV-125 filogenetsko uvršča v vrsto 2 virusnega rodu *Alphapapillomavirus* in je najbližje soroden genotipoma HPV-3 in HPV-28 (slika 27). Podrobna primerjava v parih med nukleotidnim in aminokislinskim zaporedjem gena L1 pa je pokazala, da je HPV-125 najbolj soroden HPV-3.

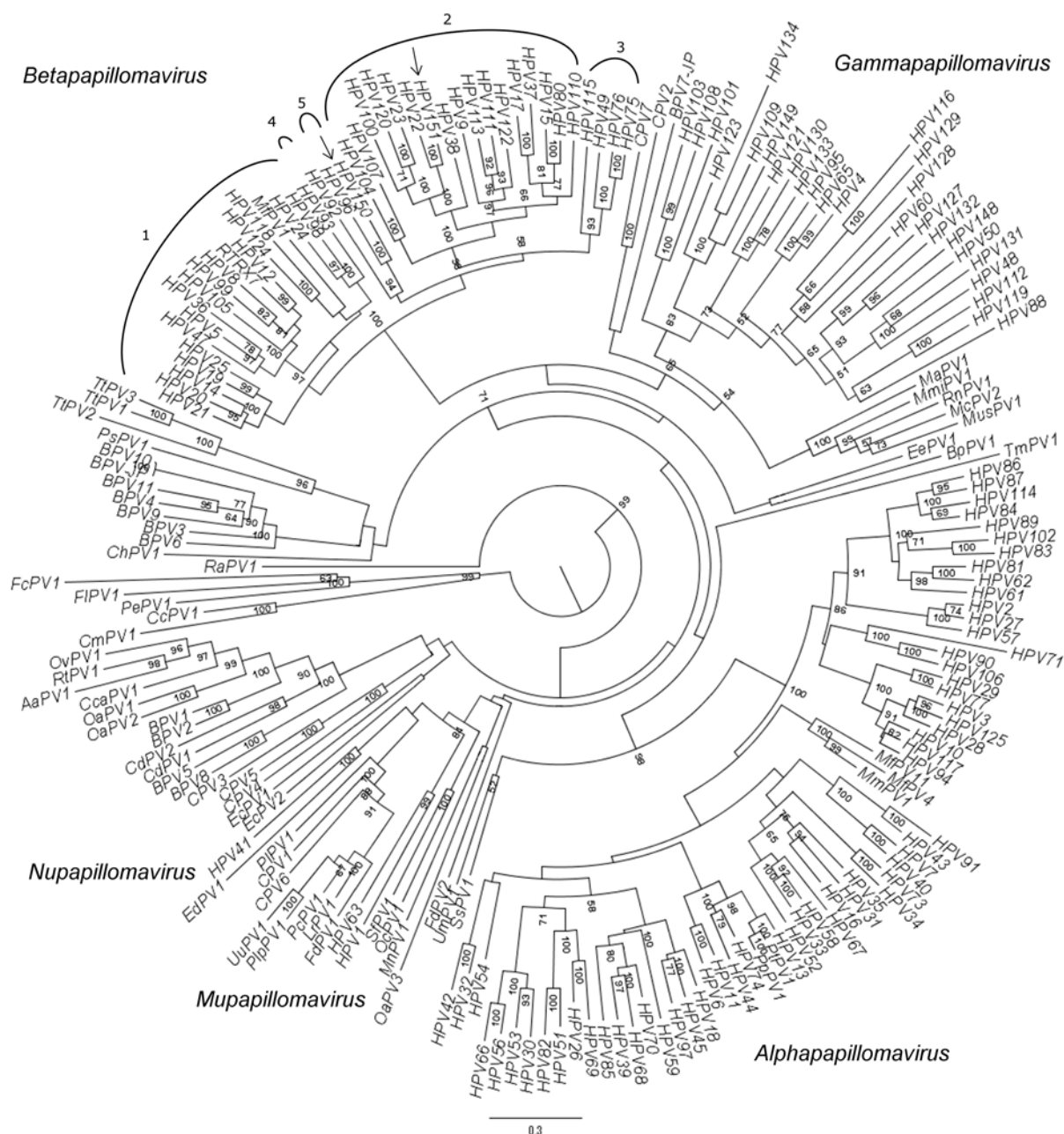
4.4.2 Filogenetska uvrstitev HPV-150

Po filogenetski analizi, izvedeni na podlagi poravnave gena L1 200 reprezentativnih genotipov PV (človeških in živalskih), se HPV-150 uvršča najbližje vrsti 5 (tipska vrsta HPV-96) znotraj rodu *Betapapillomavirus* (slika 28). Delež podobnosti med genoma L1 HPV-150 in HPV-96 na nivoju nukleotidov znaša 79,59 %, medtem ko je filogenetska razdalja med obema L1 (v substitucijah na mesto) 0,264440 na nivoju nukleotidov ter 0,103792 na nivoju aminokislinskega zaporedja.

4.4.3 Filogenetska uvrstitev HPV-151

Po filogenetski analizi, izvedeni na podlagi poravnave gena L1 200 reprezentativnih genotipov PV (človeških in živalskih), se HPV-151 uvršča znotraj vrste 2 znotraj rodu *Betapapillomavirus* (slika 28), najbližje genotipu HPV-22. Delež podobnosti med genoma L1 HPV-151 in HPV-22 na nivoju nukleotidov znaša 86,98 %, medtem ko je filogenetska razdalja med obema L1 (v substitucijah na mesto) 0,164208 na nivoju nukleotidov ter 0,084639 na nivoju aminokislinskega zaporedja.





Slika 28: Filogenetsko drevo 200 genotipov PV, pripravljeno na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja gena L1 (Kovanda in sod., 2011b). Za izračune je bila uporabljena metoda 'Maximum likelihood' (glej metode), konsenzno drevo na sliki pa je bilo pripravljeno na podlagi 1000 t.i. 'bootstrap' ponovnih vzorčenj. Filogenetske razdalje so v enotah nukleotidnih substitucij na mesto. 'Bootstrap' vrednosti (v %) so prikazane na vozliščih. Lokacijo HPV-150 in HPV-151 označuje puščica.

Figure 28: A consensus phylogenetic tree of 200 PV based on nucleotide sequences of the L1 gene (Kovanda et al., 2011b). The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method (see methods) and the consensus tree was inferred from 1,000 bootstrap replicates. The evolutionary distances are in units of the number of base substitutions per site. Bootstrap values (%) are shown next to the nodes. The location of HPV-150 and HPV-151 is shown by arrows.

4.5 REZULTATI EVALUACIJE KVANTITATIVNIH TIPSKO SPECIFIČNIH PCR V REALNEM ČASU

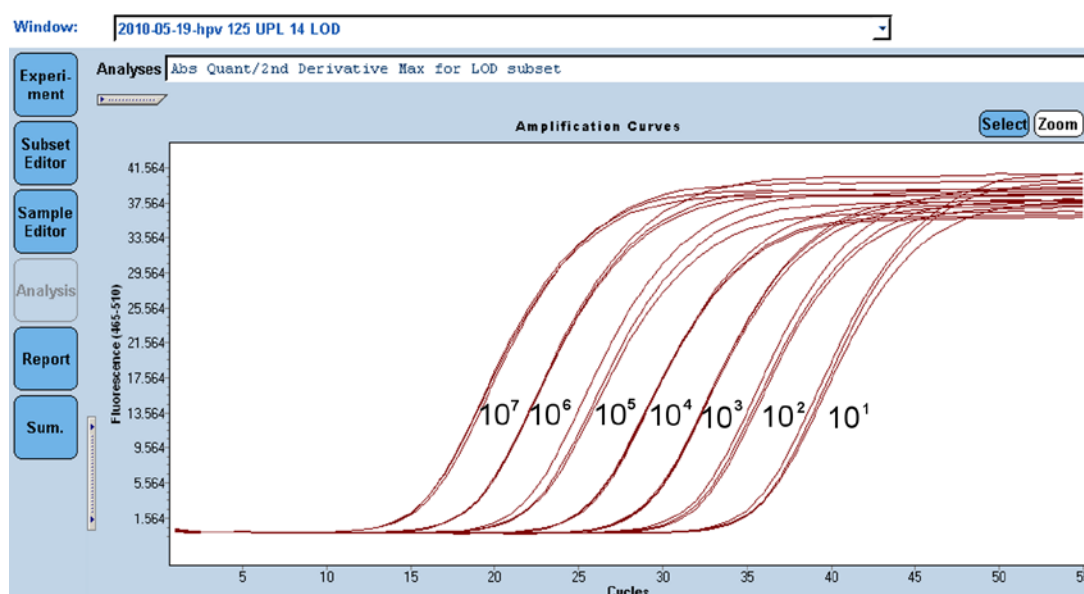
4.5.1 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-125 tipsko specifičnega PCR v realnem času

Evaluacija standardnih krivulj kvantitativnega HPV-125 tipsko specifičnega PCR v realnem času je pokazala odličen korelacijski koeficient (angl. *correlation coefficient*) ($R^2=1.00$) med Ct (angl. *Cycle threshold*) in logaritmom začetnega števila kopij virusa skozi vsaj 7 redov velikosti (slika 29).

Za kvantitativni HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času smo mejo detekcije s 95 % zanesljivostjo določili pri 2,5 virusnih kopijah/reakcijo (interval zaupanja 1,7-5,7).

Ponovljivost kvantitativnega HPV-125 tipsko specifičnega PCR v realnem času smo izrazili s pomočjo koeficienta variacije - CV (%). Koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi je pri 100 virusnih kopijah/reakcijo znašal 0,47 in 2,00. Pri 10 virusnih kopijah/reakcijo je koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi znašal 1,15 in 2,15.

Kvantitativni HPV-125 tipsko specifični PCR v realnem času ni pokazal navzkrižne reaktivnosti z nobenim od testiranih netarčnih genotipov HPV; HPV-2, HPV-3, HPV-7, HPV-10, HPV-27, HPV-28, HPV-29, HPV-40, HPV-43, HPV-77, HPV-78 in HPV-91.



Slika 29: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-125/reakcijo

Figure 29: Results of real-time PCR of Results of real-time PCR of triple serial dilutions ranging from 10^1 to 10^7 copies of the reference plasmid of HPV-125/per reaction.

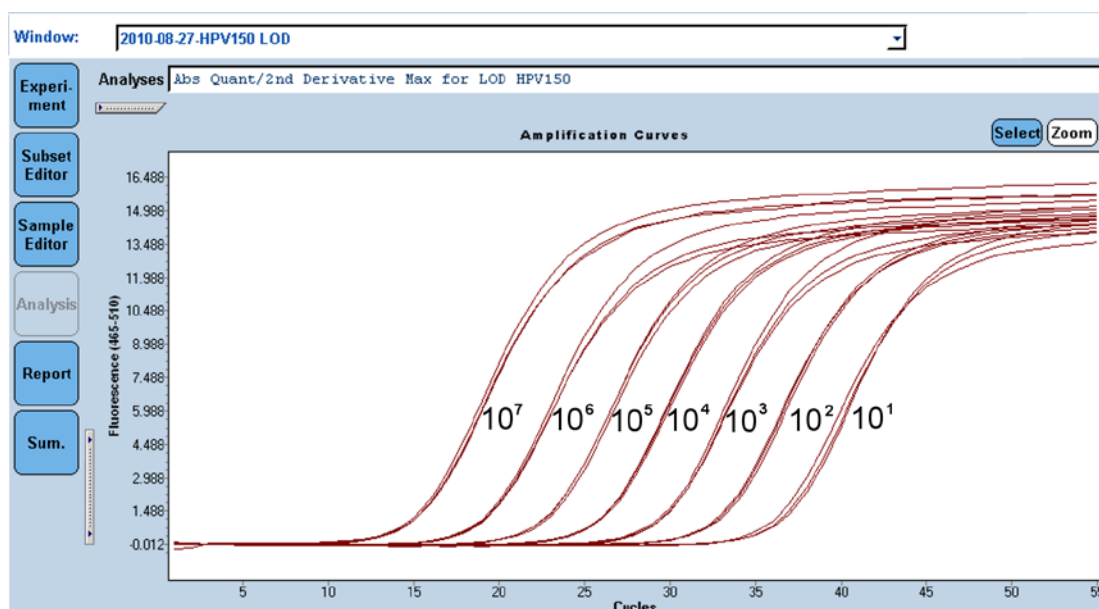
4.5.2 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-150 tipsko specifičnega PCR v realnem času

Evaluacija standardnih krivulj kvantitativnega HPV-150 tipsko specifičnega PCR v realnem času je pokazala odličen korelacijski koeficient ($R^2=1.00$) med Ct in logaritmom začetnega števila kopij virusa skozi vsaj 7 redov velikosti (slika 30).

Za kvantitativni HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času smo mejo detekcije s 95 % zanesljivostjo določili pri 7,3 virusnih kopijah/reakcijo (interval zaupanja 5,6-11,4).

Ponovljivost kvantitativnega HPV-150 tipsko specifičnega PCR v realnem času smo izrazili s pomočjo koeficienta variacije - CV (%). Koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi je pri 100 virusnih kopijah/reakcijo znašal 0,55 in 1,43. Pri 10 virusnih kopijah/reakcijo pa je koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi znašal 1,73 in 1,81.

Kvantitativni HPV-150 tipsko specifični PCR v realnem času ni pokazal navzkrižne reaktivnosti s testiranimi netarčnimi genotipi HPV; HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-38, HPV-80, HPV-92, HPV-96, HPV-100, HPV-111, HPV-113, HPV-120 in HPV-122.



Slika 30: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-150/reakcijo

Figure 30: Results of real-time PCR of triple serial dilutions ranging from 10^1 to 10^7 copies of the reference plasmid of HPV-150/per reaction.

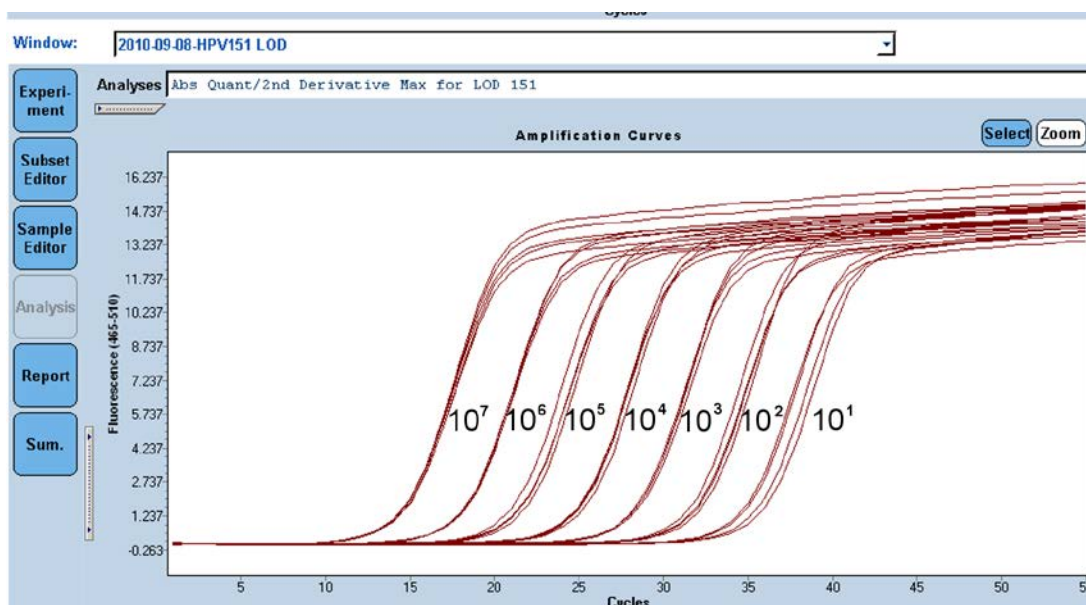
4.5.3 Rezultati evaluacije kvantitativnega HPV-151 tipsko specifičnega PCR v realnem času

Evaluacija standardnih krivulj kvantitativnega HPV-151 tipsko specifičnega PCR v realnem času je pokazala odličen korelacijski koeficient ($R^2=1.00$) med Ct in logaritmom začetnega števila kopij virusa skozi vsaj 7 redov velikosti (slika 31).

Za kvantitativni HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času smo mejo detekcije s 95 % zanesljivostjo določili pri 3,4 virusnih kopijah/reakcijo (interval zaupanja 2,5-6,0).

Ponovljivost kvantitativnega HPV-151 tipsko specifičnega PCR v realnem času smo izrazili s pomočjo koeficienta variacije - CV (%). Koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi je pri 100 virusnih kopijah/reakcijo znašal 0,81 in 1,54. Pri 10 virusnih kopijah/reakcijo je koeficient variacije (%) znotraj enega testiranja in med različnimi testiranjmi znašal 1,02 in 1,98.

Kvantitativni HPV-151 tipsko specifični PCR v realnem času ni pokazal navzkrižne reaktivnosti s testiranimi netarčnimi genotipi HPV; HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-38, HPV-80, HPV-92, HPV-96, HPV-100, HPV-111, HPV-113, HPV-120 in HPV-122.



Slika 31: Rezultati PCR v realnem času iz trojnih serijskih redčin od 10^1 do 10^7 kopij referenčnega plazmida HPV-151/reakcijo

Figure 31: Results of real-time PCR of triple serial dilutions ranging from 10^1 to 10^7 copies of the reference plasmid of HPV-151/per reaction.

4.6 REZULTATI TESTIRANJA KLINIČNIH VZORCEV NA PRISOTNOST NOVIH GENOTIPOV

Prisotnost novih genotipov v različnih kliničnih vzorcih smo testirali z uporabo pripravljenih kvantitativnih tipsko specifičnih PCR v realnem času. Klinični vzorci so bili izbrani tako, da so predstavljali najpogostejše s HPV povezane benigne in maligne kožne in sluznične spremembe. Kot kužnino, ki predstavlja izhodiščno prisotnost HPV pri zdravih osebah, pa smo izbrali dlačne mešičke.

4.6.1 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-125

Skupaj 601 vzorec, vključen v testiranje na prisotnost HPV-125, so sestavljali 260 vzorcev sluzničnih tkiv (104 vzorci raka materničnega vratu, 85 vzorcev papilomov grla, 71 vzorcev genitalnih bradavic), 203 vzorci kožnih tkiv (102 vzorca navadnih kožnih bradavic, 52 vzorcev ploščatoceličnega raka kože oz. SCC, 49 vzorcev bazalnoceličnega raka kože oz. BCC) in 138 dlačnih mešičkov. Rezultate testiranja prikazuje preglednica 9.

Preglednica 9: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-125 (Kovanda in sod., 2011a)

Table 9: Clinical samples tested for HPV-125 (Kovanda et al., 2011).

	Tip vzorca	Število vzorcev	Število (%) HPV-125 pozitivnih vzorcev
Sluznični vzorci			
	Genitalne bradavice	71	0 (0)
	Papilomi grla	85	0 (0)
	Rak materničnega vratu	104	0 (0)
Kožni vzorci			
	Navadne kožne bradavice	102	2 (2,0)
	Ploščatocelični rak kože, SCC	52	0 (0)
	Bazalnocelični rak kože, BCC	49	0 (0)
Dlačni mešički			
		138	1 (0,7)
Skupaj		601	3 (0,50)

Za HPV-125 pozitivne vzorce smo poiskali podatke o starosti in spolu bolnikov ter vzorcem določili število kopij virusa glede na število humanih celic in prisotnost drugih genotipov HPV. Lastnosti HPV-125 pozitivnih vzorcev prikazuje preglednica 10.

Preglednica 10: Lastnosti HPV-125 pozitivnih vzorcev in bolnikov (Kovanda in sod., 2011a)

Table 10: Properties of HPV-125 positive samples and patients (Kovanda et al., 2011a).

Tip vzorca	Histološka oznaka	Starost bolnika	Spol bolnika	Št. virusnih genomov/ št. humanih celic	Prisotnost drugih HPV
Navadna kožna bradavica	<i>Verruca vulgaris</i>	19	Moški	2,61 x10 ³ /1	HPV-8, HPV-22
Navadna kožna bradavica	<i>Verruca vulgaris</i>	24	Moški	1,28 x10 ⁹ /1	Ne
Dlačni mešiček	/	29	Moški	/	HPV-10, HPV-36

Vsi HPV-125 pozitivni vzorci so bili odvzeti imunokompetentnim osebam. Za dlache mešičke števila virusnih genomov/št. humanih celic nismo določali.

All HPV-125 positive samples were obtained from immuno-competent individuals. The viral load was not determined for hair follicle samples.

4.6.2 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-150

V testiranje na HPV-150 in HPV-151, ki je potekalo sočasno, smo vključili 540 vzorcev; 100 vzorcev raka materničnega vratu, 78 vzorcev papilomov grla, 71 vzorcev genitalnih bradavic, 101 vzorec navadnih kožnih bradavic, 52 vzorcev SCC, 49 vzorcev BCC in 89 vzorcev dlčnih mešičkov. Rezultate testiranja prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-150

Table 11: Clinical samples tested for HPV-150.

	Tip vzorca	Število vzorcev	Število (%) HPV-150 pozitivnih vzorcev
Sluznični vzorci			
	Genitalne bradavice	71	0 (0)
	Papilomi grla	78	0 (0)
	Rak materničnega vratu	100	0 (0)
Kožni vzorci			
	Navadne kožne bradavice	101	4 (4,0)
	Ploščatocelični rak kože, SCC	52	3 (5,8)
	Bazalnocelični rak kože, BCC	49	1 (2,0)
Dlačni mešički			
		89	3 (3,4)
Skupaj		540	11 (2,0)

Za HPV-150 pozitivne vzorce smo poiskali podatke o starosti in spolu bolnikov ter vzorcem določili število kopij virusa glede na število humanih celic in prisotnost drugih genotipov HPV. Lastnosti HPV-150 pozitivnih vzorcev prikazuje preglednica 12.

Preglednica 12: Lastnosti HPV-150 pozitivnih vzorcev in bolnikov

Table 12: Properties of HPV-150 positive samples and patients.

Tip vzorca	Št. vzorca	Histološka oznaka	Starost bolnika	Spol bolnika	Št. virusnih genomov/ št. humanih celic	Prisotnost drugih HPV
Kožni vzorec	1	<i>Verruca vulgaris</i>	15	Moški	1/15	HPV-27
Kožni vzorec	2	<i>Verruca vulgaris</i>	81	Ženska	1/212	HPV-5, HPV-14, HPV-15
Kožni vzorec	3	<i>Verruca vulgaris</i>	90	Moški	1/31	Ne
Kožni vzorec	4	<i>Verruca vulgaris</i>	16	Moški	1/12	HPV-5
Kožni vzorec	5	Ploščatocelični rak kože, SCC	82	Moški	1/57950	Ne
Kožni vzorec	6	Ploščatocelični rak kože, SCC	80	Moški	1/9508	HPV-151, HPV-37
Kožni vzorec	7	Ploščatocelični rak kože, SCC	86	Moški	1/140	HPV-8, HPV-75
Kožni vzorec	8	Bazalnocelični rak kože, BCC	81	Ženska	1/22638	HPV-151
Dlačni mešiček	9	/	29	Moški	/	HPV-6, HPV-8, HPV-9, HPV-17, HPV-21
Dlačni mešiček	10	/	27	Moški	/	Ne
Dlačni mešiček	11	/	52	Ženska	/	HPV-8, HPV-14, HPV-38, HPV-93

Za dlačne mešičke števila virusnih genomov/št. humanih celic nismo določali.

The viral load was not determined for hair follicle samples.

Rezultate testiranja dlačnih mešičkov pri 29-letnem moškem, za katerega smo imeli na razpolago 28 vzorcev dlačnih mešičkov, v enem letu sedemkrat odvzetih s štirih različnih anatomskih mest, prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Rezultati testiranja dlačnih mešičkov na HPV-150, v enem letu odvzetih s štirih mest iste osebe

Table 13: Results of HPV-150 testing of hair follicles obtained during one year from four anatomical sites of one individual.

Odvzem	Mesto odvzema dlačnega mešička			
	obrvi	penis	skrotum	analne dlake
1.	+	+	+	-
2.	+	-	-	-
3.	+	+	-	-
4.	+	-	-	-
5.	+	-	-	-
6.	+	-	-	-
7.	+	-	+	-

+, HPV-150 je prisoten, - HPV-150 ni prisoten.

