

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martin FETTICH

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZOVANJE
SOČASNIH OKUŽB Z VEČIMI GENOTIPI
HUMANIH VIRUSOV PAPILOMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martin FETTICH

PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZOVANJE SOČASNIH OKUŽB
Z VEČIMI GENOTIPI HUMANIH VIRUSOV PAPILOMA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

COMPARISON OF TWO GENOTYPING METHODS FOR
DETECTION OF INFECTION
WITH TWO OR MORE HUMAN PAPILLOMAVIRUSES GENOTYPES

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Maria Poljaka, dr. med. in za recezentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martin Fettich

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 578.5/.7:577.2.083 (043) = 863
- KG virusi/humani virusi papiloma/HPV/beta-HPV/genotipizacijske metode/
dokazovanje sočasnih okužb s HPV
- AV FETTICH, Martin
- SA POLJAK, Mario (mentor)/SEME, Katja (recezentka)
- KZ SI – 1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2007
- IN PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZOVANJE SOČASNIH OKUŽB Z
VEČIMI GENOTIPI HUMANIH VIRUSOV PAPILOMA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 65 str., 13 pregl., 3 sl., 93 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V prvem delu diplomske naloge smo primerjali učinkovitost genotipizacijske metode RFLP in metode kloniranja pridelkov PCR pri odkrivanju sočasnih okužb z večimi genotipi alfa-HPV. Za primerjavo metod smo izbrali štiri klinične vzorce z znanimi genotipi alfa-HPV. Pripravili smo eksperimentalne vzorce z mešanico do štirih genotipov HPV, z enako medsebojno koncentracijo DNA, ter jih pomnožili s PGMY09/11^{MIX} oligonukleotidnimi začetniki. Z genotipizacijsko metodo RFLP smo tako uspešno opredelili genotipe HPV prisotne v vseh eksperimentalnih vzorcih, medtem ko z metodo kloniranja nismo uspeli opredeliti prisotnega genotipa HPV-16 v eksperimentalnem vzorcu z mešanico treh genotipov HPV. Razlog za neuspešno, oteženo opredelitvijo genotipa HPV-16 v eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi tremi genotipi alfa-HPV, lahko pripišemo učinkovitejšemu pomnoževanju drugih dveh prisotnih genotipov, predvsem genotipa HPV-53. V drugem delu raziskave smo z optimizirano metodo kloniranja poskušali določiti genotipe HPV v treh kliničnih vzorcih, v katerih je bila predhodno z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanjem nukleotidnega zaporedja opredeljena sočasna okužba z dvema ali več genotipi beta-HPV hkrati. V raziskavo smo vključili še dodatni klinični vzorec, prav tako z enakim, predhodno opisanim postopkom, opredeljenim genotipom HPV-36. Z optimizirano metodo kloniranja pridelkov PCR smo v kliničnih vzorcih z domnevno sočasnimi okužbami z večimi genotipi beta-HPV, uspešno dokazali prisotnost dveh ali več genotipov beta-HPV v posameznem vzorcu. V vzorcu dlačnih mešičkov obrvi in pubičnega predela smo opredelili prisotnost treh genotipov beta-HPV, kar se sklada z različnimi objavljenimi študijami, ki potrjujejo visok delež genotipov beta-HPV izoliranih iz omenjenih predelov telesa (dlačnih mešički obrvi in pubičnega predela). V kliničnem vzorcu (tkivo kožne bradavice) smo poleg z metodo vgnezdene PCR opredeljenega genotipa HPV-X14b, z metodo kloniranja opredelili še dodatni genotip HPV-2a. Z metodo kloniranja smo v kliničnem vzorcu potrdili okužbo le z enim genotipom beta-HPV (HPV-36) in s tem potrdili skladnost z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV značilnimi oligonukleotidnimi začetniki M^a/H^a.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.5/.7:577.2.083 (043) = 863
- CX viruses/human papillomaviruses/ beta-HPV/genotyping methods/multiple infection
- AU FETTICH, Martin
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)
- PP SI – 1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI COMPARISON OF TWO GENOTYPING METHODS FOR DETECTION OF INFECTION WITH TWO OR MORE HUMAN PAPILLOMAVIRUSES GENOTYPES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 65 p., 13 tab., 3 fig., 93 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the first part of our study the comparison is made of the efficiency of RFLP genotyping method and the cloning method of PCR amplification products in detection of infections with two or more alpha-HPV genotypes. We chose four clinical samples with known alpha-HPV genotypes for the comparison. On that basis we prepared experimental samples with a mixture of up to four HPV genotypes with an equal DNA concentration and amplified them with PGMY09/11^{MIX} primers. With the RFLP we have successfully defined HPV genotypes in all experimental samples, while the cloning method did not manage to detect HPV-16 that was present in the experimental sample of three HPV genotypes. The reason for the unsuccessful detection of the HPV-16 in the experimental sample with three alpha-HPV genotypes, can be attributed to a more efficient amplification of other two genotypes present in the sample, especially the HPV-33 genotype. In the second part of our study we tried to define HPV genotypes by using an optimized cloning method, in three clinical samples in which previously, using nested PCR with beta-HPV genotype specific primers M^a/H^a and the definition of the nucleotide sequence, a multiple infection with two or more beta-HPV genotypes was found. An additional clinical sample was included in the study, with the identical previously described method used, that included the HPV-36 genotype. With the optimized cloning method we detected two or more beta-HPV genotypes in clinical samples with presumed multiple infections with multiple beta-HPV genotypes. In the samples of hairs plucked from the eyebrow and pubic area found three beta-HPV genotypes, which is consistent with different published studies, that confirm the existence of multiple beta-HPV genotypes in the same areas (hairs plucked from the eyebrow and pubic area). In the clinical sample (skin wart sample) we detected an additional HPV-2a genotype, by using the embedded PCR of HPV-X14b method as well as with the cloning method. Also in the clinical sample we managed to confirm the infection with only one beta-HPV genotype (HPV-36) by using the cloning method and have thus confirmed the consistency with the nested PCR with beta-HPV specific M^a/H^a primers.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO OKRAJŠAV.....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV).....	2
2.1.1 Zgradba HPV.....	2
2.1.2 Struktura in organizacija genoma HPV.....	3
2.1.3 Razvrščanje HPV.....	5
2.1.3.1 Razvrščanje genotipov HPV glede na tkivni tropizem.....	6
2.1.3.2 Razvrščanje genotipov HPV glede na skladnost nukleotidnih zaporedij.....	8
2.1.4 Razmnoževanje virusa HPV in njegovi onkogeni učinki.....	9
2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV.....	11
2.2.1 Tradicionalne diagnostične metode.....	12
2.2.2 Molekularne diagnostične metode.....	12
2.2.2.1 Hibridizacijske metode.....	13
2.2.2.1.1 Hibridizacija po Southernu.....	13
2.2.2.1.2 Hibridizacija dot-blot.....	14
2.2.2.1.3 Hibridizacija in situ na filtru.....	14
2.2.2.1.4 Hibridizacija in situ.....	14
2.2.2.1.5 Tekočinska hibridizacija.....	15
2.2.2.2. Verižna reakcija s polimerazo.....	16
2.2.2.2.1 PCR v realnem času.....	20
2.2.2.2.2 RT-