+, HPV-150 positive, - HPV-150 negative.

4.6.3 Rezultati testiranja kliničnih vzorcev na prisotnost HPV-151

V testiranje na HPV-151, smo tako kot za testiranje HPV-151, vključili 540 vzorcev; 100 vzorcev raka materničnega vratu, 78 vzorcev papilomov grla, 71 vzorcev genitalnih bradavic, 101 vzorec navadnih kožnih bradavic, 52 vzorcev SCC, 49 vzorcev BCC in 89 vzorcev dlačnih mešičkov. Rezultate testiranja prikazuje preglednica 14.

Preglednica 14: Klinični vzorci, testirani na prisotnost HPV-151

Table 14: Clinical samples tested for HPV-151.

	Tip vzorca	Število vzorcev	Število (%) HPV-151 pozitivnih vzorcev
Sluznični vzorci			
	Genitalne bradavice	71	0 (0)
	Papilomi grla	78	0 (0)
	Rak materničnega vratu	100	0 (0)
Kožni vzorci			
	Navadne kožne bradavice	101	4 (4,0)
	Ploščatocelični rak kože, SCC	52	1 (1,9)
	Bazalnocelični rak kože, BCC	49	3 (6,1)
Dlačni mešički			
		89	2 (2,2)
Skupaj		540	10 (1,9)

Za HPV-151 pozitivne vzorce smo poiskali podatke o starosti in spolu bolnikov ter vzorcem določili število kopij virusa glede na število humanih celic in prisotnost drugih genotipov HPV. Lastnosti HPV-151 pozitivnih vzorcev prikazuje preglednica 15.

Preglednica 15: Lastnosti HPV-151 pozitivnih vzorcev in bolnikov

Table 15: Properties of HPV-151 positive samples and patients.

Tip vzorca	Št. vzorca	Histološka oznaka	Starost bolnika	Spol bolnika	Št. virusnih genomov/ št. humanih celic	Prisotnost drugih HPV
Kožni vzorec	12	<i>Verruca vulgaris</i>	67	Moški	1/19	HPV-9, HPV-93
Kožni vzorec	13	<i>Verruca vulgaris</i>	76	Moški	1/439	Ne
Kožni vzorec	14	<i>Verruca vulgaris</i>	55	Ženska	1/168	HPV-19, HPV-36, HPV-49
Kožni vzorec	15	<i>Verruca vulgaris</i>	74	Ženska	1/103	Ne
Kožni vzorec	6	Ploščatocelični rak kože, SCC	80	Moški	1/1994	HPV-150, HPV-37
Kožni vzorec	16	Bazalnocelični rak kože, BCC	84	Ženska	1/691	Ne
Kožni vzorec	17	Bazalnocelični rak kože, BCC	84	Ženska	1/39	HPV-21, HPV-36, HPV-24
Kožni vzorec	8	Bazalnocelični rak kože, BCC	81	Ženska	1/113	HPV-150
Dlačni mešiček	18	/	26	Moški	/	HPV-5, HPV-19, HPV-21, HPV-22, HPV-24, HPV-38, HPV-93
Dlačni mešiček	19	/	33	Moški	/	HPV-23, HPV-93

Za dlačne mešičke števila virusnih genomov/št. humanih celic nismo določali.

The viral load was not determined for hair follicle samples.

4.6.4 Delna opredelitev kandidatnega izolata za novi genotip SI-HPV-Beta5

Pri testiranju kliničnih vzorcev na nove genotipe HPV-125, HPV-150 in HPV-151 smo pri potrjevanju prisotnosti HPV-150 naleteli na kandidatni izolat za nov genotip. Izolatu, ki smo ga poimenovali SI-HPV-Beta5, smo določili 354 bp dolgo nukleotidno zaporedje in ga deponirali v zbirko GenBank pod identifikacijsko oznako FR822732. V izolatu smo dodatno dokazali tudi prisotnost genotipa HPV-9 iz vrste 2 rodu *Betapapillomavirus*. Primerjava pridobljenega nukleotidnega zaporedja SI-HPV-Beta 5 s preostalimi genotipi HPV je pokazala, da ima 354 bp dolgo delno zaporedje kandidatnega izolata 90,68 % podobnosti z ustreznim odsekom L1 gena HPV-150.

5 RAZPRAVA

Opređeljevanje vsakega novega genotipa HPV izboljšuje naše razumevanje filogenetske raznolikosti znotraj virusnih rodov, posebej pomembni pa so tisti genotipi, za katere se izkaže, da imajo klinični pomen. V raziskovanju patogeneze HPV je tako določanje kliničnega pomena novih genotipov pomemben prvi korak, ki vodi v izboljšano diagnostiko in obravnavo bolnikov. S testiranjem kliničnih vzorcev smo si prizadevali ugotoviti klinični pomen treh novih genotipov HPV, na katerega bi lahko sklepali na podlagi njihove filogenetske uvrstitve.

5.1 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-125

5.1.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-125

HPV-125 se filogenetsko uvršča v vrsto 2 virusnega rodu *Alphapapillomavirus*, kamor se uvrščajo še genotipi HPV-3, HPV-10 (tipska vrsta), HPV-28, HPV-29, HPV-77, HPV-78, HPV-94 in HPV-117.

Na podlagi multiple poravnave L1 gena 117 HPV in podrobne primerjave v parih (angl. *pair-wise alignment*) med nukleotidnim in aminokislinskim zaporedjem gena L1 med predstavniki vrste 2 virusnega rodu *Alphapapillomavirus* je HPV-125 najbolj soroden HPV-3.

Glede na primerjavo različnih genov znotraj vrste 2 virusnega rodu *Alphapapillomavirus* pa je HPV-125 najbolj soroden genotipoma HPV-3 in HPV-28 (slika 27, preglednica 8), kar lahko odraža bodisi rekombinacijo bodisi različno evolucijo zgodnjih in poznih genov pri obeh genotipih od njihovega zadnjega skupnega prednika.

Za razliko od večine HPV vrst znotraj virusnega rodu *Alphapapillomavirus*, za katere je značilen sluznični tropizem, imajo predstavniki vrste 2 izrazito kožni tropizem (Kremsdorf in sod., 1983; Jabłońska in sod., 1985; Favre in sod., 1989a; 1989b; Shamanin in sod., 1994b; Delius in sod., 1998; Köhler in sod., 2010).

Genotipa HPV-3 in HPV-10, ki sta bila med prvimi opredeljenimi genotipi HPV, sta bila prvič izolirana iz ostružkov kože, ki so spominjali na ploščate bradavice pri bolnikih z genetsko boleznijo *epidermodysplasia verruciformis* (Kremsdorf in sod., 1983), kasneje pa so ju povezali še s ploščatimi bradavicami pri imunokompromitiranih bolnikih in imunokompetentnih osebah (Jabłońska in sod., 1985). HPV-28 so prvič našli pri primeru

t.i. bradavic mesarjev (angl. *butcher's warts*) (Favre in sod., 1989a), medtem ko so HPV-29 prvič našli v navadni kožni bradavici (Favre in sod., 1989b). HPV-77 so prvič izolirali iz navadne kožne bradavice, vendar so ga naknadno ugotovili še pri več primerih displastičnih bradavic in ploščatoceličnega raka kože pri bolnikih po transplantaciji ledvic (Delius in sod., 1998). HPV-94 (DL40) je bil prav tako izoliran iz malignega kožnega tumorja pri bolniku po transplantaciji ledvic (de Villiers in sod., 1997). HPV-117 je bil izoliran iz navadne kožne bradavice bolnika po transplantaciji, pri katerem so dokazali tudi 24 mesečno perzistenco tega virusa (Köhler in sod., 2010).

Glede na dosedanje podatke lahko sklepamo, da je vrsta 2 rodu *Alphapapillomavirus* povezana predvsem s ploščatimi in navadnimi kožnimi bradavicami pri imunokompetentnih osebah, medtem ko imajo določeni genotipi potencial za povzročanje maligne transformacije pri imunokompromitiranih bolnikih. S testiranjem kliničnih vzorcev smo želeli preveriti, ali enako velja tudi za HPV-125.

5.1.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-125

Ker filogenetski odnosi med genotipi HPV ne odražajo vedno tudi njihovega kliničnega pomena, smo prisotnost HPV-125 preverjali pri 601 kliničnem vzorcu. Testirani vzorci so bili izbrani tako, da so bile zastopane najpogostejše benigne sluznične (genitalne bradavice, papilomi grla) in kožne (navadne kožne bradavice) ter maligne sluznične (rak materničnega vratu) in kožne (BCC in SCC) spremembe, povezane s HPV. Izhodiščno prisotnost HPV pri zdravih osebah smo preverjali s testiranjem dlačnih mešičkov.

HPV-125 je bil prisoten v treh (0,5 %) od skupaj 601 vzorca, kar kaže na to, da gre za relativno redek genotip. HPV-125 smo dokazali pri enem vzorcu od 138 testiranih dlačnih mešičkov. Ta vzorec je dodatno vseboval genotipa HPV-10 in HPV-36, kar se sklada s trenutnimi dognanji o tem, da so HPV ubikvitarno prisotni v dlačnih mešičkih kože pri imunokompetentnih osebah, kjer tvorijo virusni rezervoar. Verjetno je HPV-125, podobno kot drugi predstavniki vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus*, prisoten bolj pogosto pri imunokompromitiranih bolnikih, vendar to zahteva nadaljnje raziskave.

HPV-125 nismo dokazali pri nobenem od 260 sluzničnih vzorcev (preglednica 9), kar nakazuje, da tako kot ostali predstavniki vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* HPV-125 ne izkazuje sluzničnega tropizma.

HPV-125 smo dokazali pri dveh (2,0 %) od 102 testiranih vzorcev navadnih kožnih bradavic, kar nakazuje, da ima novi genotip kožni tropizem. Pri prvem vzorcu (preglednica 10) zaradi prisotnosti HPV-8 in HPV-22 iz rodu *Betapapillomavirus*, ki sta znana kožna genotipa, nismo mogli dokončno zaključiti, da je to bradavico povzročil HPV-125, čeprav

se je v bradavici nahajal v visoki koncentraciji. V drugem vzorcu z uporabo več različnih testov za genotipizacijo HPV nismo mogli ugotoviti prisotnosti nobenega drugega genotipa HPV, zato lahko z večjo gotovostjo sklepamo, da je bil za nastanek bradavice odgovoren prav HPV-125. Tudi v tem primeru je imel HPV-125 visoko virusno breme, kar kaže na prisotnost produktivne okužbe.

HPV-125 nismo dokazali pri nobenem od 101 testiranega malignega kožnega tumorja, kar je lahko posledica bodisi odsotnosti potenciala za maligno transformacijo pri HPV-125 bodisi redkosti tega genotipa pri imunokompetentnih osebah. Rezultati, ki smo jih pridobili, kažejo, da HPV-125 verjetno ni eden od pomembnih genotipov HPV, povezanih z nemelanomskim kožnim rakom (angl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC). Kljub temu ravno zaradi redkosti genotipa in majhnega števila testiranih vzorcev ne moremo povsem izključiti možnosti, da HPV-125 lahko prispeva k nastanku malignih kožnih lezij pri imunokompromitiranih bolnikih.

5.2 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-150

5.2.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-150

HPV-150 smo na podlagi filogenetske analize uvrstili v rod *Betapapillomavirus*, najbližje genotipu HPV-96. HPV-96, ki je doslej edini predstavnik vrste 5 rodu *Betapapillomavirus*, je bil prvič izoliran iz kožnega SCC (Vasiljević in sod., 2007), drugi najbolj sorodni genotip, HPV-92, ki je doslej edini znani predstavnik vrste 4 rodu *Betapapillomavirus*, pa je bil prvič izoliran iz kožnega BCC (Forslund in sod., 2003). Glede na prisotnost tako HPV-96 kot HPV-92 v malignih kožnih spremembah je mogoče, da je imel skupni prednik vseh treh genotipov določen potencial za maligno transformacijo.

5.2.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-150

Ker v zvezi s kliničnim pomenom genotipov, najbolj sorodnih HPV-150, obstaja veliko neznank, smo klinični pomen HPV-150 poskušali določiti s testiranjem 540 vzorcev, izbranih tako, da so bile zastopane najpogostejše benigne sluznične (genitalne bradavice in papilomi grla) in kožne (navadne kožne bradavice) ter maligne sluznične (rak materničnega vratu) in kožne (BCC in SCC rak kože) spremembe, povezane s HPV. Izhodiščno prisotnost HPV pri zdravih osebah smo, tako kot pri HPV-125, preverjali s testiranjem dlačnih mešičkov.

HPV-150 je bil dokazan pri 11 (2,0 %) od skupaj 540 kliničnih vzorcev (preglednica 11), kar kaže, da gre za redek genotip. Prisoten je bil pri treh (3,4 %) od 89 vzorcev dlačnih mešičkov, kar kaže, da je prisoten pri imunokompetentnih osebah kot del naravne virusne 'flore'.

Prisotnost dolgotrajne HPV okužbe oz. perzistenca naj bi bila ključna za razvoj sluzničnih malignih sprememb, povezanih s HPV, njena vloga v razvoju malignih kožnih sprememb pa še ni popolnoma razjasnjena (Berkhout in sod., 2000; Boukamp, 2005; Orth, 2005; Purdie in sod., 2005; Weissenborn in sod., 2005). Da bi ugotovili, ali je HPV-150 sposoben povzročiti dolgotrajno okužbo, smo testirali 28 vzorcev dlačnih mešičkov, v enem letu odvzetih 29-letnemu imunokompetentnemu moškemu s štirih mest. Na dveh testiranih mestih, dlačnih mešičkih, odvzetih s predela penisa, in dlačnih mešičkih odvzetih s skrotuma, smo HPV-150 lahko dokazali samo pri dveh od sedmih obiskov, medtem ko prisotnosti HPV-150 v dlačnih mešičkih, odvzetih iz okolice predela anusa, nismo dokazali. Prisotnost HPV-150 pa smo dokazali pri vseh sedmih vzorcih, odvzetih iz obrvi, in tako potrdili, da HPV-150 lahko povzroči perzistentno okužbo, vendar, podobno kot pri ostalih okužbah s HPV iz rodu *Betapapillomavirus* pri imunokompetentnih osebah, pri testiranem moškemu nismo dokazali nobenih kožnih lezij, povezanih s tem genotipom.

Prisotnosti HPV-150 nismo dokazali pri nobenem od 249 sluzničnih vzorcev (preglednica 11), kar nakazuje, da tako kot velika večina drugih predstavnikov rodu *Betapapilomavirus* tudi HPV-150 ne izkazuje sluzničnega tropizma.

HPV-150 smo dokazali pri štirih (4,0 %) od 101 testiranega vzorca navadnih kožnih bradavic, kar nakazuje, da ima novi genotip kožni tropizem. Trije od HPV-150 pozitivnih vzorcev navadnih kožnih bradavic (preglednica 12, vzorci 1, 2 in 4) so dodatno vsebovali vsaj en drug genotip HPV: HPV-27 iz vrste 4 rodu *Alphapapillomavirus*; HPV-5 in HPV-14 iz vrste 1 rodu *Betapapilomavirus*; ter HPV-15 iz vrste 2 rodu *Betapapilomavirus*. HPV-27 je genotip, ki je znan povzročitelj navadnih kožnih bradavic, medtem ko so genotipi HPV-5, HPV-14 in HPV-15 povezani z razvojem kožnih tumorjev pri imunokompromitiranih bolnikih ali bolnikih z *epidermodysplasia verruciformis*, tako da razvoja teh treh bradavic nismo mogli pripisati HPV-150. Nasprotno v četrti, HPV-150 pozitivni navadni kožni bradavici (preglednica 12, vzorec 3) nismo dokazali prisotnosti drugih genotipov HPV, kar nakazuje na možnost, da je bil HPV-150 udeležen pri razvoju te bradavice. Čeprav je bilo virusno breme HPV-150 v vzorcu 3 nizko (1/31 virusnih genomov/št. humanih celic), se ta količina sklada z nedavnimi dognanji o patogenezi genotipov iz rodu *Betapapilomavirus*. Tako naj bi bilo virusno breme predstavnikov rodu *Betapapilomavirus*, povezanih z navadnimi kožnimi bradavicami, bistveno nižje (1/2 do 1/10 000 virusnih genomov/št. humanih celic) kot virusno breme pri predstavnikih rodu *Alphapapillomavirus* (Köhler in sod., 2009). Kljub temu bodo za potrditev povezave med HPV-150 in razvojem navadnih kožnih bradavic potrebne dodatne raziskave.

Prisotnost HPV-150 smo dokazali pri štirih (4,0 %) od 101 testiranega malignega tumorja kože, kar smo lahko pričakovali glede na filogenetsko uvrstitev HPV-150, vendar pa smo pri treh od HPV-150 pozitivnih vzorcev dokazali še dodatne genotipe HPV (preglednica 12, vzorci 6, 7, 8). Dodatno prisotni genotipi so bili HPV-8, HPV-37 in HPV-75, ki se uvrščajo v vrste 1, 2 in 3 rodu *Betapapillomavirus*, pri dveh vzorcih pa je bil dodatno prisoten še novo opredeljeni genotip HPV-151. HPV-8, HPV-37 in HPV-75 imajo kožni tropizem in so bili najdeni v različnih kožnih spremembah, medtem ko pomen HPV-151 ni dokončno razjasnjen, kar izjemno oteži sklepanje o kliničnem pomenu HPV-150.

Zanimivo je, da sta bila v enem vzorcu SCC (preglednica 12, preglednica 13, vzorec 6) in enem vzorcu BCC (preglednica 12, preglednica 13, vzorec 8) prisotna tako HPV-150 kot HPV-151. V obeh kožnih rakih je bila koncentracija HPV-150 bistveno nižja od koncentracije HPV-151, vendar bi to lahko bilo naključje.

Interpretacijo prisotnosti HPV-150 v malignih tumorjih dodatno otežujejo naravne razlike v virusnem bremenu med abortivno okužbo, ki vodi v maligno transformacijo kože, in produktivno infekcijo kože, ki vodi v nastanek benignih tumorjev, kot so navadne kožne bradavice. Tako je za abortivno okužbo, povzročeno s strani genotipov HPV iz rodu *Betapapillomavirus*, tipična prisotnost teh HPV v izjemno majhni količini (Berkhout in sod., 2000; Orth, 2005; Purdie in sod., 2005; Weissenborn in sod., 2005; Vasiljević in sod., 2007), medtem ko so za produktivno okužbo kože značilne bistveno višje koncentracije virusa (Köhler in sod., 2009). Zaradi tovrstnih bioloških razlik je skoraj nemogoče ločiti genotipe HPV, ki so povzročitelji, od tistih, ki so t.i. potniki ali 'passenger' genotipi in so na leziji ali njeni okolici prisotni bodisi kot kontaminanta bodisi kot naravna virusna 'flora' (Orth, 2005). Tako čeprav smo HPV-150 kot edini prisotni genotip dokazali pri enem primeru kožnega SCC (preglednica 12, vzorec 5), zaradi zelo nizkega virusnega bremena (1/57950 virusnih genomov/št. humanih celic) nismo mogli zanesljivo zaključiti, da je HPV-150 povzročitelj te maligne spremembe. Dokončen odgovor na to vprašanje zahteva nadaljnje raziskave.

5.3 FILOGENETSKA UVRSTITEV IN KLINIČNI POMEN HPV-151

5.3.1 Filogenetska uvrstitev novega genotipa HPV-151

HPV-151 se uvršča v vrsto 2 rodu *Betapapillomavirus*, ki s 17 genotipi (HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-39, HPV-80, HPV-100, HPV-104, HPV-107, HPV-110, HPV-111, HPV-113, HPV-120, HPV-122 in HPV-151) predstavlja eno največjih in najbolj klinično raznolikih vrst znotraj PV. Vrsta 2 rodu *Betapapillomavirus* lahko služi kot dober primer nastanka več evolucijskih duplikacij znotraj gostitelja (angl. *intra-host duplication*), ki kažejo več možnih načinov prilagoditve na gostitelja, saj so genotipe iz te vrste našli pri različnih spremembah, od makul in benignih kožnih lezij do aktinične keratoze, BCC in SCC, nekatere predstavnike te vrste, npr. HPV-100 (de Villiers in Gunst, 2009), pa so našli celo v karcinomih glave, vratu in požiralnika.

5.3.2 Klinični pomen novega genotipa HPV-151

Ker filogenetske odnose med genotipi HPV znotraj vrste 2 rodu *Betapapillomavirus* težko neposredno povežemo z njihovim kliničnim pomenom, smo prisotnost HPV-151 preverjali pri 540 kliničnih vzorcih, ki so bili izbrani tako, da so bile zastopane najpogostejše benigne sluznične (genitalne bradavice in papilomi grla) in kožne (navadne kožne bradavice) ter maligne sluznične (rak materničnega vratu) in kožne (BCC in SCC) spremembe, povezane s HPV, izhodiščno prisotnost HPV pri zdravih osebah pa smo preverjali s testiranjem dlačnih mešičkov.

HPV-151 smo dokazali pri 10 (1,9 %) od skupaj 540 kliničnih vzorcev (preglednica 14), kar kaže, da gre tako kot pri HPV-150 za redek genotip HPV. Pri imunokompetentnih osebah je bil prisoten v dveh (3,4 %) od 89 vzorcev dlačnih mešičkov, kar nakazuje, da bi lahko bil prisoten tudi kot del naravne virusne 'flore'.

Prisotnosti HPV-151 nismo dokazali pri nobenem od 249 sluzničnih vzorcev (preglednica 14), kar nakazuje, da HPV-151 tako kot večina ostalih predstavnikov vrste 2 rodu *Betapapillomavirus* ne izkazuje sluzničnega tropizma.

Pri vzorcih navadnih kožnih bradavic smo prisotnost HPV-151 dokazali pri štirih (4,0 %) od 101 vzorca, kar nakazuje, da ima genotip kožni tropizem (preglednica 14). Pri dveh od HPV-151 pozitivnih vzorcev navadnih kožnih bradavic smo dokazali prisotnost vsaj enega dodatnega genotipa iz rodu *Betapapillomavirus* (preglednica 15, vzorca 12 in 14). Dokazali smo prisotnost naslednjih genotipov: HPV-9, HPV-19, HPV-36, HPV-49 in

HPV-93. HPV-9 predstavlja tipski genotip vrste 2 rodu *Betapapillomavirus*, medtem ko se genotipi HPV-19, HPV-36 in HPV-93 uvrščajo v vrsto 1 rodu *Betapapillomavirus*, genotip HPV-49 pa se uvršča v vrsto 3 rodu *Betapapillomavirus*. Ker imajo vsi omenjeni genotipi kožni tropizem in so povezani z razvojem različnih kožnih tumorjev pri imunokompromitiranih bolnikih ali bolnikih z boleznijo *epidermodysplasia verruciformis*, HPV-151 nismo mogli etiološko povezati z nastankom omenjenih bradavic. Nasprotno pa bi lahko bil HPV-151 vsaj delno odgovoren za nastanek preostalih dveh navadnih kožnih bradavic, pri katerih z uporabo več metod nismo mogli dokazati prisotnosti drugih genotipov HPV (preglednica 15, vzorca 13 in 15). Oba vzorca sta imela vrednosti virusnega bremena (1/493 in 1/103 virusnih genomov/št. humanih celic), ki so tipične za predstavnike virusnega rodu *Betapapillomavirus* v benignih spremembah kože (Köhler in sod., 2009). Vrednosti virusnega bremena sicer podpirajo našo hipotezo, vendar pa obstoj etiološke povezave med okužbo s HPV-151 in razvojem navadnih kožnih bradavic še zdaleč ni jasen ter zahteva nadaljnje raziskave na večjem številu vzorcev.

HPV-151 smo dokazali pri štirih (4,0 %) od 101 testiranega malignega tumorja kože, vendar je bil HPV-151 kot edini genotip HPV prisoten le pri enem vzorcu, medtem ko so bili pri ostalih vzorcih prisotni še drugi genotipi HPV. Ostali prisotni genotipi so bili HPV-21, HPV-24, HPV-36 in HPV-37. Prvi trije se uvrščajo v vrsto 1, zadnji pa v vrsto 2 rodu *Betapapillomavirus*, vsi pa imajo kožni tropizem in so bili najdeni v različnih vrstah kožnih sprememb. Dodatno je bil v dveh vzorcih (preglednica 12, preglednica 15, vzorca 6 in 8) prisoten tudi novo opredeljeni HPV-150, katerega vpletenosti v maligno transformacijo kože nismo uspeli razjasniti. V obeh vzorcih je bil HPV-151 prisoten v višji koncentraciji kot HPV-150, vendar ni jasno ali ima to kakšen pomen ali gre le za naključje. Prisotnost vseh dodatnih genotipov je zelo otežila dokončno sklepanje o etiološki vpletenosti HPV-151 v nastanek malignih sprememb kože. V edinem vzorcu BCC, kjer je bil HPV-151 prisoten kot edini genotip (preglednica 15, vzorec 16), je bilo virusno breme nizko (1/691 virusnih genomov/št. humanih celic), kar se sklada z vrednostmi, opisanimi za druge predstavnike rodu *Betapapillomavirus* pri ne-melanomskem raku kože (Orth, 2005; Weissenborn in sod., 2005; Vasiljević in sod., 2007). Iz tega dejstva lahko ob visoki starosti bolnika (84 let) sklepamo, da je okužba s HPV-151 vsaj delno prispevala k nastanku omenjenega BCC ali predhodnih predrakavih sprememb. Vendar pa bodo za razrešitev etiološke povezave med HPV-151 in nastankom malignih kožnih sprememb potrebne nadaljnje raziskave.

5.4 POMEN KANDIDATNEGA IZOLATA ZA NOVI GENOTIP SI-HPV-BETA5

Na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja je kandidatni izolat za novi genotip SI-HPV-Beta5, ki je bil izoliran iz kožnega SCC pri imunokompromitiranem starejšem moškem, najbolj podoben novemu genotipu HPV-150, za katerega smo pokazali, da je najbližje vrsti 5 rodu *Betapapillomavirus*. Ker je bil v vzorcu dodatno prisoten tudi genotip HPV-9 vrste 2 rodu *Betapapillomavirus*, brez dodatnih raziskav težko sklepamo na etiološko povezanost kandidatnega novega genotipa z razvojem maligne spremembe kože, posebej ker je šlo za imunokompromitiranega bolnika.

Za zdaj edinega uradnega predstavnika vrste 5 rodu *Betapapillomavirus* predstavlja genotip HPV-96, ki se mu bo v prihodnje verjetno pridružil tudi novo opredeljeni HPV-150. Glede na to, da so druge vrste rodu *Betapapillomavirus* zastopane z bistveno večjim številom genotipov, lahko sklepamo, da je poznanih tako malo predstavnikov vrste 5 zato, ker so bodisi zelo redki bodisi jih ne moremo dokazati z metodami, ki so v trenutni uporabi.

Oprelitev novega genotipa HPV-150 in najdba kandidatnega izolata SI-HPV-Beta5 nakazuje, da predstavniki vrste 5 rodu *Betapapillomavirus* niso izjemno redki ter da je vrsta veliko bolj raznolika, kot je bilo znano doslej. Glede na določene indikacije, da bi lahko imeli novi genotipi in kandidatni izolati določen klinični pomen, upamo, da smo z našo raziskavo začrtali pot za nadaljnje raziskovalno delo na tem področju.

6 SKLEPI

- V sklopu doktorske naloge smo opredelili tri nove genotipe HPV: HPV-125, HPV-150 in HPV-151. Prav tako smo pri testiranju kliničnih vzorcev našli kandidatni izolat za novi genotip HPV, ki smo ga poimenovali SI-HPV-Beta5.
- Za vse tri nove genotipe smo uspeli pridobiti pridelke PCR celotnega genoma, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje. Zaporedja smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijskimi oznakami FN547152 (HPV-125), FN677755 (HPV-150) in FN677756 (HPV-151). Prav tako smo pripravili referenčne klone, na podlagi katerih so bili genotipi uradno sprejeti s strani Referenčnega centra za viruse papiloma v Heidelbergu.
- Z računalniškimi analizami smo vsem trem novim genotipom določili odprte bralne okvirje ter analizirali njihova nekodirajoča področja ter specifične motive znotraj beljakovin E6 in E7. Vse tri genotipe smo prav tako filogenetsko opredelili in jim določili najbolj sorodne genotipe.
- Ugotovili smo, da lahko z izotermalnim pomnoževanjem WGA oz. RCA uspešno pomnožimo izredno majhne količine virusne DNA. Na ta način smo uspešno pomnožili celotna genoma HPV-150 in HPV-151, izolirana iz dlačnih mešičkov.
- Za ugotavljanje kliničnega pomena novih genotipov smo razvili tri kvantitativne tipsko specifične PCR teste v realnem času in evaluirali njihovo analitično občutljivost in specifičnost.
- Pokazali smo, da je HPV-125 redek genotip, ki ima kožni tropizem in je najverjetneje etiološko povezan z nastankom posameznih primerov navadnih kožnih bradavic pri človeku. Opredelitev novega genotipa HPV-125 je izboljšala naše poznavanje vrste 2, ki je ena od redkih vrst s kožnim tropizmom znotraj rodu *Alphapapillomavirus*. Znotraj vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* je HPV-125 je najbolj soroden genotipu HPV-3.

- Dokazali smo, da je HPV-150 redek genotip, ki ima tropizem za kožo in ki lahko vzpostavi perzistentno okužbo v dlačnih mešičkih pri imunokompetentnih osebah. HPV-150 smo našli pri nekaj primerih navadnih kožnih bradavic in ploščatoceličnega ter bazalnoceličnega raka kože, vendar ga zaradi sočasne prisotnosti dodatnih genotipov HPV ter nizkih virusnih koncentracij, značilnih za ta rod, nismo mogli nedvoumno potrditi kot povzročitelja teh sprememb. Pokazali smo, da je HPV-150 najbolj soroden genotipu HPV-96 iz vrste 5 rodu *Betapapillomavirus*, ki je ena slabše raziskanih vrst HPV, s tem pa smo izboljšali naše poznavanje genetske raznolikosti tega rodu.

- Dokazali smo, da je HPV-151 redek genotip, ki ima tropizem za kožo. HPV-151 smo našli pri nekaj primerih navadnih kožnih bradavic in ploščatoceličnega ter bazalnoceličnega raka kože, vendar ga zaradi nizkih virusnih koncentracij in prisotnosti dodatnih genotipov HPV nismo mogli nedvoumno potrditi kot etiološkega povzročitelja teh sprememb. HPV-151 je najbolj soroden genotipu HPV-22, njegova opredelitev pa je izboljšala naše poznavanje genetske raznolikosti vrste 2 rodu *Betapapillomavirus*, kamor sedaj uvrščamo že 17 genotipov.

- Najdba kandidatnega izolata za novi genotip, SI-HPV-Beta5, ki je na podlagi kratkega nukleotidnega zaporedja najbolj soroden HPV-150, nakazuje večjo raznolikost med genotipi, sorodnimi vrsti 5 rodu *Betapapillomavirus*, kot je bilo znano doslej. Kratko nukleotidno zaporedje SI-HPV-Beta5 smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijsko oznako FR822732. Končna opredelitev kandidatnega izolata in določitev njegovega kliničnega pomena pa bo predmet nadaljnjega raziskovalnega dela.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Viruse papiloma (PV) uvrščamo v družino *Papillomaviridae*. Humane viruse papiloma (HPV) delimo na rodove, vrste in genotipe. Različni genotipi HPV so etiološko povezani z nastankom malignih in benignih sprememb sluznice in kože (rak materničnega vratu, bazalnocelični in ploščatocelični rak kože, genitalne bradavice, papilomi grla, navadne kožne bradavice itd.), zato ravno genotipi predstavljajo najpomembnejši nivo razvrščanja. Do sedaj je bilo opredeljenih okoli 150 genotipov HPV, vendar naj bi bilo dejansko število genotipov po ocenah, pridobljenih na podlagi delnih nukleotidnih zaporedij, veliko višje.

Namen doktorske naloge je bil z določanjem nukleotidnega zaporedja celotnega genoma pri predhodno delno opredeljenih slovenskih izolatih HPV opredeliti vsaj en nov genotip HPV. Nadaljnji namen je bil novo opredeljene genotipe ustrezno klonirati in deponirati v referenčni center v Heidelbergu, kjer bi bili uradno sprejeti. Poleg tega smo nove genotipe želeli opredeliti tako virološko, z določitvijo virusnih genov, kot tudi epidemiološko, z določitvijo tropizma in patogenega potenciala na podlagi testiranja kliničnih vzorcev.

V predhodnih slovenskih raziskavah (Kocjan in sod., 2004, 2005; Potočnik in sod., 2006) razporeditve genotipov HPV v različnih vzorcih je naša raziskovalna skupina odkrila več potencialnih kandidatov za nove genotipe HPV, ki pa jih je potrebno dokončno opredeliti. Med njimi smo izbrali tri najbolj obetavne izolate: SIBX1, SIBX2 in SIBX9, za katere smo imeli delna 367-474 bp dolga zaporedja gena L1.

Kandidatna izolata SIBX1 in SIBX2 sta bila pridobljena iz dlačnih mešičkov, izolat SIBX9 pa iz vzorca tkiva kožne bradavice. Zaradi nizke koncentracije DNA smo za pomnoževanje izolatov, pridobljenih iz dlačnih mešičkov, uporabili metodo izotermalnega pomnoževanja po principu kotalečega se kroga - RCA oz. WGA.

Za vse tri nove genotipe smo bodisi iz originalnega vzorca (SIBX9) bodisi iz pridelkov WGA (SIBX1 in SIBX2) uspeli pridobiti pridelke PCR celotnega genoma, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje. Zaporedja smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijskimi oznakami FN547152 (HPV-125), FN677755 (HPV-150) in FN677756 (HPV-151). Prav tako smo pripravili referenčne klone, na podlagi katerih so bili genotipi uradno sprejeti s strani Referenčnega Centra v Heidelbergu. Vsem trem novim genotipom smo določili odprte bralne okvirje ter analizirali njihova nekodirajoča področja ter specifične motive znotraj beljakovin E6 in E7. Prav tako smo vse tri genotipe filogenetsko opredelili in jim določili najbolj sorodne genotipe.

Za določanje kliničnega pomena novih genotipov HPV smo razvili tri občutljive kvantitativne tipsko specifične PCR teste v realnem času, s katerimi smo določali prisotnost novih genotipov v reprezentativnih kliničnih vzorcih. Klinični vzorci so bili izbrani tako, da so predstavljali najpogostejše s HPV povezane benigne in maligne kožne in sluznične spremembe. Kot kužnino, ki predstavlja izhodiščno prisotnost HPV pri zdravih osebah, pa smo izbrali dlačne mešičke.

Molekularna opredelitev novega genotipa HPV-125 je pokazala, da njegov celotni genom vsebuje 7809 bp in ima 46,4 % delež GC nukleotidov. Genom HPV-125 je organiziran na način, ki je tipičen za predstavnike rodu *Alphapapillomavirus*, in vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E6, E7, E1, E2 in E4 ter pozni beljakovini L2 in L1. Za razliko od nekaterih ostalih PV iz tega rodu HPV-125 nima zapisa za beljakovino E5. Genom HPV-125 vsebuje tudi dve nekodirajoči področji: zgornje regulatorno področje (LCR), ki se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7137-7809 bp, dolžina 673 bp), ter krajše nekodirajoče področje, ki se nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 3757-4216 bp, dolžina 460 bp). Analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-125 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 29 in 102, medtem ko E7 vsebuje eno tako domeno na mestu 50. Kot pri več drugih predstavnikih vrste 2 rodu *Alphapapillomavirus* je tipično zaporedje za vezavo pRb (LxCxE) odsotno tudi pri HPV-125. Na podlagi multiple poravnave L1 gena 117 HPV se HPV-125 filogenetsko uvršča v vrsto 2 virusnega rodu *Alphapapillomavirus*, najbolj pa je soroden genotipoma HPV-3 in HPV-28. Podrobna primerjava v parih med nukleotidnim in aminokislinskim zaporedjem gena L1 je pokazala, da je HPV-125 najbolj soroden HPV-3. S testiranjem kliničnih vzorcev smo pokazali, da je HPV-125 redek genotip, ki ima kožni tropizem, ter da je najverjetneje etiološko povezan z nastankom posameznih primerov navadnih kožnih bradavic pri človeku.

Molekularna opredelitev novega genotipa HPV-150 je pokazala, da njegov celotni genom vsebuje 7436 bp in ima 39,70 % delež GC nukleotidov. Genom HPV-150 je organiziran na način, ki je tipičen za predstavnike rodu *Betapapillomavirus*, in vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E6, E7, E1, E2 ter pozni beljakovini L2 in L1, verjetno pa tudi zapis za beljakovino E4, medtem ko je zapis za beljakovino E5 odsoten. Prav tako vsebuje dve nekodirajoči področji: LCR, ki se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7371-350 bp, dolžina 416 bp), ter zelo kratko nekodirajoče področje, ki se nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 4219-4269 bp, dolžina 51 bp). Analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-150 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 24 in 98, medtem ko vsebuje E7 eno tako domeno na mestu 59, prav tako pa E7 vsebuje tudi tipično zaporedje za vezavo pRb (LxCxE) na aminokislinskem mestu 24. Po filogenetski analizi, izvedeni na podlagi poravnave gena L1 200 reprezentativnih genotipov PV (človeških in živalskih), se HPV-150 uvršča najbližje vrsti 5 (tipska vrsta HPV-96) znotraj rodu

Betapapillomavirus. S testiranjem kliničnih vzorcev smo pokazali, da je HPV-150 redek genotip, ki ima tropizem za kožo in lahko vzpostavi perzistentno okužbo v dlačnih mešičkih pri imunokompetentnih osebah. Čeprav smo HPV-150 našli pri več primerih navadnih kožnih bradavic, SCC ter BCC kože, ga zaradi prisotnosti dodatnih genotipov HPV in nizkega virusnega bremena nismo mogli nedvoumno potrditi kot etiološkega povzročitelja teh sprememb.

Molekularna opredelitev novega genotipa HPV-151 je pokazala, da celotni genom vsebuje 7386 bp in ima 39,79 % delež GC nukleotidov. Genom HPV-151 je organiziran na način, ki je tipičen za rod *Betapapillomavirus*, in vsebuje zapise za zgodnje virusne beljakovine E6, E7, E1, E2 ter pozni beljakovini L2 in L1, verjetno pa tudi zapis za beljakovino E4. Zapis za beljakovino E5 je odsoten. Genom HPV-151 vsebuje tudi dve nekodirajoči področji. LCR se nahaja med genoma L1 in E6 (genomska lokacija 7213-148 bp, dolžina 322 bp), medtem ko se drugo, zelo kratko nekodirajoče področje nahaja med genoma E2 in L2 (genomska lokacija 4008-4091 bp, dolžina 84 bp). Analiza aminokislinskega zaporedja zgodnjih virusnih beljakovin E6 in E7 je pokazala, da vsebuje E6 HPV-151 dve tipični domeni za vezavo cinka (CxxC(x)₂₉CXXC) na aminokislinskih mestih 27 in 101, medtem ko vsebuje E7 eno tako domeno na mestu 53. Za razliko od ostalih predstavnikov vrste 2 rodu *Betapapillomavirus* HPV-151 ne vsebuje tipičnega zaporedja za vezavo pRb (LxCxE). Po filogenetski analizi, izvedeni na podlagi poravnave gena L1 200 reprezentativnih genotipov PV (človeških in živalskih), se HPV-151 uvršča znotraj vrste 2 znotraj rodu *Betapapillomavirus*, najbližje genotipu HPV-22. S testiranjem reprezentativnih kliničnih vzorcev smo pokazali, da je HPV-151 redek genotip, ki ima tropizem za kožo. Čeprav smo HPV-151 našli pri nekaj primerih navadnih kožnih bradavic, SCC ter BCC kože, ga zaradi prisotnosti dodatnih genotipov HPV in nizkega virusnega bremena nismo mogli nedvoumno potrditi kot etiološkega povzročitelja teh sprememb.

Ob testiranju kliničnih vzorcev smo našli še en kandidatni izolat za novi genotip, SI-HPV-Beta5, ki je na podlagi kratkega nukleotidnega zaporedja najbolj soroden HPV-150. Najdba nakazuje večjo raznolikost med genotipi, sorodnimi vrsti 5 rodu *Betapapillomavirus*, kot je bilo znano doslej. Kratko nukleotidno zaporedje SI-HPV-Beta5 smo deponirali v zbirki GenBank pod identifikacijsko oznako FR822732. Končna opredelitev kandidatnega izolata in določitev njegovega kliničnega pomena pa bo predmet nadaljnjega raziskovalnega dela.

Odkritje novih genotipov HPV pomembno prispeva k izboljšanju razumevanja filogenetske raznolikosti virusov papiloma in je posebej pomembno, kadar lahko dokažemo, da imajo novi genotipi tudi klinični pomen. V takih primerih lahko molekularna opredelitev novih HPV prispeva k izboljšani diagnostiki in obravnavi bolnikov ter obenem odpira nove možnosti za raziskovanje patogeneze HPV.

7.2 SUMMARY

Papillomaviruses (PV) belong to the viral family *Papillomaviridae*. Human Papillomaviruses (HPV) are classified into genera, species and genotypes. Different genotypes of HPV are etiologically implicated in the development of malignant and benign lesions of skin and mucosa (cervical cancer, basal (BCC) and squamous cell carcinoma of the skin (SCC), genital warts, laryngeal papillomas, common skin warts etc.). Because of this connection with the development of disease, genotypes currently represent the most important level of classification. Up to date around 150 distinct HPV genotypes have been characterized, however, based on information provided by partial genomic sequences obtained so far, the actual number of HPV genotypes is speculated to be much higher.

The purpose of the doctoral thesis was to fully characterize at least one novel HPV genotype, starting from partially characterized Slovenian samples containing potential or candidate novel HPV genotypes. Further, we aimed to clone the full genomic sequences of the clones and submit them to the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, Germany, to be officially accepted as novel genotypes. Additionally, we aimed to characterize the novel genotypes virologically, by locating their viral genes, and epidemiologically, by determining their tropism and pathogenic potential based on their prevalence in clinical samples.

During previous research by our study group (Kocjan in sod., 2004, 2005; Potočnik in sod., 2006) studying the distribution of genotypes in various samples, several potential candidate HPV isolates were identified, requiring further characterization. Among those isolates, we chose to pursue the characterization of the isolates SIBX1, SIBX2 and SIBX9, for which we had previously obtained partial 367-474 bp sequences of the L1 gene.

The candidate isolates SIBX1 and SIBX2 were obtained from hair follicle samples, while the isolate SIBX9 was obtained from a tissue sample of a common wart. Due to the minute quantity of DNA present in hair follicle samples, the rolling-cycle amplification (RCA) method also known as whole genome amplification (WGA), was used to amplify those isolates prior to further work.

By using long-range PCR and either original DNA (SIBX9) or WGA products (SIBX1, SIBX2) as input, we were able to obtain PCR products, encompassing the full genomes of the novel genotypes, and determine their nucleotide sequence. The full genomic sequences were submitted to GenBank as FN547152 (HPV-125), FN677755 (HPV-150) and FN677756 (HPV-151). Using cloning, reference clones of all three novel genotypes were prepared and submitted to the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, where the novel genotypes were officially accepted. By using *in silico* analysis we determined the open reading frames or ORF, of the novel genotypes and analysed their non-coding

regions, and specific binding motifs within their E6 and E7 proteins. Additionally, we placed the novel genotypes into corresponding phylogenetic groups.

In order to determine the clinical significance of the novel genotypes, we developed three sensitive quantitative type specific real-time PCR assays. The collection of clinical samples tested, included the most common HPV-associated benign and malignant, skin and mucosal lesions, as well as hair follicles of immuno-competent individuals.

The molecular characterization of the novel genotype HPV-125 showed its genome to contain 7809 bp with a 46,4 % ratio of GC. HPV-125 displays genomic organisation typical for the representatives of the genus *Alphapapillomavirus* and contains genes for early viral proteins E6, E7, E1, E2 and E4, and late viral proteins L2 and L1. Unlike some other members of this group HPV-125 does not contain an E5 ORF. The genome of HPV-125 also contains two non-coding regions, the long control region or LCR, located between the L1 and E6 genes (genomic location 7137-7809 bp, length 673 nt) and a short non-coding region located between the E2 and L2 genes (genomic location 3757-4216 bp, length 460 nt). The analysis of the amino-acid sequence of early viral proteins E6 and E7, showed E6 to contain two typical zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CXXC) at amino-acid positions 29 and 102, while E7 contains one such domain at position 50. Like most other members of *Alphapapillomavirus* species 2, the E7 of HPV-125 does not contain a typical pRb (LxCxE) binding motive. Based on the multiple alignment of the L1 gene of 117 HPVs, HPV-125 is phylogenetically placed within *Alphapapillomavirus* species 2, and is most closely related to HPV-3 and HPV-28. Detailed comparisons between the nucleic and amino-acid sequences of the L1 genes showed HPV-125 to be most closely related to HPV-3. By testing clinical samples, we determined HPV-125 to be a very rare genotype with cutaneous tropism, which can be etiologically implicated in the development of common skin warts in humans.

The molecular characterization of the novel genotype HPV-150 showed its genome to contain 7436 bp with a 39,70 % ratio of GC. HPV-150 displays genomic organisation typical for the representatives of the genus *Betapapillomavirus* and contains genes for early viral proteins E6, E7, E1 and E2, and late viral proteins L2 and L1. Although the E4 ORF may be active, the E5 ORF is absent. The genome of HPV-150 contains two non-coding regions, the long control region or LCR, located between the L1 and E6 genes (genomic location 7371-350 bp, length 416 nt) and a very short non-coding region located between the E2 and L2 genes (genomic location 4219-4269 bp, length 51 nt). The analysis of the amino-acid sequence of early viral proteins E6 and E7, showed E6 of HPV-150 to contain two typical zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CXXC) at amino-acid positions 24 and 98, while E7 contains one such domain at position 59 and a typical pRb (LxCxE) binding motif at position 24. The phylogenetic analysis performed based on the multiple alignment of the L1 gene of 200 representative PVs (both human and animal), placed HPV-150

closest to *Betapapillomavirus* species 5 (type species HPV-96). The testing of clinical samples revealed HPV-150 to be a rare genotype, with cutaneous tropism, which can establish persistent infection in hair follicles of immuno-competent individuals. Despite the presence of HPV-150 in several common skin warts and SCC and BCC of the skin, it was not possible to establish whether this genotype is etiologically implicated in the development of benign and malignant skin lesions, due to very low viral loads of HPV-150 and the presence of additional HPV genotypes.

The molecular characterization of the novel genotype HPV-151 showed its genome to contain 7386 bp with a 39,79 % ratio of GC. HPV-151 displays genomic organisation typical for the representatives of the genus *Betapapillomavirus* and contains genes for early viral proteins E6, E7, E1, and E2, and late viral proteins L2 and L1. Although E4 ORF may be active, the E5 ORF is absent. The genome of HPV-151 contains two non-coding regions, the long control region or LCR, located between the L1 and E6 genes (genomic location 7213-148 bp, length 322 nt) and a very short non-coding region located between the E2 and L2 genes (genomic location 4008-4091 bp, length 84 nt). The analysis of the amino-acid sequence of early viral proteins E6 and E7, showed E6 of HPV-150 to contain two typical zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CXXC) at amino-acid locations 27 and 101, while E7 contains one such domain at position 53. Unlike other members of *Betapapillomavirus* species 2, the E7 of HPV-151 does not contain a typical pRb (LxCxE) binding motif. The phylogenetic analysis performed based on the multiple alignment of the L1 gene of 200 representative PVs, placed HPV-151 within *Betapapillomavirus* species 2, closest to HPV-22. The testing of clinical samples revealed HPV-151 to be a rare genotype, with cutaneous tropism. Despite the presence of HPV-151 in several common skin warts and SCC and BCC of the skin, it was not possible to establish whether this genotype is etiologically implicated in the development of benign and malignant skin lesions, due to very low viral loads of HPV-151 and the presence of additional genotypes.

The testing of clinical samples revealed an additional candidate isolate for a novel HPV genotype. Based on the short nucleic acid sequence obtained, and submitted to GenBank as FR822732, the isolate, named SI-HPV-Beta5, is most similar to HPV-150. The find suggests a much higher degree of diversity among genotypes related to *Betapapillomavirus* species 5, than previously known. The final characterization of this candidate isolate and the determination of its clinical significance remain to be determined.

Characterization of novel HPV genotypes represents an important contribution toward understanding the phylogenetic diversity of PVs. Such information is especially important when the novel genotypes can be shown to have a clinical significance, as it can contribute to improvements in diagnostic methods, handling of patients and may offer new opportunities to study HPV pathogenesis.

8 VIRI

- Antonsson A., Forslund O., Ekberg H., Sterner G., Hansson B.G. 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *Journal of Virology*, 74, 24: 11636-11641.
- Antonsson A., Erfurt C., Hazard K., Holmgren V., Simon M., Kataoka A., Hossain S., Hakangard C., Hansson B.G. 2003a. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *Journal of General Virology*, 84, 7: 1881-1886.
- Antonsson A., Karanfilovska S., Lindqvist P.G., Hansson B.G. 2003b. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 6: 2509-2514.
- Beaudenon S., Praetorius F., Kremsdorf D., Lutzner M., Worsaae N., Pehau-Arnaudet G., Orth G. 1987. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *Journal of Investigative Dermatology*, 88: 130-135.
- Berkhout R.J.M., Bouwes Bavinck J.N., ter Schegget J. 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 6: 2087-2096.
- Bernard H.-U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32, Suppl. 1: S1-S6.
- Bernard H.-U., Burk R.D., 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.
- Bhattacharjee B., Sengupta S. 2006. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*, 354, 2: 280-285.
- Boukamp P. 2005. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*, 26, 10: 1657-1667.
- Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V. 2009. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncology*, 10, 4: 321-322.

- Bouwes Bavinck J.N., Neale R.E., Abeni D., Euvrard S., Green A.C., Harwood C.A., de Koning M.N.C., Naldi L., Nindl I., Pawlita M., Pfister H., Proby C.M., Quint W.G.V., ter Schegget J., Waterboer T., Weissenborn S., Feltkamp M.C.W. 2010. Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 70, 23: 9777-9786.
- Boxman I.L., Berkhout R.J., Mulder L.H., Wolkers M.C., Bouwes Bavinck J.N., Vermeer B.J., ter Schegget J. 1997. Detection of human papillomavirus dna in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *Journal of Investigative Dermatology*, 108, 5: 712-715.
- Bravo I.G., Alonso A. 2004. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *Journal of Virology*, 78: 13613 - 13626.
- Bravo I.G., de Sanjosé S., Gottschling M. 2010. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in Microbiology*, 18, 10: 432-438.
- Buck C.B., Cheng N., Thompson C.D., Lowy D.R., Steven A.C., Schiller J.T., Trus B.L. 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of Virology*, 82, 11: 5190-5197.
- Castellsague X., Drudis T., Canadas M., Gonce A., Ros R., Perez J., Quintana M.J., Muñoz J., Albero G., de Sanjose S., Bosch F.X. 2009. Human Papillomavirus and HPV infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infectious Diseases*, 9, 1: 74, doi:10.1186/1471-2334-9-74: 12 str.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 4: 540 -552.
- Chakrabarti O., Krishna S. 2003. Molecular interactions of "high risk" human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *Journal of Biosciences*, 28, 3: 337-348.
- Chan S.Y., Delius H., Halpern A.L., Bernard H.U. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology*, 69, 5: 3074-3083.

- Choe J., Vaillancourt P., Stenlund A., Botchan M. 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *Journal of Virology*, 63, 4: 1743-1755.
- Clifford G.M., Smith J.S., Plummer M., Muñoz N., Franceschi S. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88: 63 - 73.
- Daling J.R., Madeleine M.M., Johnson L.G., Schwartz S.M., Shera K.A., Wurscher M.A., Carter J.J., Porter P.L., Galloway D.A., McDougall J.K. 2004. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*, 101, 2: 270-280.
- Dasgupta S., Zabielski J., Simonsson M., Burnett S. 1992. Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *Journal of Molecular Biology*, 228, 1: 1-6.
- Delius H., Saegling B., Bergmann K., Shamanin V., de Villiers E.M. 1998. The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology*, 240, 2: 359-365.
- de Roda Husman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., Meijer C.J., Snijders P.J. 1995. The use of general primers GP5GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76, 4: 1057-1062.
- de Villiers E.M., Laverigne D., McLaren K., Benton E.C. 1997. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *International Journal of Cancer*, 73, 3: 356-361.
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17 - 27.
- de Villiers E.-M., Gunst K. 2009. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *Journal of General Virology*, 90, 8: 1999-2004.
- De Vuyst H., Clifford G.M., Nascimento M.C., Madeleine M.M., Franceschi S. 2009. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124, 7: 1626-1636.

- Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32: 7-15.
- Doorbar J. 2007. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers*, 23, 4: 297-313.
- Enemark E.J., Joshua-Tor L. 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 442, 7100: 270-275.
- Fakhry C., Gillison M.L. 2006. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 17: 2606-2611.
- Fauquet C. (ed.). 2005. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier/Academic Press: 1259 str.
- Favre M., Breitburd F., Croissant O., Orth G. 1977. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *Journal of Virology*, 21, 3: 1205-1209.
- Favre M., Obalek S., Jabłońska S., Orth G. 1989a. Human papillomavirus type 28 (HPV-28), an HPV-3-related type associated with skin warts. *Journal of Virology*, 63, 11: 4905-4905.
- Favre M., Croissant O., Orth G. 1989b. Human papillomavirus type 29 (HPV-29), an HPV type cross-hybridizing with HPV-2 and with HPV-3-related types. *Journal of Virology*, 63, 11: 4906-4906.
- Forslund O., Hansson B.G. 1996. Human papillomavirus type 70 genome cloned from overlapping PCR products: complete nucleotide sequence and genomic organization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 4: 802-809.
- Forslund O., Antonsson A., Higgins G., Ly H., Delius H., Hunziker A., de Villiers E.-M. 2003. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of candidate human papilloma virus type 92. *Virology*, 312, 2: 255-260.
- Garcia-Vallve S., Alonso A., Bravo I.G. 2005. Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in Microbiology*, 13: 514 - 521.
- Gottschling M., Köhler A., Stockfleth E., Nindl I. 2007a. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 1: 213-222.

- Gottschling M., Stamatakis A., Nindl I., Stockfleth E., Alonso A., Bravo I.G. 2007b. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 5: 1242-1258.
- Gottschling M., Göker M., Stamatakis A., Bininda-Emonds O.R.P., Nindl I., Bravo I.G. 2011. Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 7: 2101-2113.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Halpern A.L. 2000. Comparison of papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a papillomavirus vaccine. *Journal of Clinical Virology*, 19, 1-2: 43-56.
- Han R., Cladel N.M., Reed C.A., Christensen N.D. 1998. Characterization of transformation function of cottontail rabbit papillomavirus E5 and E8 genes. *Virology*, 251, 2: 253-263.
- Harry J.B., Wettstein F.O. 1996. Transforming properties of the cottontail rabbit papillomavirus oncoproteins Le6 and SE6 and of the E8 protein. *Journal of Virology*, 70, 6: 3355-3362.
- Hazard K., Eliasson L., Dillner J., Forslund O. 2006. Subtype HPV38b[FA125] demonstrates heterogeneity of human papillomavirus type 38. *International Journal of Cancer*, 119, 5: 1073-1077.
- Hazard K., Karlsson A., Andersson K., Ekberg H., Dillner J., Forslund O. 2007. Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1: 116-119.
- Hoffmann R., Hirt B., Bechtold V., Beard P., Raj K. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *Journal of Virology*, 80, 9: 4431-4439.
- Insinga R.P., Liaw K.-L., Johnson L.G., Madeleine M.M. 2008. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17, 7: 1611-1622.

- Jabłońska S., Fabjanska L., Formas I. 1966. On the viral etiology of epidermodysplasia verruciformis. *Dermatologica*, 132, 5: 369-385.
- Jabłońska S., Orth G., Obalek S., Croissant O. 1985. Cutaneous warts: Clinical, histologic, and virologic correlations. *Clinics in Dermatology*, 3, 4: 71-82.
- Jabłońska S., Majewski S., Obalek S., Orth G. 1997. Cutaneous warts. *Clinics in Dermatology*, 15, 3: 309-319.
- Jančar N., Kocjan B.J., Poljak M., Lunar M.M., Bokal E.V. 2009. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 145, 2: 184-188.
- Kadaja M., Sumerina A., Verst T., Ojarand M., Ustav E., Ustav M. 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO Journal*, 26, 8: 2180-2191.
- Kadaja M., Isok-Paas H., Laos T., Ustav E., Ustav M. 2009a. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5, 4: e1000397, doi: 10.1371/journal.ppat.1000397: 16 str.
- Kadaja M., Silla T., Ustav E., Ustav M. 2009b. Papillomavirus DNA replication: From initiation to genomic instability. *Virology*, 384, 2: 360-368.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 14: 3059-3066.
- Kocjan B.J., Seme K., Fujs-Komloš K., Potočnik M. 2004. Distribution of human papillomavirus genotypes in Slovenian patients with common cutaneous warts. V: Final program and abstracts of the International symposium on cutaneous HPV infection and development of skin cancer, Venice, Italy. (neobjavljeno)
- Kocjan B.J., Poljak M., Seme K., Potočnik M., Fujs K., Babič D.Z. 2005. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infection, Genetics and Evolution*, 5, 3: 255-259.
- Kocjan B.J., Poljak M., Cimerman M., Gale N., Potočnik M., Bogovac Z., Seme K. 2009a. Prevaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology*, 391, 2: 274-283.

- Kocjan B.J., Seme K., Cimerman M., Kovanda A., Potočnik M., Poljak M. 2009b. Genomic diversity of human papillomavirus (HPV) genotype 38. *Journal of Medical Virology*, 81, 2: 288-295.
- Kocjan B.J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Petrovec M., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41-60.
- Köhler A., Meyer T., Stockfleth E., Nindl I. 2009. High viral load of human wart-associated papillomaviruses (PV) but not beta-PV in cutaneous warts independent of immunosuppression. *British Journal of Dermatology*, 161, 3: 528-535.
- Köhler A., Gottschling M., Förster J., Röwert-Huber J., Stockfleth E., Nindl I. 2010. Genomic characterization of a novel human papillomavirus (HPV-117) with a high viral load in a persisting wart. *Virology*, 399, 1: 129-133.
- Köhler A., Gottschling M., Manning K., Lehmann M.D., Schulz E., Krüger-Corcoran D., Stockfleth E., Nindl I. 2011. Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *Journal of General Virology*, 92, 7: 1585-1594.
- Kovanda, A., Kocjan B.J., Potočnik M., Poljak M. 2011a. Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125. *PLoS ONE*, 6, 7: e22414, doi:10.1371/journal.pone.0022414: 8 str.
- Kovanda A., Kocjan B.J., Luzar B., Bravo I.G., Poljak M. 2011b. Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS ONE*, 6, 7: e22529, doi:10.1371/journal.pone.0022529: 10 str.
- Kremsdorf D., Jabłońska S., Favre M., Orth G. 1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *Journal of Virology*, 48, 2: 340-351.
- Lazarczyk M., Cassonnet P., Pons C., Jacob Y., Favre M. 2009. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 2: 348-370.
- Li L., Barry P., Yeh E., Glaser C., Schnurr D., Delwart E. 2009. Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *Journal of General Virology*, 90, 10: 2413-2417.

- Liu X. 2005. Structure of the human papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 578-586.
- Longworth M.S., Laimins L.A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 362 - 372.
- Madsen B.S., Jensen H.L., van den Brule A.J.C., Wohlfahrt J., Frisch M. 2008. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. *International Journal of Cancer*, 122, 12: 2827-2834.
- Maglennon G.A., McIntosh P., Doorbar J. 2011. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, 414, 2: 153-163.
- McLaughlin-Drubin M.E., Münger K. 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*, 143: 195-208.
- McPhillips M.G., Oliveira J.G., Spindler J.E., Mitra R., McBride A.A. 2006. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *Journal of Virology*, 80, 19: 9530-9543.
- Meissner J. 1995. Complete nucleotide sequencing of an HPV-1a variant and determination of extant errors in the prototype HPV-1a sequence. *Virus Genes*, 9, 2: 189-191.
- Muñoz N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology*, 19, 1-2: 1-5.
- NCBI. 2011. BLAST: Basic local alignment tool. Bethesda, National Centre for Biotechnology Information: database.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Jan 2011)
- Nei M., Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. New York, Oxford University Press. 333 str.
- Nindl I., Gottschling M., Stockfleth E. 2007. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Disease Markers*, 23, 4: 247-259.

- Nominé Y., Masson M., Charbonnier S., Zanier K., Ristriani T., Deryckère F., Sibler A.-P., Desplancq D., Atkinson R.A., Weiss E., Orfanoudakis G., Kieffer B., Travé G. 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular Cell*, 21: 665-678.
- Orth G. 2005. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in non-melanoma skin cancers: guilty or innocent? *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 1: xii-xiii.
- Ott M., Zola J., Stamatakis A., Aluru S. 2007. Large-scale maximum likelihood-based phylogenetic analysis on the IBM BlueGene/L. V: Supercomputing, 2007. SC '07. Proceedings of the 2007 ACM/IEEE Conference. New York, Association for Computing Machinery: 1-11.
- Parish J.L., Bean A.M., Park R.B., Androphy E.J. 2006. ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Molecular Cell*, 24, 6: 867-876.
- Parkin D.M., Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24 Suppl. 3: S11-S25.
- Pfister H., Hettich I., Runne U., Gissmann L., Chliff G.N. 1983. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *Journal of Virology*, 47, 2: 363-366.
- Plasmeijer E.I., Green A.C., de Koning M.N.C., O'Rourke P., Quint W.G.V., Feltkamp M.C.W., Neale R.E. 2010. Transmission of betapapillomaviruses between domestic partners in an Australian community. *Journal of Clinical Virology*, 47, 3: 216-218.
- Poljak M., Kocjan B.J., Potočnik M., Seme K. 2009. Anogenital hairs are an important reservoir of alpha-papillomaviruses in patients with genital warts. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 9: 1270-1274.
- Potočnik M., Kocjan B.J., Seme K., Luzar B., Babič D.Z., Poljak M. 2006. Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. *Journal of Medical Virology*, 78, 12: 1673-1678.
- Potočnik M., Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. 2007. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenereologica Alpina Panonica et Adriatica*, 16, 3: 91-96, 98-98.

- Purdie K.J., Suretheran T., Sterling J.C., Bell L., McGregor J.M., Proby C.M., Harwood C.A., Breuer J. 2005. Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 1: 98-107.
- Pyeon D., Pearce S.M., Lank S.M., Ahlquist P., Lambert P.F. 2009. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathogens*, 5, 2: e1000318, doi:10.1371/journal.ppat.1000318: 9 str.
- Ravnan J.B., Gilbert D.M., Ten Hagen K.G., Cohen S.N. 1992. Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *Journal of Virology*, 66, 12: 6946-6952.
- Rector A., Tachezy R., Van Ranst M. 2004. A sequence-independent strategy for detection/cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of Virology*, 78, 10: 4993-4998.
- Rzhetsky A., Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 945-967.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 4: 406 -425.
- Sapp M., Bienkowska-Haba M. 2009. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, 276, 24: 7206-7216.
- Schelhaas M., Ewers H., Rajamäki M.-L., Day P.M., Schiller J.T., Helenius A. 2008. Human papillomavirus type 16 entry: retrograde cell surface transport along actin-rich protrusions. *PLoS Pathogens*, 4, 9: e1000148, doi: 10.1371/journal.ppat.1000148: 14 str.
- Schmitt M., de Koning M.N.C., Eekhof J.A.H., Quint W.G.V., Pawlita M. 2011. Evaluation of a novel multiplex human papillomavirus (HPV) genotyping assay for HPV types in skin warts. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 3262-3267.
- Shamanin V., Delius H., de Villiers E.M. 1994a. Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *Journal of General Virology*, 75, 5: 1149-1156.

- Shamanin V., Glover M., Rausch C., Proby C., Leigh I.M., zur Hausen H., de Villiers E.M. 1994b. Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Research*, 54, 17: 4610-4613.
- Smith J.L., Lidke D.S., Ozbun M.A. 2008. Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. *Virology*, 381, 1: 16-21.
- Spoden G., Freitag K., Husmann M., Boller K., Sapp M., Lambert C., Florin L. 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE*, 3, 10: e3313, doi:10.1371/journal.pone.0003313: 15 str.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 21: 2688-2690.
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systems Biology*, 57, 5: 758-771.
- Stewart A.C., Gravitt P.E., Cheng S., Wheeler C.M. 1995. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research*, 5, 1: 79-88.
- Stubenrauch F., Hummel M., Iftner T., Laimins L.A. 2000. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *Journal of Virology*, 74, 3: 1178-1186.
- Stubenrauch F., Zobel T., Iftner T. 2001. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*, 75, 9: 4139-4149.
- Sutton B.C., Allen R.A., Moore W.E., Dunn S.T. 2008. Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Modern Pathology*, 21, 3: 345-354.
- Suyama M., Torrents D., Bork P. 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Research*, 34, Web Server issue: W609-W612.

- Syrjänen K. 2000. Papillomavirus infections in human pathology. Chichester, Wiley: 614 str.
- Talavera G., Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systems Biology*, 56, 4: 564-577.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 30: 11030-11035.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599.
- Tieben L.M., ter Schegget J., Minnaar R.P., Bouwes Bavinck J.N., Berkhout R.J., Vermeer B.J., Jebbink M.F., Smits H.L. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *Journal of Virological Methods*, 42, 2-3: 265-279.
- Ustav M., Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1E2 open reading frames. *EMBO Journal*, 10, 2: 449-457.
- Van Tine B.A., Dao L.D., Wu S.-Y., Sonbuchner T.M., Lin B.Y., Zou N., Chiang C.-M., Broker T.R., Chow L.T. 2004. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12: 4030-4035.
- Van Ranst M., Kaplan J.B., Sundberg J.P., Burk R.D. 1995. Molecular evolution of papillomaviruses. V: Molecular basis of virus evolution. Gibbs A.J., Calisher C.H., Garcia-Arenal F. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 455–476.
- Vasiljević N., Hazard K., Eliasson L., Ly H., Hunziker A., de Villiers E.-M., Norrild B., Dillner J., Forslund O. 2007. Characterization of two novel cutaneous human papillomaviruses, HPV93 and HPV96. *Journal of General Virology*, 88, 5: 1479-1483.

- Viario D., Mueller-Decker K., Klotz U., Aengeneyndt B., Kopp-Schneider A., Gröne H.-J., Gheit T., Flechtenmacher C., Gissmann L., Tommasino M. 2011. E6E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathogens*, 7: e1002125, doi:10.1371/journal.ppat.1002125: 11 str.
- Walboomers J.M.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J.F., Meijer C., Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189: 12 - 19.
- Weissenborn S.J., Nindl I., Purdie K., Harwood C., Proby C., Breuer J., Majewski S., Pfister H., Wieland U. 2005. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 1: 93-97.
- Whelan J.A., Russell N.B., Whelan M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278, 1-2: 261-269.
- Wolf M., Garcea R.L., Grigorieff N., Harrison S.C. 2010. Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14: 6298-6303.
- Xi L.F., Jiang M., Shen Z., Hulbert A., Zhou X.-H., Lin Y.-Y., Kiviat N.B., Koutsky L.A. 2011. Inverse association between methylation of human papillomavirus type 16 DNA and risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3. *PLoS ONE*, 6: e23897, doi:10.1371/journal.pone.0023897: 10 str.
- Zheng Z.-M. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11, 1: 2286.
- zur Hausen H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account. *Virology*, 384: 260-265.

ZAHVALA

Kot pri vsakem doktoratu je tudi meni pri mojem na razne načine pomagalo ničkoliko ljudi. Ker bi poimenski seznam verjetno v dolžini konkuriral sami disertaciji, upam, da mi bodo tisti, ki jih nisem navedla poimensko, oprostili.

Najprej se lepo zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., ki me je izbral kot svojo mlado raziskovalko in mi omogočil pogoje za samostojno delo v svojem Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Sodelavcu dr. Boštjanu Kocjanu, univ. dipl. mikrobiol., se zahvaljujem, da sem imela priložnost delati z izolati, ki jih je v svojih preteklih raziskavah spoznal kot kandidatne izolate za nove genotipe HPV.

Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije se najlepše zahvaljujem, da mi je v sklopu programa za mlade raziskovalce omogočila tako doktorski študij kot tudi zaposlitev na področju raziskovanja.

Najlepša hvala vsem sodelavkam in sodelavcem iz Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za pomoč in razumevanje med eksperimentalnim delom ob pripravi doktorske naloge.

Posebej bi se rada zahvalila tudi naslednjim laboratorijem Inštituta za Mikrobiologijo in Imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani:

Članom Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij pod vodstvom prof. dr. Katje Seme, dr. med, se iskreno zahvaljujem, da sem lahko pri njih za potrebe kloniranja uporabljala sterilno komoro in toplo sobo za inkubacijo. Prav tako se jim najlepše zahvaljujem za vse nasvete v zvezi z gojišči za hrambo referenčnih klonov HPV, pa tudi za razumevanje in prijaznost, predvsem v tistih trenutkih, ko se je število plošč bližalo limitu hladilnika.

Članicam in članom Laboratorija za parazitologijo pod vodstvom prof. dr. Jerneja Logarja, univ. dipl. biol., se iskreno zahvaljujem, da so mi omogočili uporabo njihove PCR naprave za vgnezditi PCR in PCR na osnovi kolonij ter me vztrajno bodrili v mojih neštetih poskusih optimizacije.

Članom Laboratorija za diagnostiko zoonoz in laboratorij WHO se zahvaljujem za uporabo ledomata, ki mi je bistveno olajšal pripravo kompetentnih celic.

Članicam Laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze pa se zahvaljujem za uporabo tople komore za rast temperaturno posebej občutljivih, t.i. 'četrkovih' klonov.

Vsem članicam Službe za pripravo gojišč in pripravo reagentov se iskreno zahvaljujem za pomoč pri pripravi gojišč in plošč – pogosto so me rešile zadnji trenutek.

Članom Informacijsko tehnološke službe se najlepše zahvaljujem za pomoč pri namestitvi virtualnega računalnika ter različnih, pogosto med seboj bojujočih se, računalniških programov.

Najlepša hvala tudi računovodstvu in tajništvu Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo ter tajništvu Katedre za mikrobiologijo in imunologijo za vso pomoč v zvezi z navigacijo skozi najrazličnejše papirje.

Najlepše se zahvaljujem članicam in članom laboratorija Inštituta za patologijo za strokoven in hiter razrez arhivskih parafinskih vzorcev z mikrotomom ter prijetno druženje.

Prof. dr. Boštjanu Luzarju, dr. med, z Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani se zahvaljujem za pomoč pri izbiri ustreznih vzorcev za ugotavljanje tropizma novih genotipov in potrditev histoloških diagnoz vzorcev. Prav tako se za histološko diagnozo vzorcev najlepše zahvaljujem prof. dr. Nini Gale, dr. med.

Za zbiranje kliničnih vzorcev se najlepše zahvaljujem prim. doc. dr. Marku Potočniku, dr.med., Branku Piršu, dr. med, dr. Nini Jančar, dr. med, dr. Edi Vrtačnik Bokal, dr. med, dr. Pavlu Košoroku, dr. med. ter Vesni Tlaker Žunter, dr. med.

Prav tako se iskreno zahvaljujem vsem osebam, ki so v raziskavah sodelovale s svojimi vzorci.

Lepo se zahvaljujem tudi sledečim zunanjim sodelavcem: prof. dr. Ethel-Michelle de Villiers, iz Referenčnega centra za papillomaviruse v DKFZ; prof. dr. Toshihiku Matskuri, z Japonskega nacionalnega inštituta za nalezljive bolezni; prof. dr. Robertu D. Burku, iz Albert Einstein College of Medicine, ZDA; ki so mi poslali referenčne klone različnih genotipov HPV; ter dr. Ignaciu G. Bravu, iz Katalanskega inštituta za onkologijo, ki me je naučil vse, kar vem o filogenetskih analizah Maximum likelihood.

Za koristne nasvete v zvezi s kloniranjem se najlepše zahvaljujem doktorskima študentkama Sandri Janežič, univ. dipl. mikr. in Renati Blatnik, univ. dipl. biokem.

Lepo se zahvaljujem tudi dr. Urošu Logondru, univ. dipl. biokem. iz podjetja Roche, ki me je naučil rokovanja z napravo LC480 za PCR v realnem času; Sergeju Rožmanu, univ.dipl.inž.elekt., iz podjetja ABAKUS plus, ki mi je za potrebe filogenetskih analiz omogočil brezplačno uporabo računalnika 2x CPR 6 core AMD Opteron 2431 z 12 GB RAM DDR2-800. Velika zahvala gre tudi Mihi Stariču, dipl. inž., za pomoč pri prenosu podatkov, oddaljenem dostopu in obsežno lektorsko pomoč. Prav tako se lepo zahvaljujem Nadi Pantić Starič za končne lektorske popravke, ki so 'dali piko na i'.

Najlepša hvala tudi sošolkam in sošolcem z doktorskega študija biomedicine za vse nasvete v zvezi z eksperimentalnim delom.

Delo posvečam svoji družini, ki me je vedno podpirala.

PRILOGA A: Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125

OPEN ACCESS Freely available online



Characterization of a Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotype HPV-125

Anja Kovanda¹, Boštjan J. Kocjan¹, Marko Potočnik², Mario Poljak^{1*}

¹ Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, ² Department of Dermatovenereology, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Abstract

The DNA genome of a novel HPV genotype, HPV-125, isolated from a hand wart of an immuno-competent 19-year old male was fully cloned, sequenced and characterized. The full genome of HPV-125 is 7,809-bp in length with a GC content of 46.4%. By comparing the nucleotide sequence of the complete L1 gene, HPV-125 is phylogenetically placed within cutaneotrophic species 2 of *Alphapapillomaviruses*, and is most closely related to HPV-3 and HPV-28. HPV-125 has a typical genomic organization of *Alphapapillomaviruses* and contains genes coding for five early proteins, E6, E7, E1, E2 and E4 and two late capsid proteins, L1 and L2. The genome contains two non-coding regions: the first located between the L1 and E6 genes (nucleotide positions 7,137–7,809, length 673-bp) and the second between genes E2 and L2 (nucleotide positions 3,757–4,216, length 460-bp). The E6 protein of HPV-125 contains two regular zinc-binding domains at amino acid positions 29 and 102, whereas the E7 protein exhibits one such domain at position 50. HPV-125 lacks the regular pRB-binding core sequence within its E7 protein. In order to assess the tissue predilection and clinical significance of HPV-125, a quantitative type-specific real-time PCR was developed. The 95% limit-of-detection of the assay was 2.5 copies per reaction (range 1.7–5.7) and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 0.47 and 2.00 for 100 copies per reaction, and 1.15 and 2.15 for 10 copies per reaction, respectively. Testing of a representative collection of HPV-associated mucosal and cutaneous benign and malignant neoplasms and hair follicles (a total of 601 samples) showed that HPV-125 is a relatively rare HPV genotype, with cutaneous tropism etiologically linked with sporadic cases of common warts.

Citation: Kovanda A, Kocjan BJ, Potočnik M, Poljak M (2011) Characterization of a Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotype HPV-125. PLoS ONE 6(7): e22414. doi:10.1371/journal.pone.0022414

Editor: Christopher B. Buck, National Cancer Institute, United States of America

Received: May 4, 2011; **Accepted:** June 21, 2011; **Published:** July 21, 2011

Copyright: © 2011 Kovanda et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was sponsored by the Slovenian Research Agency and the Ministry of Health, which funded A.K. through the Young Researcher Training Program and B.J.K. through grant Z3-0220-0381-08. No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mario.poljak@mf.uni-lj.si

Introduction

Papillomaviruses (PV) are small non-enveloped viruses with a double stranded circular DNA genome, approximately 8-kb in size. So far, 29 genera of papillomaviruses, designated by letters of the Greek alphabet, have been described, of which 5 genera (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Mu*- and *Nu*papillomavirus) contain members that can infect humans and are referred to as human papillomaviruses (HPV) [1,2]. HPV genotypes that represent natural papillomavirus taxonomic entities, are grouped into HPV species according to their tissue tropism, sequence similarity, and other distinct biological properties. In order to be recognized as a distinct genotype, the entire L1 open reading frame (ORF) of a candidate HPV isolate must differ by at least 10% from all other officially recognized HPV genotypes [1,2] and the entire genome of the novel genotype must be deposited, in the form of one or more clones, in the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, Germany, so that the full genomic sequence can be independently confirmed. If these two conditions are met, the novel genotype is assigned a consecutive number, based on its order of submission, by the Reference Centre.

To date, more than 150 HPV genotypes have been fully characterized; roughly a third of them have been discovered since 2004, mostly by the use of molecular methods [1,2]. Based on the

large number of partial sequences published in the last few years, the final characterization of many further new HPV genotypes is expected in the near future [3,4]. The majority of officially recognized HPV genotypes have been etiologically linked to specific diseases, such as various forms of cancer, common and genital warts and other benign and malignant mucosal and skin lesions [5]. Most notably, infection with several genotypes of *Alphapapillomavirus* species 7 (type species HPV-18) and 9 (type species HPV-16) is strongly associated with the development of cervical carcinoma and other cancers in the anogenital region of both genders [5,6], while infection with members of *Alphapapillomavirus* species 10 (type species HPV-6) is associated with the development of benign tumors such as genital warts and laryngeal papillomas [5]. Another common HPV-associated clinical entity, *verrucae vulgaris*, or common warts, is caused by members of *Alphapapillomavirus* species 2 and 4, and several species of *Gamma*-, *Mu*- and *Nu*papillomavirus genera [7]. Members of *Alphapapillomavirus* species 2 were first found in patients with the hereditary disorder *epidermodysplasia verruciformis* [8] and are most frequently associated with flat or plane and intermediate skin warts in immuno-competent individuals [9–11]. In immuno-suppressed patients, such as solid-organ recipients, these genotypes are also associated or can co-localize with dysplastic warts and non-melanoma skin cancer [12–15].

In this study, a novel HPV genotype, isolated originally from a hand wart (isolate SIBX9) and initially characterized by our group in 2004 [16], was characterized fully and deposited in the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, Germany, where it was assigned its official name, HPV-125. In addition, a quantitative type-specific real-time PCR (RT-PCR) was developed and a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles was tested in order to assess the tissue predilection and clinical significance of HPV-125.

Materials and Methods

Amplification and sequencing of initial 474-bp sequence of the HPV-125 L1 gene

The total DNA from the original clinical sample of a hand wart containing HPV-125 was extracted using a High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions [16]. The initial 474-bp sequence of the HPV-125 L1 gene (GenBank Acc. No: AJ810860, corresponding to nucleotide positions 5,994–6,468 of the HPV-125 complete genome) was obtained by the use of primers HVP2 (5'-TCNMGNGGNCANCCNYTNGG-3' [14]) and B5 (5'-AYNCCRTTTRTGTGNCCTG -3' [13]) and FastStart Taq DNA polymerase kit (Roche Applied Science) on a PE9700 Thermo Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 5 µl (100 ng) of extracted DNA, 2.5 µl of 10× PCR Reaction Buffer, 200 µM (each) of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 1.5 mM of MgCl₂, 1.25 U of FastStart Taq DNA Polymerase, and 25 pmol of each primer. The thermal cycler program was set to 4 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 1 min at 95°C, 2 min at 52°C and 1 min at 72°C. The final extension step was performed at 72°C for 4 min and the reaction mixtures were then cooled to 4°C. Sequencing of the 474-bp PCR fragment was done by using the primers HVP2 and B5 on the ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) and Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Amplification, sequencing and cloning of the complete genome of HPV-125

Primers for the reverse long template PCR (125-fpw2 and 125-rpw2, Table S1) were constructed manually on the basis of the previously obtained 474-bp sequence of the HPV-125 L1 gene. A 7,770-bp PCR fragment was obtained from the original clinical sample by using the Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) on a PE9700 Thermo Cycler (Applied Biosystems). PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 7.1 µl of extracted DNA, 2.5 µl of 10× Expand Long Template buffer 2 with 27.5 mM MgCl₂, 500 µM (each) of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.75 U of Expand Long Template Enzyme Mix, and 3 pmol of each primer. The thermal cycler program was set to 2 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 10 s at 94°C, 30 s at 58°C and 9 min at 68°C. The final extension step was performed at 68°C for 10 min and the reaction mixtures were then cooled to 4°C. Sequencing of the 7,770-bp PCR fragment was done by primer walking with 38 primers (Table S1) by using the ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) and Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The full genome sequence of HPV-125 was deposited in GenBank through EMBL in September 2009 and can be accessed under acc. no. FN547152.

PCR fragments for the cloning of the full genome of HPV-125 were prepared with the Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) from the original clinical sample using

sequencing primer pairs 125-fpw5 and 125-rpw6, and 125-fpw14 and 125-rpw 15 (Table S1), giving 4,594-bp and 5,140-bp overlapping PCR fragments, respectively. Both PCR fragments were sequenced and their sequences were found to be identical to that of the larger 7,700-bp PCR fragment. Both PCRs were carried out in a 25 µl reaction volume containing 5 µl of extracted DNA, 2.5 µl of 10× Expand Long Template buffer 2 with 27.5 mM MgCl₂, 500 µM (each) of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.75 U of Expand Long Template Enzyme Mix, and 3 pmol of each primer. The thermal cycler program was set to 2 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 10 s at 94°C, 30 s at 56°C and 6 min at 68°C. The final extension step was performed at 68°C for 10 min and the reaction mixtures were then cooled to 4°C.

Before cloning, PCR products were run on gel electrophoresis, excised and purified from 1% agarose gel using a GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Plasmid clones containing overlapping PCR products were prepared using a CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas) was used to transform *E. coli* strain JM107 with the plasmids, according to the manufacturer's instructions.

Plasmid clones isolated from the transformed overnight bacterial culture with the GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) were checked for correct inserts by size analysis and sequencing with the pJET1.2 sequencing primers, according to the manufacturer's instructions. Full sequencing by primer walking was carried out for two clones, confirming the previously determined full sequence of the HPV-125 genome. Both clones, together covering the full genome of HPV-125, were deposited in the Reference Centre for Papillomaviruses, Heidelberg, Germany in September 2009, where they were re-sequenced and the novel genotype was assigned its number in October 2009.

ORF and phylogenetic analysis

The ORFs of HPV-125 were determined using the ORF finder function of Vector NTI Advance™ v 11.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and pairwise comparison of genes of closely related HPV genotypes.

In order to phylogenetically place HPV-125, a multiple sequence alignment of L1 ORF of HPV-125 and 116 previously characterized HPV types available [1,2], was constructed using the Alignment explorer program of the MEGA4 software package [17,18], at the nucleotide level. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the alignment, leaving 1,171 nucleotide positions in the final dataset.

All further phylogenetic analyses were also conducted by using MEGA4 [17,18]. The evolutionary history was inferred by using the Minimum Evolution (ME) method [19]. The evolutionary distances (in units of the number of base substitutions per site) were computed by using the Maximum Composite Likelihood method [18] and the Neighbor-joining algorithm [20] was used to generate the initial tree. The ME tree was searched using the Close-Neighbor-Interchange algorithm [21] at a search level of 1.

The optimal tree with the sum of branch length = 14,14565449 was used for Figure 1, the tree remaining drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The tree was bootstrap re-sampled 1,000 times.

Additionally, Maximum Parsimony analysis of the same dataset was conducted (data not shown), using the Close-Neighbor-Interchange algorithm to search for the optimal tree, also by using the MEGA 4 software package, which also grouped HPV-125 within the *Alphapapillomavirus* species 2.

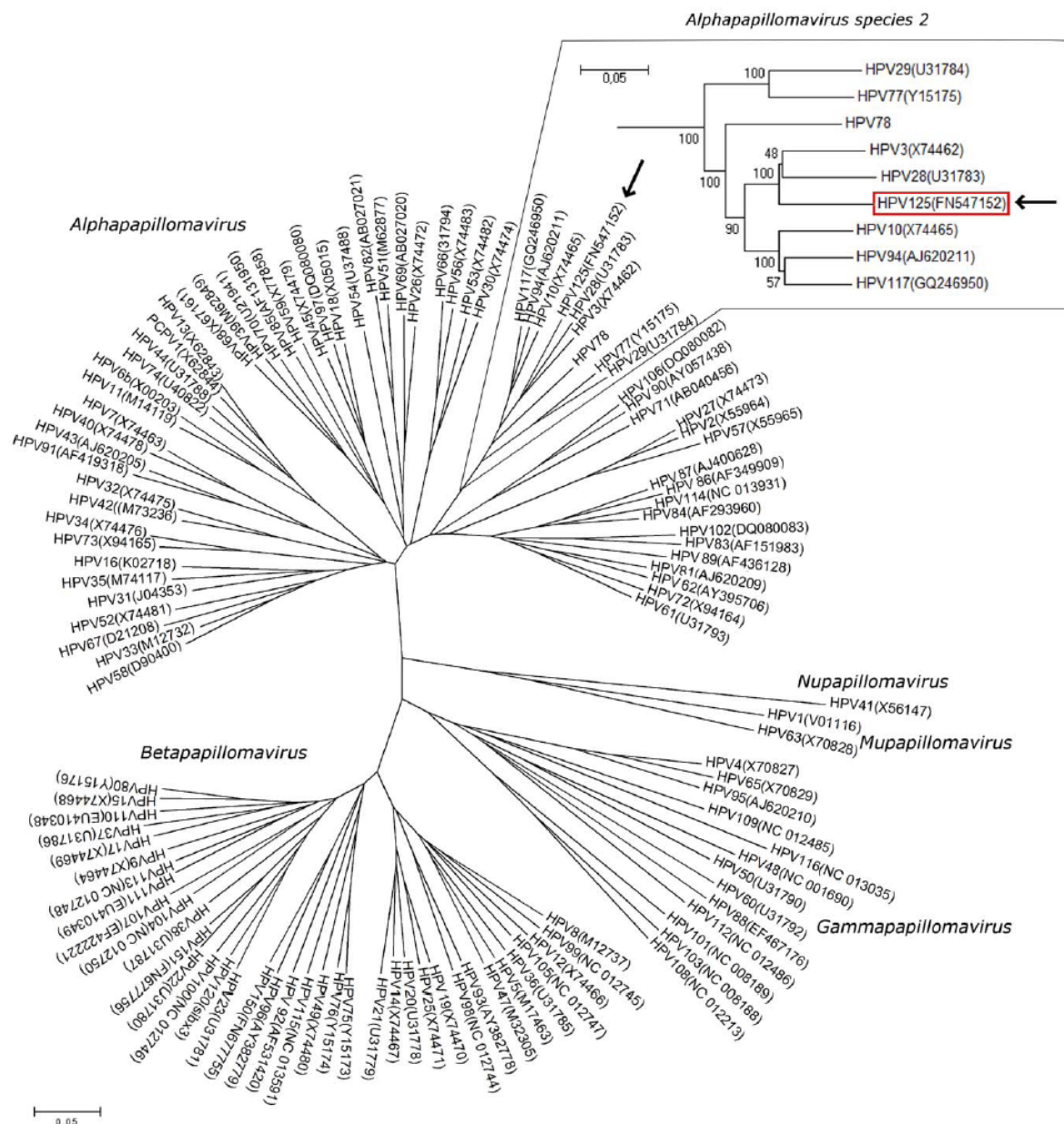


Figure 1. A consensus phylogenetic tree of 117 HPV L1 sequences. The evolutionary history was inferred using the Minimum Evolution method [19] and the consensus tree was inferred from 1,000 bootstrap replicates. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [18] and are in units of the number of base substitutions per site. Bootstrap values for members of *Alphapapillomavirus* species 2 are given above the main tree. The GenBank account numbers of the HPV genotypes are given next to the genotypes' name, where available.
doi:10.1371/journal.pone.0022414.g001

In order to compare HPV-125 more closely with other genotypes of the *Alphapapillomavirus* species 2, pairwise sequence alignments (both nucleotide and amino acid) were carried out and percentage similarity was calculated for each of the viral genes (E6, E7, E1, E2, L1 and L2) between HPV-125 and each of the genotypes for which full genomic sequences were available (HPV-

3, HPV-10, HPV-28, HPV-29, HPV-77, HPV-94 and HPV-117), by using the BioEdit v7.0.9.0. software package [22].

HPV-125 type specific real-time PCR

The primers 125-RT-L1-F (5'- GGTTACCCGACCCAAA-TAAGT -3', nucleotide positions 5,851–5,871) and 125-RT-L1-R

(5'-TCGGCGTCAGGATTATAGATG-3', nucleotide positions 5,891–5,911), specific for HPV-125, were chosen within the L1 gene by using the on-line ProbeFinder software (Roche Applied Science). FAM-labeled Universal Probe nr. 14 (Roche Applied Science) was used to detect the specific products in the real-time reaction.

The plasmid reference clone of HPV-125, containing the entire L1 sequence, was used to optimize the RT-PCR conditions and to evaluate the linearity, lower detection limit and reproducibility of the assay. The number of starting plasmid copies/ μ l was calculated from the concentration of plasmid DNA, quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, UK), as described previously [23].

The optimized RT-PCR reaction mixture contained 10 μ l of LightCycler® Probes Master 2 $\times$ conc. (Roche Applied Science), 0.2 μ M of each primer, 0.05 μ M of Universal Probe nr. 14 (Roche Applied Science), 1 U of LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (Roche Applied Science), sample DNA and water up to a final volume of 20 μ l. The assay was performed on a LightCycler® 480 real-time PCR Instrument (Roche Applied Science) under the following conditions: Uracil-N-Glycosylase activation at 40°C and pre-incubation at 95°C for 10 min each, followed by 45 cycles at 95°C for 10 s (denaturation) and 60°C for 30 s (annealing/extension). Acquisition of the fluorescence signal (FAM 465–510 nm) was performed during each annealing/extension step. The final cooling step consisted of a 10 s hold at 40°C.

To evaluate the linearity of the RT-PCR assay, ten-fold serial dilutions of the reference plasmid were prepared in 1.5 ml DNA LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) using a water solution with carrier RNA (1 μ g/ml) and tested in triplicate. The limit of detection of the assay was determined by testing 15 replicates of the reference plasmid dilutions corresponding to an input of 25, 13, 6, 3, 1.5, 0.8 and 0.4 copies per reaction and calculated by Probit analysis using SPSS software v.15.0.0.0 (SPSS GmbH Software, Munich, Germany). Intra- and inter-assay reproducibility of the RT-PCR were assessed by testing triplicates of plasmid dilutions corresponding to an input of 100 and 10 copies per reaction, in three independent runs.

To ensure specificity and to check for cross-reactivity of RT-PCR, 10⁷ to 10⁸ copies of reference clones or synthetic L1 sequences (inserted into plasmid pUC57, by Genscript, Piscataway, USA) of HPV-2, HPV-3, HPV-7, HPV-10, HPV-27, HPV-28, HPV-29, HPV-40, HPV-43, HPV-77, HPV-78, HPV-91 (kindly provided by E.-M. de Villiers, T. Matsukura and R. Burk) were tested.

Clinical samples

The tissue predilection and clinical significance of HPV-125 were assessed on a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles. The DNA was isolated from a total of 601 samples obtained from the same number of patients, including tissue samples of histologically confirmed cervical squamous cell carcinoma (104), laryngeal papilloma (85), genital warts (71), common warts (102), squamous cell carcinoma (SCC) of the skin (52) basal cell carcinoma (BCC) of the skin (49) and hair follicles (138), as described previously [24,25]. The quality of isolated DNA and absence of amplification inhibitors were determined by testing for the 268-bp or 110-bp fragment of human beta-globin using RT-PCR, as described previously [24]. The number of diploid human cells for the HPV-125 positive tissue samples was calculated from the beta-globin concentration, as described previously [26]. All positive results of the HPV-125 RT-PCR assay were confirmed by sequencing.

The presence of additional HPV genotypes in HPV-125 positive samples was determined using two commercial line-probe assays: RHA skin (beta) HPV (Diassay B.V., Rijswijk, The Netherlands), which allows identification of 26 different *Betapapillomavirus* HPV genotypes, and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Gent, Belgium), which allows identification of 28 different *Alphapapillomavirus* HPV genotypes, and additionally by three consensus in-house PCRs using Ma/Ha [27], CPI/CPIIs [28] and GP 5+/6+ [29] primers and sequencing of PCR-products.

Ethics Statement

None of the 601 clinical samples were collected solely for the purpose of this study. All samples included in the study were collected in compliance with the Helsinki declaration. Samples of cervical cancer, hair follicles, genital warts and common warts were collected prospectively in our previous studies. These studies were approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of Republic of Slovenia (Consent references 34/11/06, 83/11/09, 174/05/09, 97/11/09 and 100/12/09) and written informed consent was obtained for each patient. Samples of laryngeal papillomas, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin were retrieved from the tissue collection of paraffin-embedded samples of the Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana. Approval from Institutional Review Board of the Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana was obtained prior to starting work on samples included in this study. In accordance with national legislation of the Republic of Slovenia no informed consent is needed for research on archival clinical samples. In order to protect the identity of the patient, all archival clinical samples used in the study were coded and tested anonymously. The only available data were patient gender, age and immune status (if collected during the original study).

Results and Discussion

HPV-125 was detected in 2004 in the biopsy specimen of a hand wart obtained from a 19 year-old immuno-competent male patient at the Department of Dermatovenereology, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia. It was initially identified as a putative novel HPV genotype by the use of HVP2/B5 primers [13,14], designed to detect various cutaneous HPVs, with which a 474-bp sequence of the L1 gene was amplified and sequenced. This partial L1 sequence was deposited in GenBank as strain SIBX9 (Acc. No. AJ810860) in August 2004 [16]. In addition to HPV-125, the original clinical sample also contained genotypes HPV-8 and HPV-22, as identified by the use of Ma/Ha [27], and CPI/CPIIs [28] primers and sequencing, respectively.

By using PCR amplification, the complete genome of HPV-125 was cloned and deposited in the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, Germany, where the genomic sequence of HPV-125 was independently confirmed and the novel genotype was assigned its name in October 2009, according to the consecutive number of characterization.

The full genome of HPV-125 was determined to be 7,809-bp in length with a GC content of 46.4%. Phylogenetic comparisons of the HPV-125 complete L1 sequence with L1 sequences of 116 HPV genotypes place HPV-125 within the *Alphapapillomavirus* species 2, closest to HPV-3 and HPV-28 (Figure 1). Additional pairwise alignment of HPV-125 L1 nucleic acid and amino acid sequences with corresponding sequences of HPV-3 and HPV-28 (Table 1) revealed that HPV-125 is most closely related to HPV-3.

Further sequence analysis revealed that HPV-125 has a genomic organization typical of the *Alphapapillomavirus* genus

Table 1. Percentage similarity between E6, E7, E1, E2, L1, L2 genes of HPV-125 and closely related HPVs from species 2 of *Alphapapillomaviruses*.

HPV-125	HPV-3	HPV-10	HPV-28	HPV-29	HPV-77	HPV-94	HPV-117
E6							
nt	84.8 ^a	79.9 ^a	83.2 ^a	71.8 ^a	76.7 ^a	80.8 ^a	77.9 ^a
aa	82.4	73.8	83.0	65.1	74.5	77.9	72.5
E7							
nt	90.2 ^a	86.4	90.9	81.0	81.0	89.4	86.4
aa	81.8	80.7	86.4	73.6	73.6	85.2	78.4
E1							
nt	88.6	81.0	86.0	80.9	80.1	80.6	80.9
aa	87.5	79.8	88.1	82.7	80.6	80.3	80.2
E2							
nt	86.4	77.8	84.3	75.0	75.7	78.7 ^a	79.7
aa	82.3	74.0	79.2	69.2	70.0	73.5	74.5
L1							
nt	85.4	80.0	83.9	74.4 ^a	74.3 ^a	79.3	80.3
aa	90.8	86.4	88.7	81.9	80.0	84.0	85.4
L2							
nt	85.6	79.9	82.9	74.8	75.0 ^a	75.0	76.7
aa	90.1	85.3	87.6	78.6	77.4	80.9	82.0

nt – nucleotide.

aa – aminoacid.

^aORFs not equal in length – similarity was calculated from the first common ATG of the two genotypes.

doi:10.1371/journal.pone.0022414.t001

(Figure 2) and contains genes coding for five early proteins E6, E7, E1, E2 and E4 (E1+E4), L1 and L2. The genome of the HPV-125 also contains two non-coding regions; the classic non-coding long control region (LCR) located between the L1 and E6 genes (nucleotide positions 7,137–7,809, length 673-bp) and a second non-coding region located between genes E2 and L2 (nucleotide positions 3,757–4,216, length 460-bp). Typical features of the LCR of HPV-125 are shown in Figure 3.

The percentage similarity of nucleotide and amino acid sequences of the six viral genes of HPV-125 shared by other HPV genotypes from *Alphapapillomavirus* species 2 is shown in

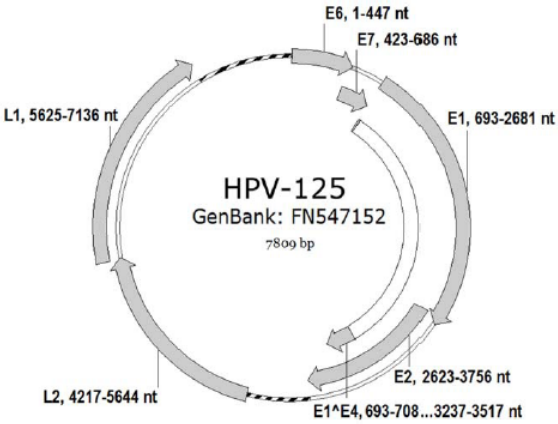


Figure 2. Genomic organisation of HPV-125. Genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, E4 (E1+E4), L1 and L2 are indicated next to the respective gene. The non-coding regions located between L1 and E6 (LCR); and E2 and L2 are indicated with a dotted line.
doi:10.1371/journal.pone.0022414.g002

Table 1. The nucleotide and amino acid sequences of the late genes L1 and L2 and the early gene E2 of HPV-125 showed the highest similarity to the corresponding genes of HPV-3. However, the early gene E7 of HPV-125 was more similar to E7 of HPV-28, than to E7 of HPV-3 (Table 1) in both nucleotide and amino acid sequences. The nucleotide sequence of the early gene E6 of HPV-125 showed the highest similarity to E6 of HPV-3, while its amino acid sequence was slightly more similar to the E6 protein of HPV-28. Similarly, the nucleotide sequence of the early gene E1 of HPV-125 showed the highest similarity to E1 of HPV-3, while the amino acid sequence was more similar to the E1 protein of HPV-28. Given that HPV-3, HPV-28 and HPV-125 are the most closely related genotypes within *Alphapapillomavirus* species 2, this could either reflect a recombination event or a different evolutionary divergence of the early and late genes of these three genotypes from their most recent common ancestor.

In silico analysis showed that the E6 protein of HPV-125 contains two regular zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CxxC) at amino acid positions 29 and 102, whereas the E7 protein of HPV-125 exhibits one such domain at position 50 (Figure 4). Like several other genotypes from *Alphapapillomavirus* species 2 [30],

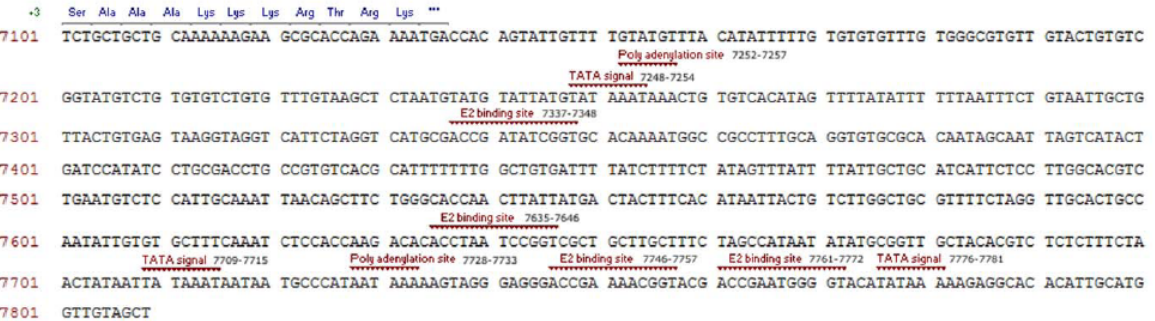


Figure 3. Characteristic features of the long control region (LCR) of HPV-125. The genomic locations of E2 binding sites (ACC-N₅₋₇-GGT), polyadenylation sites (AATAAA), and TATA signals (TATAAA or TATA(A/T)A(A/T)) are indicated on the coding strand.
doi:10.1371/journal.pone.0022414.g003

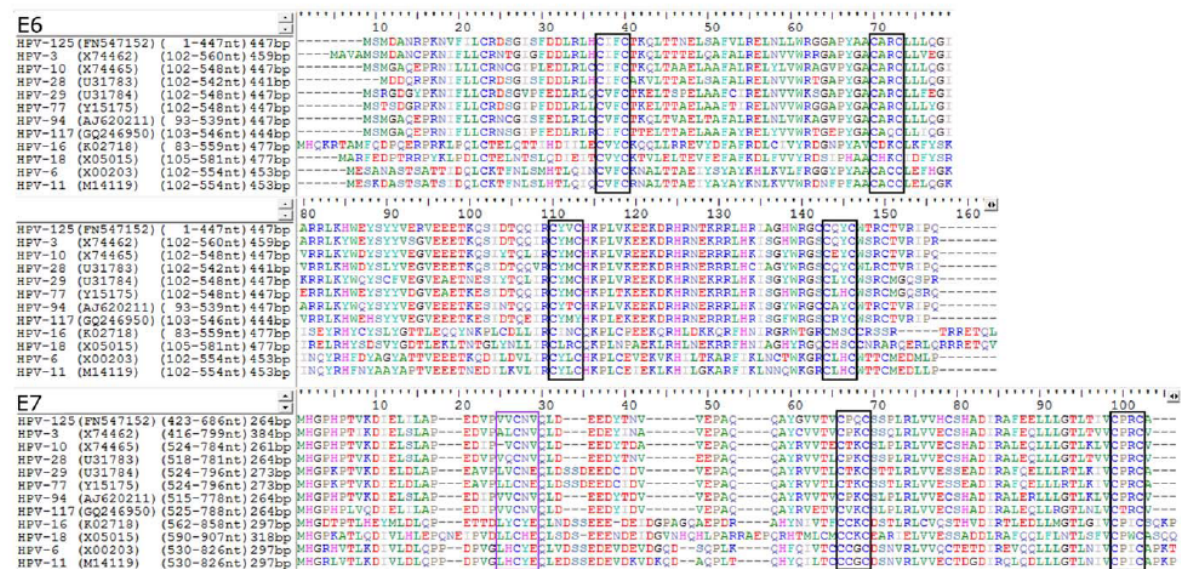


Figure 4. Amino acid alignment of HPV-125 E6 and E7 proteins with corresponding proteins of closely related genotypes from *Alphapapillomavirus* species 2 and genotypes HPV-16, HPV-18, HPV-6 and HPV-11. Black boxes indicate the location of zinc-binding domains (CxxC(x)2CxxC) in both E6 and E7 amino acid alignments. The purple box indicates the location of the pRb-binding core sequence (LxCxE), absent in several *Alphapapillomavirus* species 2 genotypes [30], including HPV-125.
doi:10.1371/journal.pone.0022414.g004

HPV-125 lacks the regular pRb-binding core sequence (LxCxE) [8,10–12,30,31] within its E7 protein (Figure 4).

HPV-125, similarly to HPV-28 possesses an approximately 300-bp long E4 ORF at genomic location 3,215–3,517. However, it is likely that the E4 protein of HPV-125 is actually translated from a spliced mRNA consisting of the first few codons of the E1 ORF joined to the E4 ORF (E1+E4 CDS consisting of genomic positions 693..708 and 3,237..3,517 nt) as was determined for other better-characterized *Alphapapillomavirus*.

Unlike most HPV genotypes from genus *Alphapapillomavirus*, which have a mucosal tropism, members of *Alphapapillomavirus* species 2 (HPV-3, HPV-10, HPV-28, HPV-29, HPV-77, HPV-78, HPV-94 and HPV-117) exhibit cutaneous tropism [8–12,14,30]. The two genotypes of species 2, HPV-3 and HPV-10, were among the first HPVs to be characterized and were both isolated from scrapings of hand lesions, resembling flat warts, from immuno-compromised individuals with *epidermodysplasia verruciformis* [8]. In addition, these two genotypes were later found to be associated with flat warts of immuno-compromised, as well as immuno-competent individuals [9]. HPV-28 was first found in a case of butcher's warts [10], while HPV-29 was first detected in a common skin wart [11]. HPV-77 was first isolated from a benign wart but has also been found in several cases of dysplastic warts and SCC of the skin in renal-transplant recipients [12]. HPV-94 (DL40) was isolated from malignant skin tumor of a renal-transplant recipient [15]. HPV-117 was isolated from a common wart of an organ-transplant recipient, and was shown to be persistent over 24 months [30]. Based on the data acquired so far [8–12,14,30], members of *Alphapapillomavirus* species 2 seem to be associated predominantly with flat and common warts in immuno-competent individuals, while some genotypes belonging to this species also have the potential to cause malignant transformation in immuno-compromised hosts.

In order to assess the biological and clinical importance of HPV-125, a quantitative HPV-125 type-specific RT-PCR assay was developed, based on amplification of a 61-bp region of the HPV-125 L1 gene (Table S1). The standard curve of the assay showed an excellent correlation coefficient ($R^2 = 1.00$) between the Ct (threshold) and the log of starting viral copy number, across at least seven orders of magnitude. The 95% limit of detection of the assay was 2.5 copies per reaction (range 1.7–5.7) and the intra and inter-assay coefficient of variation (CV (%) = (st.dev/mean Ct)*100) was 0.47 and 2.00 for 100 copies per reaction, and 1.15 and 2.15 for 10 copies per reaction, respectively. The assay showed no cross-

Table 2. Clinical samples tested for the presence of HPV-125.

Tissue type	Sample type	No. of samples tested	No. (%) of HPV-125 positive samples
Mucosal	Genital warts	71	0 (0)
	Laryngeal papillomas	85	0 (0)
	Cervical cancer	104	0 (0)
Cutaneous	Common warts	102	2 (1.96)
	Squamous cell carcinoma of the skin	52	0 (0)
	Basal cell carcinoma of the skin	49	0 (0)
Hair follicles		138	1 (0.72)
Total		601	3 (0.50)

doi:10.1371/journal.pone.0022414.t002

Table 3. Characteristics of HPV-125 positive samples and patients.

Sample type	Histology result	Age	Gender	Viral genomes/No. of human cells	Presence of other HPV's
Common wart	Verruca vulgaris	19	Male	2,61×10 ³ /1	HPV-8, HPV-22
Common wart	Verruca vulgaris	24	Male	1,28×10 ⁵ /1	None
Hair follicle	/	29	Male	Nd.	HPV-10, HPV-36

All HPV-125 positive samples were obtained from immuno-competent individuals.
Nd. – not determined.
doi:10.1371/journal.pone.0022414.t003

reactivity with any of the tested non-targeted cutaneous HPV genotypes, including HPV-2, HPV-3, HPV-7, HPV-10, HPV-27, HPV-28, HPV-29, HPV-40, HPV-43, HPV-77, HPV-78 and HPV-91 in concentrations of 10⁷–10⁸ viral copies per reaction.

Because phylogenetic relationships between HPV genotypes do not necessarily always reflect their tissue tropism, and to assess the clinical significance of HPV-125, a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles were tested for the presence of HPV-125 using type-specific RT-PCR. The sample collection was chosen to represent various sites of HPV infection (mucosal/cutaneous) and possible outcomes of HPV infection (benign/malignant lesions) (Table 2). The panel of samples thus included the most important HPV-associated malignant neoplasms of mucosal (cervical squamous cell carcinoma) and cutaneous (SCC and BCC of skin) origin, the most important HPV-associated benign neoplasms of mucosal (genital warts, laryngeal papillomas) and cutaneous (common warts) origin and, in addition, hair follicles known to be a main reservoir of usually harmless 'commensal' HPV genotypes in immuno-competent individuals [27,32].

As shown in Table 2, none of the 260 mucosal samples tested (cervical carcinomas, genital warts and laryngeal papillomas) were positive for HPV-125. These findings indicate that HPV-125, in agreement with its phylogenetic placement within *Alphapapillomavirus* species 2, does not exhibit mucosal tropism.

Of the 102 samples of common warts tested, two samples (1.96%) contained HPV-125, indicating the cutaneous tropism of this genotype (Table 2). In the first sample, due to the presence of *Betapapillomavirus* genotypes HPV-8 and HPV-22, both known to be cutaneous HPV genotypes, the development of this common wart could not conclusively be attributed to HPV-125. In contrast, in the second sample, HPV-125 was the only HPV genotype detected, despite the use of several HPV genotyping assays, targeting a range of *Alphapapillomavirus* and *Betapapillomavirus* genotypes, which supports the causative role of HPV-125 in the development of this common wart (Table 3). In addition, in both HPV-125 positive common warts, a very high HPV-125 viral load was observed, indicating the presence of productive HPV-125 infection.

HPV-125 was not detected in any of the 101 samples of malignant tumors of the skin tested. This finding may be due either to the lack of HPV-125 potential for malignant transformation, or to the rarity of this genotype in immuno-competent individuals. The results obtained indicate that HPV-125 does not seem to be an important non-melanoma skin cancer causing genotype, although the possibility of HPV-125 contributing to the

development of malignant skin lesions in immuno-compromised individuals cannot be finally excluded, due to the rarity of the genotype and the number of samples tested so far.

Of the 138 hair follicle samples tested, a single hair follicle sample contained HPV-125. This sample also contained two additional HPV genotypes, HPV-10 and HPV-36, consistent with the current knowledge that HPV's are ubiquitous in hair follicles and that hair follicles represent a viral reservoir in immuno-competent individuals. Similarly to other members of *Alphapapillomavirus* species 2, it is possible that HPV-125 is significantly more frequent in immuno-compromised individuals [8–12,14,30]; however, this remains to be determined in further studies.

In conclusion, the characterization of the novel HPV genotype HPV-125 improves our knowledge about the cutaneotropic *Alphapapillomavirus* species 2, which is phylogenetically nested deep within the predominantly mucosotropic *Alphapapillomaviruses*. HPV-125 is a relatively rare HPV genotype with cutaneous tropism, etiologically linked with sporadic cases of common warts.

Supporting Information

Table S1 Nt: nucleotide position, Cw: clockwise orientation, Ccw: counter-clockwise orientation.
(DOC)

Acknowledgments

We are grateful to Ethel-Michelle de Villiers for confirmatory analysis of the HPV-125 clones at the Reference Centre for Papillomaviruses, Heidelberg, Germany, and also for providing us with the reference clones of HPV-2, HPV-3, HPV-7, HPV-27, HPV-40, HPV-57, HPV-77 and HPV-94. We thank Toshihiko Matsukura for providing the reference clone of HPV-78, and Robert D. Burk for providing the reference clone of HPV-91. We would also like to thank Branko Pirš, Nina Jančar and Eda Vrtačnik Bokal for the collection of clinical samples, and Boštjan Luzar and Nina Gale for the histological assessment.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AK BJK M. Potocnik M. Poljak. Performed the experiments: AK BJK. Analyzed the data: AK M. Poljak. Contributed reagents/materials/analysis tools: M. Poljak. Wrote the paper: AK M. Poljak. Collection of the clinical sample in which HPV-125 was initially detected: M. Potocnik. Identification of 474-bp sequence of the HPV-125 L1 gene and its initial characterization: BJK. Cloning and final characterization of the whole genome of the HPV-125: AK.

References

- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
- Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70–79.
- Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, et al. (2003) Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84: 1881–1886.
- Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, et al. (2007) Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 127: 116–119.

5. (2007) Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 90: 1–636.
6. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, et al. (2009) A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10: 321–322.
7. Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, Leigh IM, de Villiers EM, et al. (1999) Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol* 37: 3545–3555.
8. Krensford D, Jablonska S, Favre M, Orth G (1983) Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *J Virol* 48: 340–351.
9. Jablonska S, Orth G, Obalek S, Croissant O (1985) Cutaneous warts. Clinical, histologic, and virologic correlations. *Clin Dermatol* 3: 71–82.
10. Favre M, Obalek S, Jablonska S, Orth G (1989) Human papillomavirus type 28 (HPV-28), an HPV-3-related type associated with skin warts. *J Virol* 63: 4905.
11. Favre M, Croissant O, Orth G (1989) Human papillomavirus type 29 (HPV-29), an HPV type cross-hybridizing with HPV-2 and with HPV-3-related types. *J Virol* 63: 4906.
12. Delius H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM (1998) The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology* 240: 359–365.
13. Shamanin V, Delius H, de Villiers EM (1994) Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *J Gen Virol* 75: 1149–1156.
14. Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, et al. (1994) Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res* 54: 4610–4613.
15. de Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC (1997) Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 73: 356–361.
16. Kocjan BJ, Seme K, Fujs-Komloš K, Potočnik M (2004) Distribution of human papillomavirus genotypes in Slovenian patients with common cutaneous warts. In: Final program and abstracts of the International symposium on cutaneous HPV infection and development of skin cancer. Venice, Italy, 16 p.
17. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
18. Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11030–11035.
19. Rzhetsky A, Nei M (1992) A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol Biol Evol* 9: 945–967.
20. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
21. Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 333 p.
22. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
23. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278: 261–269.
24. Jančar N, Kocjan BJ, Poljak M, Lunar MM, Bokalič EV (2009) Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 145: 184–188.
25. Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, Potočnik M, Fujs K, et al. (2005) Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infect Genet Evol* 5: 255–259.
26. Hazard K, Eliasson L, Dillner J, Forslund O (2006) Subtype HPV38b[FA125] demonstrates heterogeneity of human papillomavirus type 38. *Int J Cancer* 119: 1073–1077.
27. Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, et al. (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 108: 712–715.
28. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck JN, Berkhout RJ, et al. (1993) Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* 42: 265–279.
29. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76: 1057–1062.
30. Köhler A, Gottschling M, Förster J, Röwert-Huber J, Stockfleth E, et al. (2010) Genomic characterization of a novel human papillomavirus (HPV-117) with a high viral load in a persisting wart. *Virology* 399: 129–133.
31. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2006–2011.
32. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Serner G, Hansson BG (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensal nature of these viruses. *J Virol* 74: 11636–11641.

PRILOGA B: Characterization of novel human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151.

OPEN ACCESS Freely available online



Characterization of Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotypes HPV-150 and HPV-151

Anja Kovanda¹, Boštjan J. Kocjan¹, Boštjan Luzar², Ignacio G. Bravo^{3,4,5}, Mario Poljak^{1*}

1 Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, **2** Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, **3** Unit of Infections and Cancer, Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **4** CIBER Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain, **5** Genomics and Health Centre for Public Health Research (CSISP), Valencia, Spain

Abstract

DNA from two novel HPV genotypes, HPV-150 and HPV-151, isolated from hair follicles of immuno-competent individuals, was fully cloned, sequenced and characterized. The complete genomes of HPV-150 and HPV-151 are 7,436-bp and 7,386-bp in length, respectively. Both contain genes for at least six proteins, namely E6, E7, E1, E2, L2, L1, as well as a non-coding upstream regulatory region located between the L1 and E6 genes: spanning 416-bp in HPV-150 (genomic positions 7,371 to 350) and 322-bp in HPV-151 (genomic positions 7,213 to 148). HPV-150 and HPV-151 are phylogenetically placed within the *Betapapillomavirus* genus and are most closely related to HPV-96 and HPV-22, respectively. As in other members of this genus, the intergenic E2-L2 region is very short and does not encode for an E5 gene. Both genotypes contain typical zinc binding domains in their E6 and E7 proteins, but HPV-151 lacks the regular pRb-binding core sequence within its E7 protein. In order to assess the tissue predilection and clinical significance of the novel genotypes, quantitative type-specific real-time PCR assays were developed. The 95% detection limits of the HPV-150 and HPV-151 assays were 7.3 copies/reaction (range 5.6 to 11.4) and 3.4 copies/reaction (range 2.5 to 6.0), respectively. Testing of a representative collection of HPV-associated mucosal and cutaneous benign and malignant neoplasms and hair follicles (total of 540 samples) revealed that HPV-150 and HPV-151 are relatively rare genotypes with a cutaneous tropism. Both genotypes were found in sporadic cases of common warts and SCC and BCC of the skin as single or multiple infections usually with low viral loads. HPV-150 can establish persistent infection of hair follicles in immuno-competent individuals. A partial L1 sequence of a putative novel HPV genotype, related to HPV-150, was identified in a squamous cell carcinoma of the skin obtained from a 64-year old immuno-compromised male patient.

Citation: Kovanda A, Kocjan BJ, Luzar B, Bravo IG, Poljak M (2011) Characterization of Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotypes HPV-150 and HPV-151. PLoS ONE 6(7): e22529. doi:10.1371/journal.pone.0022529

Editor: Jean-Pierre Vartanian, Institut Pasteur, France

Received: May 11, 2011; **Accepted:** June 23, 2011; **Published:** July 25, 2011

Copyright: © 2011 Kovanda et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: A.K. is funded by the Young Researcher Training Program of the Slovenian Research Agency and the Ministry of Health and B.J.K. is funded through grant Z3-0220-0381-08. I.G.B. is funded by the Spanish MICINN (Ramón y Cajal Program, and CGL2010-16713). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mario.poljak@mf.uni-lj.si

Introduction

Papillomaviruses (PVs) are a diverse family of small viruses with a circular double stranded DNA genome, which are etiologically linked with several skin and mucosal epithelial lesions of animals and humans. They are hierarchically classified into categories designated as genera, species and genotypes [1]. To date, full genomes of more than 200 PV genotypes have been publicly deposited, of which roughly 150 have been detected in humans and are referred to as human PVs or HPVs [1,2]. Currently, HPVs are classified into five genera: *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Mu*- and *Nu*papillomavirus [1].

According to the 2004 guidelines for PV nomenclature, published by the Study Group of Papillomaviruses of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), in order to be officially recognized as a unique genotype, a candidate PV isolate must differ by at least 10% of its complete gene coding for the major capsid protein (L1 gene) from all other known genotypes, and its complete genome must be sequenced and deposited in the form of clones to the Reference Centre for Papillomaviruses in Heidelberg, Germany [2]. The guidelines

issued in 2010 have refrained from strict identity boundaries and have suggested instead the introduction of phylogenetic relationships as a guiding criterion [1]. Traditionally, PV genomic sequences have been obtained directly from epithelial lesions, using cloning methods, which are mainly suitable for characterization of HPV genotypes present in clinical samples in high viral copy numbers [2]. As the field of molecular biology evolved, polymerase chain reaction (PCR), rolling circle amplification, whole genome amplification and, recently, shotgun sequencing have been added to the repertoire of methods used in identification of novel PVs [3,4]. These technologies have enabled the identification and characterization of many recently identified PVs, especially those present in minute quantities in clinical samples.

Cutaneous HPV genotypes are found within all five PV genera that contain HPVs. They are ubiquitously present in human skin and in the hair follicles of immuno-competent individuals [5–7], but can occasionally cause various, predominantly benign skin lesions, including cutaneous warts, e.g. common warts or *verrucae vulgaris* [8]. In hosts with primary immuno-deficiency or with a genetic predisposition, cutaneous HPVs – especially *Betapapilloma*-

viruses - can cause serious clinical manifestations, such as numerous benign and malignant tumors in patients with the hereditary disease *epidermodysplasia verruciformis* [9]. In immuno-suppressed patients, such as renal transplant recipients, infection with cutaneous HPVs can similarly lead to the development of various benign and malignant skin tumors [10–14]. Additionally, several *Beta*papillomavirus HPVs, such as HPV-22, HPV-38, HPV-92 or HPV-96, have been etiologically linked with the development of squamous cell carcinoma of the skin [15–18]. Several cutaneous HPVs have also been linked with actinic keratosis, Bowen's disease and non-melanoma skin cancer in connection with UV-damage in immuno-competent hosts [19,20].

In the last decade, several studies have shown that HPV DNA can be recovered from healthy skin in humans from very early stages of life [6,21], that skin infections with multiple HPV genotypes are very common [7,22,23] and that several recently identified cutaneous HPVs may not be associated with any clinical manifestations [5,24]. In view of these facts, the clinical significance of any novel HPV genotype needs to be carefully examined.

In this study, two novel HPV genotypes: HPV-150 and HPV-151, isolated originally from eyebrow hair follicles (isolates SIBX1 and SIBX2, respectively) and initially characterized by our group in 2005 [25], were fully cloned, sequenced and characterized. In addition, two quantitative type-specific real-time PCRs were developed and a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles was tested in order to assess the tissue predilection and clinical significance of the novel HPV genotypes.

Materials and Methods

The original isolates of HPV-150 (SIBX1) and HPV-151 (SIBX2) were obtained from eyebrow hair follicles of two immuno-competent males, aged 28 and 25 years, respectively, during our previous study of HPV distribution in eyebrow hair follicles of patients with genital warts [25]. The original SIBX1 positive eyebrow hair follicle sample was used for cloning HPV-150 [25], and a SIBX2 positive sample of scrotal hair, obtained in 2003 from a healthy 23-year-old male individual was used for cloning of HPV-151 [7]. In both cases, DNA was isolated from clinical samples by using a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Whole genome amplification (WGA) of both HPV-150 and HPV-151 was performed prior to PCR amplification, by using an Illustra™ TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Amersham, UK), according to the manufacturer's instructions. Following the amplification, the WGA product was diluted 200x fold with PCR-grade H₂O.

Amplification, sequencing and cloning of HPV-150

Primers for the reverse long template PCR of HPV-150 were constructed manually on the basis of the previously obtained 373-bp sequence of the HPV-150 L1 gene (GenBank Acc. No. AJ606880). A 7,367-bp PCR product of HPV-150 was generated using primer pair X1-longF and X1-longR (Table S1) and the Expand Long Template PCR System (Roche Applied Bioscience, Mannheim, Germany) on a PE9700 Thermo Cycler (Perkin Elmer Applied Biosystems Inc, Foster City, CA).

PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 5 µl of diluted WGA product, 2.5 µl of 10x Expand Long Template buffer 2 with 27.5 mM MgCl₂, 500 µM of dNTPs, 0.75 U of Expand Long Template Enzyme Mix, and 3 pmol of each primer.

The thermal cycler program was set to 2 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 10s at 94°C, 30 s at 53°C, and 8 min at 68°C. The final extension step was performed at 68°C for 10 min and the reaction mixtures were then cooled to 4°C.

Initial sequencing of the 7,367-bp HPV-150 PCR fragment was done by primer walking (primers are listed in Table S1) using the ABI Prism® 310 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems), and Big Dye® Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

In order to clone the complete genome of HPV-150, two overlapping blunt-end PCR products of sizes 3,465-bp and 4,375-bp were generated using primer pairs X1F18 and X1R18; and X1F5 and X1R5, respectively (Table S1). Both blunt-end PCR products were generated using KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Toyobo Novagen, EMD Biosciences Inc., San Diego, CA).

PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 1 µl of diluted WGA product, 12.5 µl of 2x Xtreme Buffer, 500 µM (each) of dNTPs, 0.02 U of KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase, and 0.6 pmol of each primer. The thermal cycler program was set to 2 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 10 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 3 to 6 min at 68°C. Following amplification, the reaction mixtures were cooled to 4°C.

Before cloning, PCR products were excised and purified from 1% agarose gel using a GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Plasmids containing overlapping PCR products of HPV-150 were prepared using a CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), according to the manufacturer's instructions. A TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas) was used to transform *E.coli* strain JM107 with the HPV-150 clones, according to the manufacturer's instructions.

Plasmid clones isolated from the transformed overnight bacterial culture with a GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) were checked for correct HPV inserts by size analysis and sequencing with pJET1.2 sequencing primers, according to the manufacturer's instructions.

Sequencing by primer walking was carried out for both clones, confirming the full genome sequence of HPV-150. The obtained sequences were additionally confirmed by commercial sequencing of the selected clones at Macrogen Inc. (Seoul, Korea) and at Microsynth AG (Balgach, Switzerland).

All primers used in the study were designed manually and checked for Tm and secondary structures using NetPrimer (Premier Biosoft International) and TIB-Molbiol (Berlin, Germany) free web-based software. The 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' function of Primer-BLAST (NCBI) was used in order to check for the specificity of the primers.

Amplification, sequencing and cloning of HPV-151

In the case of HPV-151, the primers initially constructed on the basis of the previously obtained 367-bp sequence of the HPV-151 L1 gene (GenBank Acc. No. AJ606879) failed to amplify the remainder of the genome. In order to solve this problem, additional degenerate primers were designed, based on the genome of HPV-22, the genotype which was most closely related to HPV-151. An initial assessment of the primers was done by short PCR using the DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas UAB - Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), following the manufacturer's instructions. The amplified DNA was examined by gel electrophoresis and several degenerate primer pairs produced PCR products of the expected size, ranging from 100 to 1,328-bp. Following sequencing of these short amplicons, several additional primers, specific for the novel genotype HPV-151, were designed (Table S1). Finally, a 6,256-bp fragment of the

HPV-151 genome was amplified using the primer pair X2-L1For and X2-longR2, designed on the basis of the sequence obtained using degenerate primer pair HPV22-L1flmix and HPV22-L1-rlmix (Table S1), and the Expand Long Template PCR System on a PE9700 Thermo Cycler.

PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 1 µl of diluted WGA product, 2.5 µl of 10× Expand Long Template buffer 2 with 27.5 mM MgCl₂, 500 µM of dNTPs, 0.75 U of Expand Long Template Enzyme Mix and 3 pmol of each primer. The thermal cycler program was set to 2 min at 94°C, followed by 40 cycles consisting of 10 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 7 min at 68°C. The final extension step was performed at 68°C for 7 min and the reaction mixtures were then cooled to 4°C.

Initial sequencing of the 6,256-bp HPV-151 PCR fragment was done by primer walking with the primers listed in Table S1.

For cloning HPV-151, two overlapping blunt-end PCR products of sizes 2,785-bp and 5,481-bp were generated using primer pairs X2F17 and X2R17; and X2F3 and X2R3, respectively (Table S1) by using KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Toyobo Novagen, EMD Biosciences Inc.).

PCR conditions and the entire further cloning and sequencing procedure for HPV-151 were the same as described above for HPV-150.

ORF and phylogenetic analysis

All partial sequences obtained for HPV-150 and HPV-151 were assembled using ContigExpress of Vector NTI Advance™ v11.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The open reading frames (ORFs) of HPV-150 and HPV-151 were determined using the ORF finder function of Vector NTI Advance™ v11.0 and were additionally confirmed by genome organization analysis and comparison with closely related HPV genotypes using the BioEdit Sequence Alignment Editor [26].

The phylogenetic relationships of HPV-150 and HPV-151 within the PV family were determined based on the L1 gene. Briefly, L1 nucleic acid sequences were converted to protein sequences and aligned using MAFFT v6.832b (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) [27], reverse translated using Pal2Nal (<http://www.bork.embl.de/pal2nal/>) [28] and filtered using Gblocks (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks.html>) [29,30]. Maximum likelihood phylogenetic inference was conducted using RAxML version v7.2.8 [31–33] alpha (PTHREADS version) on an 2x CPU 6 core AMD Opteron 2431 with 12 GB RAM DDR2-800 (kindly provided free of charge by ABAKUS plus, Kranj, Slovenia). A generalized time-reversible (GTR) model with four gamma discrete rate categories and three partitions, one per codon position, was used for the analysis. One thousand bootstrap replicates were generated to determine node support for the best tree.

HPV-150 and HPV-151 type specific real-time PCRs

Primers and a probe specific for HPV-150 were chosen within the L1 gene by using the on-line ProbeFinder software (Roche Applied Science), resulting in a PCR product of 60-bp in length. Primers RT-150-F (5'- AGGCCTTACCTTGTGCTGAA -3', HPV-150 nucleotide positions 6,355 to 6,374) and RT-150-F (5'- TTAATTCTAAAGGAGGACATGAACC -3', HPV-150 nucleotide positions 6,390 to 6,414), together with FAM-labeled Universal Probe #50 (Roche Applied Science) were used for HPV-150 specific real-time PCR.

Primers and a probe specific for HPV-151 were chosen within the L1 gene by using the on-line ProbeFinder software (Roche Applied Science), resulting in a PCR product of 60-bp in length. FAM-labeled Universal Probe #127 (Roche Applied Science) was

used together with primers RT-151-F (5'- ATCAGCAACA-GATGGAGCAA -3', HPV-151 nucleotide positions 5,838 to 5,857) and RT-151-R (5'- GCTCTATACCTGGTCCCTGACAC -3', HPV-151 nucleotide positions 5,875 to 5,897) for HPV-151 specific real-time PCR.

The plasmid reference clones of HPV-150 and HPV-151, containing the L1 sequence, were used to optimize the real-time PCR conditions. Plasmid DNA concentration was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Oxfordshire, UK) and the number of plasmid copies/µl was calculated using the equation of Whelan et al. [34].

The optimized real-time PCR reaction mixture for both type-specific real-time PCRs contained 10 µl of LightCycler® Probes Master 2x conc. (Roche Applied Science), 0.2 µM of each primer, 0.05 µM of Universal Probe #50 or #127 (Roche Applied Science), 1U of LightCycler® Uracil-N-Glycosylase (Roche Applied Science), sample DNA and water up to a final volume of 20 µl. The assays were performed on a LightCycler® 480 (Roche) under the following conditions: Uracil-N-Glycosylase activation at 40°C and pre-incubation at 95°C for 10 min each, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s (denaturation) and 59°C for 30 s (annealing) and 72°C for 1 s (extension). Acquisition of the fluorescence signal was performed in single mode during the annealing step of each cycle. The final cooling step consisted of a 10 s hold at 40°C. The conditions of the real-time PCR for HPV-150 and HPV-151 were intentionally identical, since this allowed simultaneous testing of samples on the LightCycler® 480 (Roche).

To evaluate the linearity of the assays, triplicate ten-fold serial dilutions of the reference plasmids of HPV-150 and HPV-151 were prepared in 1.5 ml DNA LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) using a water solution with carrier RNA (1 µg/ml). The limits of detection of the assays were determined by testing 15 replicates of the reference plasmid dilutions corresponding to an input of 25, 13, 6, 3, 1.5, 0.8 and 0.4 copies per reaction.

The specificity and cross-reactivity of the assays were tested using 10⁷ to 10⁸ copies of synthetic partial L1 sequences (inserted into plasmid pUC57, by Genscript, Piscataway, USA) of the following *Betapapillomaviruses*: HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-38, HPV-80, HPV-100, HPV-111, HPV-113, HPV-120, HPV-122, HPV-92 and HPV-96.

Clinical samples

The tissue predilection and clinical significance of HPV-150 and HPV-151 were assessed on a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles. The DNA was isolated from a total of 540 samples obtained from the same number of patients, including tissue samples of histologically confirmed genital warts (71), laryngeal papillomas (78), cervical squamous cell carcinomas (100), common warts (101), squamous cell carcinoma (SCC) of the skin (52), basal cell carcinoma (BCC) of the skin (49) and hair follicles (89), as described previously [7,25,35–38]. The quality of isolated DNA and absence of PCR inhibitors were checked by amplification of a 110-bp fragment of human beta-globin, as described previously [36]. The number of human cells per µl of clinical sample in samples positive for HPV-150 or HPV-151 was calculated from the beta-globin concentration, as described previously [17], and used to determine the ratio between the number of viral genomes and human cells. All positive results of the HPV-150 and HPV-151 real-time PCRs were confirmed by sequencing.

The presence of additional HPV genotypes in HPV-150 and/or HPV-151 positive samples was determined using two commercial line-probe assays: INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Gent, Belgium), which allows identification of 28 different

Alphapapillomavirus genotypes; RHA skin (beta) HPV (Diassay B.V., Rijswijk, The Netherlands), which allows identification of 26 different *Betapapillomavirus* genotypes, and additionally by consensus GP5+/6+ in-house PCR and sequencing of PCR products [39].

Ethics Statement

None of the 540 clinical samples tested were collected solely for the purpose of this study. All samples included in the study were collected in compliance with the Helsinki Declaration. Samples of cervical cancer, hair follicles, genital warts and common warts were collected prospectively in our previous studies. These studies were approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of the Republic of Slovenia (consent references 34/11/06, 83/11/09, 174/05/09, 97/11/09 and 100/12/09) and written informed consent was obtained from each patient. Samples of laryngeal papillomas, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin were retrieved from the tissue collection of paraffin-embedded samples of the Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana. Approval from the Institutional Review Board of the Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana was obtained prior to starting work on samples included in this study. In accordance with the national legislation of the Republic of Slovenia, no informed consent is needed for research on archival clinical samples. In order to protect the identity of the patient, all archival clinical samples used in the study were coded and tested anonymously. The only available data were patient gender, age and immune status (if collected during the original study).

Results and Discussion

Partial L1 sequences of HPV-150 (SIBX1; 373-bp) and HPV-151 (SIBX2, 367-bp) were deposited in GenBank in March 2005 under Acc. Nos. AJ606880 and AJ606879, respectively. The four reference clones, covering the full genomes of HPV-150 and HPV-151, were deposited in March 2010 in the Reference Centre for Papillomaviruses, Heidelberg, Germany, where their sequences were independently confirmed and the two genotypes were officially named in April 2010.

The genome of HPV-150 has a total length of 7,436-bp, with a GC ratio of 39.70%, and is deposited in GenBank under Acc. No. FN677755. The genome of HPV-151 has a total length of 7,386-bp, with a GC ratio of 39.79%, and is deposited in GenBank under Acc. No. FN677756.

ORF analysis and sequence alignment comparisons showed both HPV-150 and HPV-151 to have the typical genomic organization of HPVs and to contain at least six viral genes: E6, E7, E1, E2, L2 and L1, as well as possibly a gene for the E4 protein (Figure 1). In addition to the mentioned ORFs, the genomes of both new genotypes contain a non-coding upstream regulatory region (URR) or long control region (LCR) located between the L1 and E6 genes, spanning 416-bp in HPV-150 (genomic positions 7,371 to 350) and 322-bp in HPV-151 (genomic positions 7,213 to 148) (Figure 2). The LCRs of both HPV-150 and HPV-151 lack the conserved M29 and M33 motifs [40] which are typical for members of *Betapapillomavirus* species 1 [41] but are absent in other *Betapapillomavirus* species [42]. As in other members of *Betapapillomaviruses*, the intergenic region located between E2 and L2 genes is very short (51-bp in HPV-150 (genomic positions 4,219 to 4,269) and 84-bp in HPV-151 (genomic positions 4,008 to 4,091)) and does not encode for an E5 gene.

HPV-150 and HPV-151 contain two regular zinc binding domains (CxxC(x)₂₉CxxC) within their E6 protein, at amino-acid

positions 24 and 98; and 27 and 101, respectively (Figure 3). Both genotypes also contain one regular zinc binding domain (CxxC(x)₂₉CxxC) within their E7 protein, at amino-acid positions 50 and 53, respectively. However only HPV-150 also contains the regular pRb-binding core sequence (LxCxE) at amino-acid position 24 of E7 (Figure 3). Unlike other members of *Betapapillomavirus* species 2, HPV-151 does not contain the regular pRb-binding core sequence (LxCxE) within its E7 protein (Figure 3).

Phylogenetic analyses using the L1 gene sequences of a representative selection of 200 PVs place both HPV-150 and HPV-151 within the *Betapapillomavirus* genus (Figure 4). As shown in Figure 4, the closest relative of HPV-150 is HPV-96 (79.59% nucleotide (nt) identity in the L1 gene; distance in substitutions per site for L1; 0.264440 and 0.103792 for nt and for amino-acid (aa), respectively). HPV-96 belongs to *Betapapillomavirus* species 5 and was originally isolated from a SCC of the skin [18]. The next phylogenetically closest genotype to HPV-150 and HPV-96 is HPV-92, which belongs to *Betapapillomavirus* species 4, and was originally isolated from a BCC of the skin [16]. Since these three genotypes seem to have evolved through intra-host duplication [43] and two of them show at least some carcinogenic potential, the ancestral genotype from which these genotypes were derived may have itself been an oncogenic HPV genotype.

As shown in Figure 4, HPV-151 appears to be phylogenetically nested within *Betapapillomavirus* species 2, with HPV-22 being its closest relative (86.98% nt identity for the L1 gene; 0.164208 and 0.084639 distance in substitutions per site for L1 nt and aa, respectively). HPV-22 was originally isolated from chest macules [15]. Currently, *Betapapillomavirus* species 2 encompasses 17 HPV genotypes isolated from humans, making it one of the largest species among PVs. The generation of such viral diversity has probably occurred through intra-host duplication events, which may reflect multiple ways of succeeding in adaptation to the human host [43]. An example of this capacity to establish infection in multiple ways can be seen from the fact that particular genotypes of *Betapapillomavirus* species 2 have been found in lesions ranging from macules and other benign skin lesions, to actinic keratosis, BCC and SCC of the skin, and even head and neck and esophageal carcinoma, as in the case of HPV-100 [44].

In order to assess the biological and clinical importance of the novel HPV genotypes, two quantitative HPV-150 and HPV-151 type-specific PCR assays were developed. The standard curves of both assays showed an excellent correlation coefficient ($R^2 = 1.00$) between the Ct (threshold) and the log of starting viral copy number across at least seven orders of magnitude. The 95% limits of detection determined by Probit analysis using the PASW Statistics 18 program (SPSS GmbH Software, Munich, Germany) were 7.3 copies/reaction (range 5.6 to 11.4) and 3.4 copies/reaction (range 2.5 to 6.0), for the HPV-150 and HPV-151 assays, respectively. For HPV-150 assay, the intra- and inter-assay coefficient of variation (CV (%)) = (st.dev/mean Ct) × 100 were 0.55 and 1.43 for 100 copies per reaction, respectively, and 1.73 and 1.81 for 10 copies per reaction, respectively, and corresponding values for HPV-151 assay were 0.81 and 1.54 for 100 copies per reaction, respectively, and 1.02 and 1.98 for 10 copies per reaction, respectively. Both assays showed no cross-reactivity with any of the tested non-targeted HPV genotypes.

Using the developed type-specific PCRs, a representative collection of HPV-associated benign and malignant neoplasms and hair follicles was tested for the presence of HPV-150 and HPV-151. The sample collection was chosen to represent various sites of HPV infection (mucosal/cutaneous) and possible outcomes

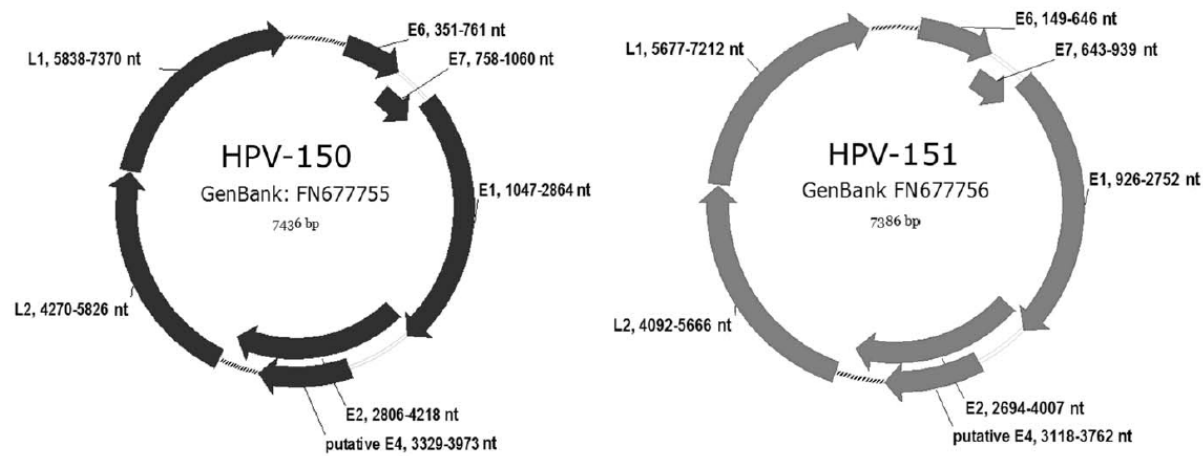


Figure 1. Genomic organization of HPV-150 and HPV-151 showing genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, L1, L2, and the non-coding regions located between L1 and E6 (LCR); and E2 and L2 (dotted line).
doi:10.1371/journal.pone.0022529.g001

of HPV infection (benign/malignant lesions)(Table 1). The panel of samples thus included the most important HPV-associated malignant neoplasms of mucosal (cervical squamous cell carcinoma) and cutaneous (SCC and BCC of skin) origin, and the most important HPV-associated benign neoplasms of mucosal (genital warts, laryngeal papillomas) and cutaneous (common warts) origin. In addition, we tested hair follicles, which are commonly used as the best approximate to skin biopsies, to examine the prevalence of *Betapapillomaviruses* in healthy skin [45,46] and are known to be a main reservoir of commensal HPV genotypes in immunocompetent individuals [5–7].

As shown in Table 1, none of the 249 mucosal tissue samples tested were positive for HPV-150 and HPV-151, indicating little, if any, mucosal tropism of both novel HPV genotypes.

Of the 101 samples of common warts tested, four samples (4.0%) contained HPV-150, indicating the cutaneous tropism of this genotype (Table 1). Of HPV-150 positive common warts, three samples contained at least one additional HPV genotype (samples 1, 2 and 4, Table 2): HPV-27 from *Alphapapillomavirus* species 4, a well known genotype capable of causing common warts; HPV-5 and HPV-14, cutaneotropic members of *Betapapillomavirus* species 1; and HPV-15 belonging to *Betapapillomavirus* species 2 – all three later being genotypes associated with the development of cutaneous tumors in immuno-suppressed patients or patients with *epidermodysplasia verruciformis*. Due to the presence of more than one HPV genotype in these lesions, the development of common warts could not be conclusively attributed to HPV-150. In contrast, in the fourth HPV-150 positive common wart (sample

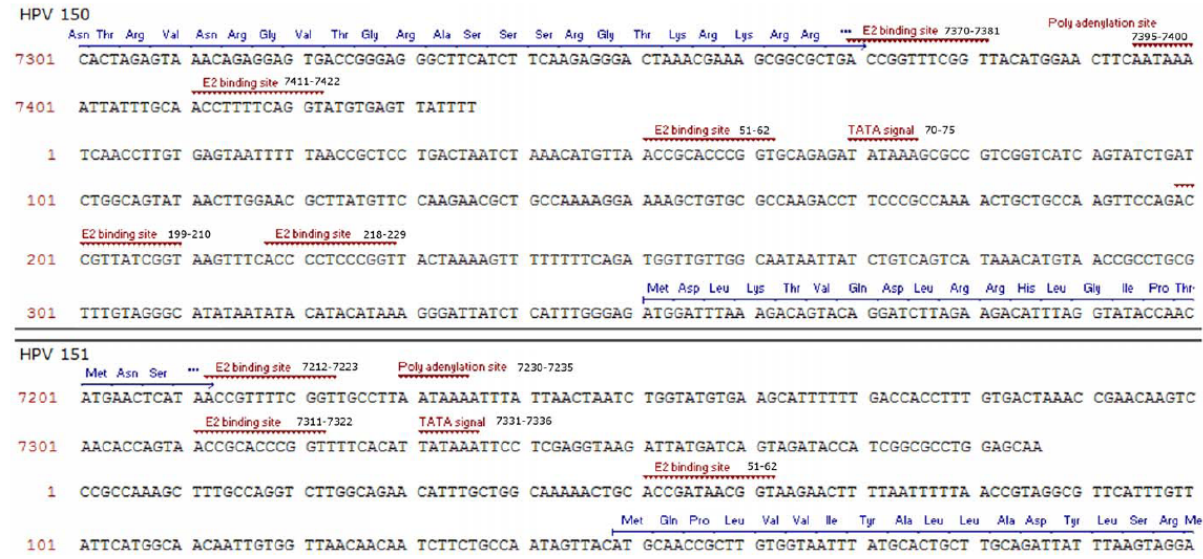


Figure 2. Characteristic features of the long control region (LCR) of HPV-150 and HPV-151, showing genomic locations of E2 binding sites (ACC-N5-7-GGT), polyadenylation sites (AATAAA), and TATA signals (TATAAA or TATA(A/T)A(T)).
doi:10.1371/journal.pone.0022529.g002

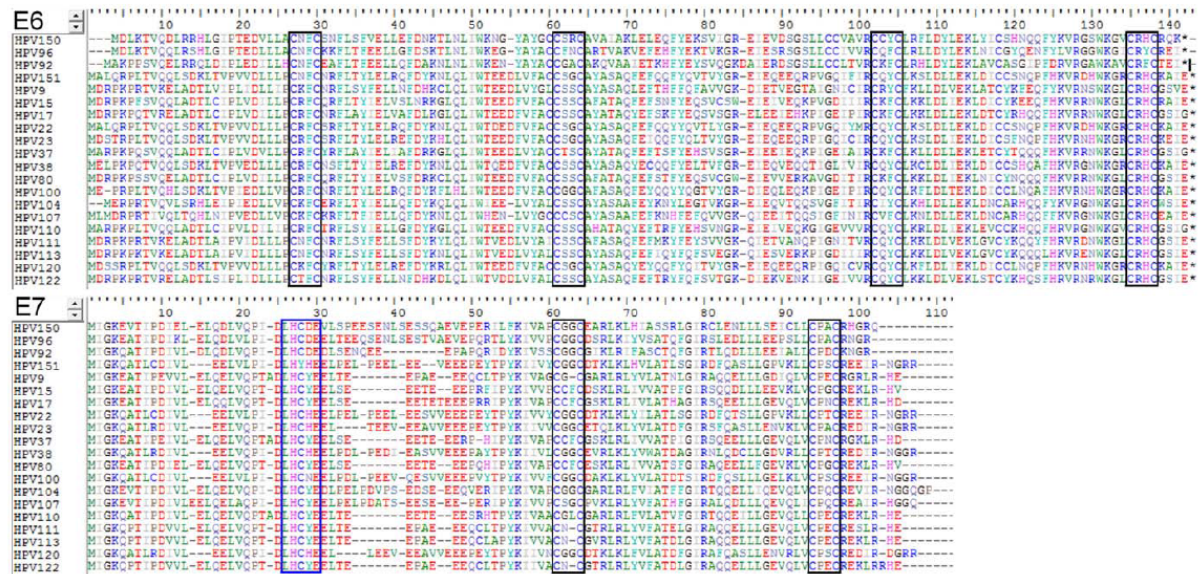


Figure 3. Amino acid alignment of HPV-150 and HPV-151 E6 and E7 proteins with corresponding proteins of closely related genotypes from *Betapapillomavirus* species 2, 4 and 5. The locations of zinc-binding domains (CxxC(x)₂₉CxxC) are indicated by black boxes, and the location of the pRb-binding core sequence (LxCxE) is indicated with a blue box.

doi:10.1371/journal.pone.0022529.g003

3, Table 2), HPV-150 was the only HPV genotype detected, despite the use of several HPV genotyping assays, targeting a range of *Alphapapillomavirus* and *Betapapillomavirus* genotypes, indicating a possible causative role of HPV-150 in the development of this particular common wart. Although the HPV-150 viral load was relatively low (1/31 viral genomes/No. human cells) our finding is in agreement with recent studies which showed that viral load of *Betapapillomaviruses* associated with cutaneous warts is substantially lower than that of *Alphapapillomaviruses* (HPV-3, HPV-27, HPV-57) associated with similar lesions (1/2 to 1/10 000 viral genomes/No. human cells) [47]. However, further research is needed in order to reach any final conclusions on the ability of HPV-150 to cause common warts in absence of other factors.

As shown in Table 1, HPV-150 was detected in four (4.0%) of the 101 samples of malignant skin tumors tested, further supporting cutaneous tropism of HPV-150. Similarly to the common warts, several additional cutaneous genotypes from *Betapapillomavirus* genus were present in three out of four HPV-150 positive samples of malignant skin tumors included in the study (samples 6–8, Table 2), greatly complicating the interpretation of our findings. The interpretation of our results is additionally complicated by the difference in viral loads observed between an abortive HPV infection leading to malignant transformation of the skin, which typically involves *Betapapillomavirus* genotypes present in minute quantities [13,18,48–50] and on the other side the productive HPV infection of the skin resulting in benign tumors, such as common warts, which usually harbor viruses in higher concentration [47]. Such differences make it near impossible to distinguish causative or ‘driver’ HPV genotypes from commensal or ‘passenger’ HPV genotypes, also present on the lesion and/or the surrounding skin [48]. Thus, although the HPV-150 was the only HPV genotype detected in a single case of SCC of the skin (sample 5, Table 2), due to its presence in very low quantity (1/57,950 viral genomes/No. human cells), further studies are

needed in order to establish if HPV-150 is a causative or commensal genotype in sporadic cases of the SCC of the skin.

As shown in Table 1, HPV-150 was also found in three (3.4%) out of 89 hair follicle samples tested (Table 1), finally confirming cutaneous tropism of HPV-150.

Long term persistent HPV infection is a key requirement for the development of HPV-related anogenital cancers, but its role is less clear in the case of HPV-related skin cancer [13,20,48–50]. In order to determine whether HPV-150 can establish persistent infection, seven hair follicle samples collected over the course of one year from one of the HPV-150 positive individuals were tested using HPV-150 type-specific PCR. In this immuno-competent 22-year-old male, HPV-150 was detected in all seven hair follicles tested, confirming its potential for persistent infection. However, similarly to the majority of other *Betapapillomavirus* infections in immuno-competent individuals [22–24], no obvious epithelial lesions were recorded as a result of the persistence of HPV-150 in our patient during 12 months of follow-up.

Of the 101 samples of common warts tested, four samples (4.0%) contained HPV-151, indicating its cutaneous tropism (Table 1). Of HPV-151 positive common warts, two samples contained at least one additional *Betapapillomavirus* genotype (samples 12 and 14, Table 3): HPV-9, the type species of *Betapapillomavirus* species 2; HPV-19, HPV-36 and HPV-93 of *Betapapillomavirus* species 1; and HPV-49 of *Betapapillomavirus* species 3. Since all listed genotypes have cutaneous tropism and are etiologically associated with the development of cutaneous tumors in immuno-suppressed patients or patients with *epidermodysplasia verruciformis*, these two common warts could not conclusively be attributed etiologically to HPV-151. In contrast, two HPV-151 positive common wart samples (samples 13 and 15, Table 3) did not contain any additional HPV genotypes, indicating a possible causative role of HPV-151 in the development of these two common warts. Both samples had viral loads (1/493 and 1/

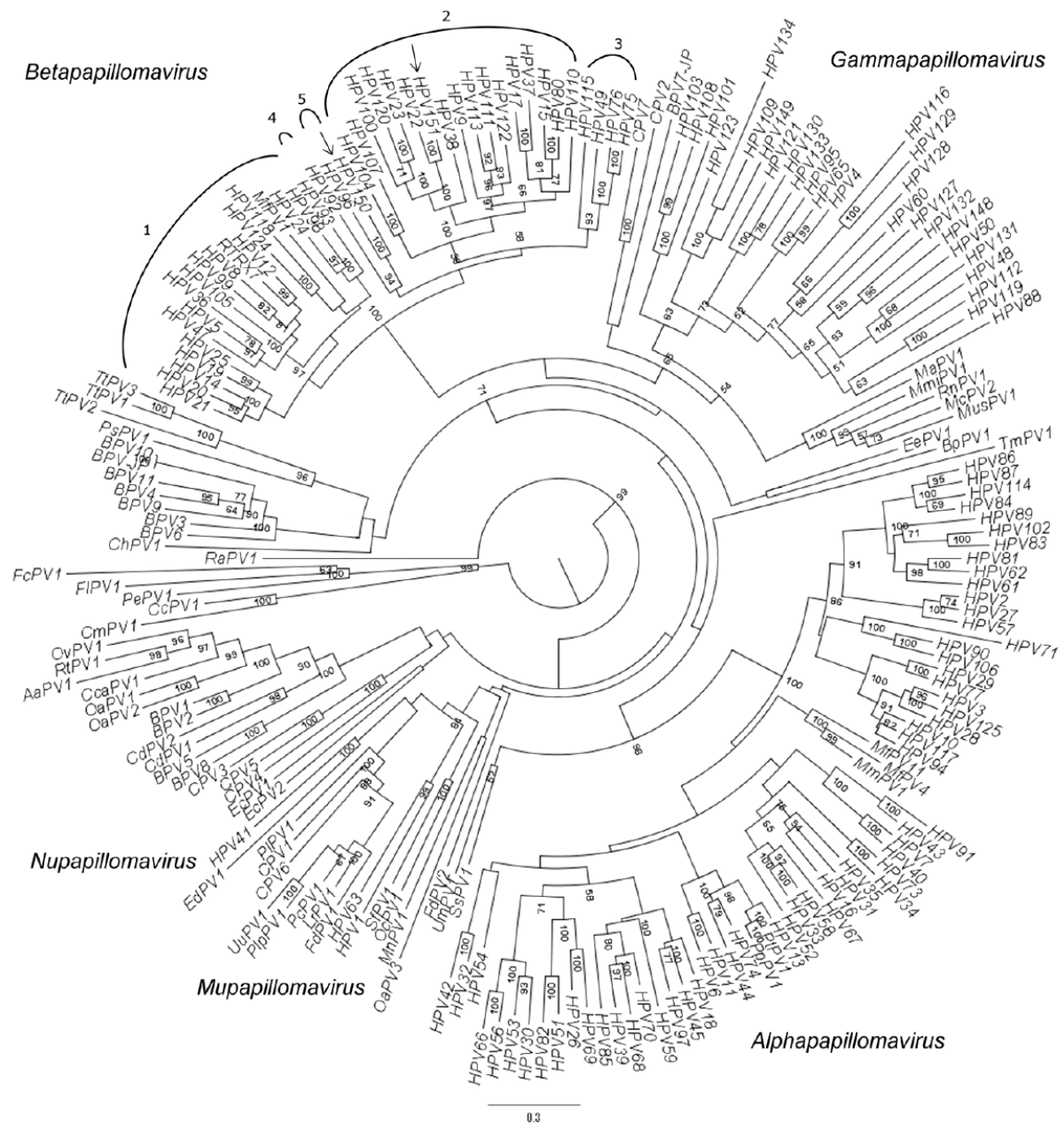


Figure 4. A consensus phylogenetic tree of 200 PV based on nucleotide sequences of the L1 gene. Numbers at nodes show maximum likelihood bootstrap support (%) above 50. *Betapapillomavirus* species numbers are indicated above the corresponding genotypes.
doi:10.1371/journal.pone.0022529.g004

103 viral genomes/No. human cells, respectively) of magnitude characteristic for *Betapapillomavirus* genotypes in common warts [47], however the final contribution of HPV-151 to the development of these lesions requires further studies.

As shown in Tables 1 and 3, HPV-151 was detected in four (4.0%) of the 101 malignant skin tumor samples and in three (3.4%) of 89 hair follicle samples tested, finally confirming the cutaneous tropism of this novel HPV genotype. In the majority of

the HPV-151 positive samples, several other HPV genotypes were identified (Table 3).

In the single HPV-151 positive BCC, where no other HPV genotypes were present (sample 16, Table 3), the viral load was relatively low (1/691 viral genomes/No. of human cells). Such minute viral load is consistent with values described previously for other *Betapapillomaviruses* in non-melanoma skin cancer [18,48,49], and given the advanced age of the patient (84 years) it is possible

Table 1. Clinical samples tested for the presence of HPV-150 and HPV-151.

Tissue type	Sample type	No. of samples tested	No. (%) of HPV-150 positive samples	No. (%) of HPV-151 positive samples
Mucosal				
	Genital warts	71	0	0
	Laryngeal papillomas	78	0	0
	Cervical cancer	100	0	0
Cutaneous				
	Common warts	101	4 (4.0)	4 (4.0)
	Squamous cell carcinoma of the skin	52	3 (5.8)	1 (1.9)
	Basal cell carcinoma of the skin	49	1 (2.0)	3 (6.1)
Hair follicles				
		89	3 (3.4)	2 (2.2)
Total		540	11 (2.0)	10 (1.9)

doi:10.1371/journal.pone.0022529.t001

that HPV-151 contributed at least partially to the development of the BCC in question. However, further studies are required in order to finally establish the causative role of HPV-151 in the development of BCC of the skin.

Interestingly, one sample of BCC of the skin (sample 8, Tables 2 and 3) contained both novel HPV genotypes: HPV-150 and HPV-151, but not other HPV genotypes. Similarly, one sample of SCC of the skin (sample 6, Tables 2 and 3) contained both HPV-150 and HPV-151 in addition to HPV-37. In both skin cancers, the viral loads per number of human cells were substantially higher for HPV-151 than for HPV-150, but the significance (if any) of these findings remains to be determined.

In addition to full characterization of two novel HPV genotypes, a putative novel HPV genotype, phylogenetically related to HPV-150, was identified in a tissue sample of SCC of the skin obtained from a 64-year old male immuno-compromised patient, together with HPV-9, the type species genotype of *Betapapillomavirus* species

2. The 354-bp sequence of L1 gene of this putative novel HPV genotype (isolate SI-HPV-Beta5; GenBank Acc. No. FR822732) showed 90.68% nt identity with the corresponding part of the L1 sequence of HPV-150 but its other characteristics remain to be determined in future studies.

Conclusions

The cloning and full characterization of two novel *Betapapillomavirus* HPV-150 and HPV-151, as well as the partial identification of a putative novel HPV genotype closely related to HPV-150 (isolate SI-HPV-Beta5), improves our knowledge of the diversity of *Betapapillomavirus* infecting humans. HPV-150 and HPV-151 belong phylogenetically within the *Betapapillomavirus* genus and are most closely related to HPV-96 and HPV-22, respectively. Both novel genotypes are relatively rare, most likely lack mucosal tropism and have clear cutaneous tropism. HPV-150 can establish persistent infection of hair follicles in immuno-

Table 2. Characteristics of HPV-150 positive samples and patients.

Sample type	Sample ID	Histology result	Age	Gender	Viral genomes/No. of human cells	Presence of other HPV genotypes
cutaneous	1	Common wart	15	Male	1/15	HPV-27
cutaneous	2	Common wart	81	Female	1/212	HPV-5, HPV-14, HPV-15
cutaneous	3	Common wart	90	Male	1/31	None
cutaneous	4	Common wart	16	Male	1/12	HPV-5
cutaneous	5	Squamous cell carcinoma of the skin	82	Male	1/57950	None
cutaneous	6	Squamous cell carcinoma of the skin	80	Male	1/9508	HPV-151, HPV-37
cutaneous	7	Squamous cell carcinoma of the skin	86	Male	1/140	HPV-8, HPV-75
cutaneous	8	Basal cell carcinoma of the skin	81	Female	1/22638	HPV-151
hair follicle	9	/	29	Male	Nd	HPV-6, HPV-8, HPV-9, HPV-17, HPV-21
hair follicle	10	/	27	Male	Nd	None
hair follicle	11	/	52	Female	Nd	HPV-8, HPV-14, HPV-38, HPV-93

Nd – Not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0022529.t002

Table 3. Characteristics of HPV-151 positive samples and patients.

Sample type	Sample ID	Histology result	Age	Gender	Viral genomes/No. of human cells	Presence of other HPV genotypes
cutaneous	12	Common wart	67	Male	1/19	HPV-9, HPV-93
cutaneous	13	Common wart	76	Male	1/439	None
cutaneous	14	Common wart	55	Female	1/168	HPV-19, HPV-36, HPV-49
cutaneous	15	Common wart	74	Female	1/103	None
cutaneous	6	Squamous cell carcinoma of the skin	80	Male	1/1994	HPV-150, HPV-37
cutaneous	16	Basal cell carcinoma of the skin	84	Female	1/691	None
cutaneous	17	Basal cell carcinoma of the skin	84	Female	1/39	HPV-21, HPV-36, HPV-24
cutaneous	8	Basal cell carcinoma of the skin	81	Female	1/113	HPV-150
hair follicle	18	/	26	Male	Nd	HPV-5, HPV-19, HPV-21, HPV-22, HPV-24, HPV-38, HPV-93
hair follicle	19	/	33	Male	Nd	HPV-23, HPV-93

Nd – Not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0022529.t003

competent individuals. HPV-150 and HPV-151 have been found in sporadic cases of common warts, SCC and BCC of the skin preferably in elderly immuno-competent individuals, as both single and multiple infections with viral loads ranging from 1/12 to 1/57,950 viral genomes/No. of human cells.

Supporting Information

Table S1 Primers used for initial amplification, primer walking and preparation of HPV-150 and HPV-151 reference clones. Nt – Nucleotide position. N – Random nucleotide. Cw – Clock-wise. Ccw – Counter clock-wise. (DOC)

Acknowledgments

Both viruses were isolated from hair follicles collected by Assistant Professor Marko Potočnik, Department of Dermatovenereology, University Medical Center, Ljubljana. We are grateful to Ethel-Michelle de Villiers for confirmatory analysis of the clones at the Reference Centre for

Papillomaviruses, Heidelberg, Germany. We thank Branko Pirš, MD, Department of Dermatovenereology, University Medical Center, Ljubljana, for providing the tissue sample in which SI-HPV-Beta5 putative novel HPV was first identified. We would also like to thank Marko Potočnik, Branko Pirš, Nina Jančar, Eda Vrtačnik Bokal, Pavle Košorok and Vesna Tlaker Žunter for the collection of clinical samples, Nina Gale for the histological assessment, and Kristina Fujs-Komloš, Mateja Jelen and Robert Krošelj for excellent laboratory support. We are much indebted to Sergej Rožman for allowing us to use their computing facilities for phylogenetic analyses, and Miha Starič for assistance with remote access and data transfer.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AK BJK BL MP IGB. Performed the experiments: AK BJK IGB. Analyzed the data: AK MP IGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP. Wrote the paper: AK MP. Identification of 373-bp and 367-bp sequences of the L1 gene of HPV-150 and HPV-151, respectively, and its initial characterization: BJK. Cloning and final characterization of the whole genomes of the HPV-150 and HPV-151: AK. Phylogenetic analysis: IGB AK.

References

- Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70–79.
- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
- Rector A, Tachezy R, Van Ranst M (2004) A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol* 78: 4993–4998.
- Li L, Barry P, Yeh E, Glaser C, Schnurr D, et al. (2009) Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *J Gen Virol* 90: 2413–2417.
- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensal nature of these viruses. *J Virol* 74: 11636–11641.
- Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG (2003) General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 41: 2509–2514.
- Potočnik M, Kocjan BJ, Seme K, Luzar B, Babič DZ, et al. (2006) Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. *J Med Virol* 78: 1673–1678.
- Jablonska S, Majewski S, Obalek S, Orth G (1997) Cutaneous warts. *Clin Dermatol* 15: 309–319.
- Jablonska S, Majewski S (1994) Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 186: 157–175.
- Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, et al. (1994) Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res* 54: 4610–4613.
- de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, et al. (1995) High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 105: 367–371.
- de Villiers EM, Laverne D, McLaren K, Benton EC (1997) Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 73: 356–361.
- Berkhout RJM, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget J (2000) Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38: 2087–2096.
- Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA, et al. (2006) Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* 98: 389–395.
- Kremsdorf D, Favre M, Jablonska S, Obalek S, Rueda LA, et al. (1984) Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Virol* 52: 1013–1018.
- Forslund O, Antonsson A, Higgins G, Ly H, Delius H, et al. (2003) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of candidate human papilloma virus type 92. *Virology* 312: 255–260.

17. Hazard K, Eliasson L, Dillner J, Forslund O (2006) Subtype HPV38b[FA125] demonstrates heterogeneity of human papillomavirus type 38. *Int J Cancer* 119: 1073–1077.
18. Vasiljević N, Hazard K, Eliasson L, Ly H, Hunziker A, et al. (2007) Characterization of two novel cutaneous human papillomaviruses, HPV93 and HPV96. *J Gen Virol* 88: 1479–1483.
19. Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E (2007) Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers* 23: 247–259.
20. Boukamp P (2005) Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 26: 1657–1667.
21. Castellsague X, Drudis T, Canadas M, Gonce A, Ros R, et al. (2009) Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infectious Diseases* 9: 74.
22. Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, et al. (2007) Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 127: 116–119.
23. Plasmeyer EI, Green AC, de Koning MNC, O'Rourke P, Quint WGV, et al. (2010) Transmission of betapapillomaviruses between domestic partners in an Australian community. *J Clin Virol* 47: 216–218.
24. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, et al. (2003) Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84: 1881–1886.
25. Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, Potočnik M, Fujs K, et al. (2005) Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infect Genet Evol* 5: 255–259.
26. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
27. Katoh K, Misawa K, Kuma K-ichi, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30: 3059–3066.
28. Suyama M, Torrents D, Bork P (2006) PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res* 34: W609–612.
29. Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56: 564–577.
30. Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17: 540–552.
31. Stamatakis A (2006) RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
32. Ott M, Zola J, Stamatakis A, Aluru S (2007) Large-scale maximum likelihood-based phylogenetic analysis on the IBM BlueGene/L. In: *Supercomputing, 2007, SC'07. Proceedings of the 2007 ACM/IEEE Conference on*, pp 1–11.
33. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAXML Web servers. *Syst Biol* 57: 758–771.
34. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278: 261–269.
35. Potočnik M, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M (2007) Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat* 16: 91–96,98.
36. Jančar N, Kocjan BJ, Poljak M, Lunar MM, Bokalič EV (2009) Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 145: 184–188.
37. Kocjan BJ, Poljak M, Čimerman M, Gale N, Potočnik M, et al. (2009) Prevalence genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology* 391: 274–283.
38. Kocjan BJ, Seme K, Čimerman M, Kovanda A, Potočnik M, et al. (2009) Genomic diversity of human papillomavirus (HPV) genotype 38. *J Med Virol* 81: 288–295.
39. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76: 1057–1062.
40. Krubke J, Kraus J, Delius H, Chow L, Broker T, et al. (1987) Genetic relationship among human papillomaviruses associated with benign and malignant tumours of patients with epidermodysplasia verruciformis. *J Gen Virol* 68: 3091–3103.
41. Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M (2009) The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol. Mol Biol Rev* 73: 348–370.
42. Ensser A, Pfister H (1990) Epidermodysplasia verruciformis associated human papillomaviruses present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucl Acid Res* 18: 3919–3922.
43. Gottschling M, Göker M, Stamatakis A, Bininda-Emonds ORP, Nindl I, et al. (2011) Quantifying the phylogenetic forces driving papillomavirus evolution. *Mol Biol Evol* , Available: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/01/31/molbev.msr030.abstract..>
44. de Villiers E-M, Gunst K (2009) Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol* 90: 1999–2004.
45. Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, et al. (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 108: 712–715.
46. Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, et al. (2000) Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer* 86: 118–121.
47. Köhler A, Meyer T, Stockfleth E, Nindl I (2009) High viral load of human wart-associated papillomaviruses (PV) but not beta-PV in cutaneous warts independent of immunosuppression. *Br J Dermatol* 161: 528–535.
48. Orth G (2005) Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in non-melanoma skin cancers: guilty or innocent? *J Invest Dermatol* 125: xii–xiii.
49. Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, Harwood C, Proby C, et al. (2005) Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 125: 93–97.
50. Purdie KJ, Surentheran T, Sterling JC, Bell L, McGregor JM, et al. (2005) Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 125: 98–107.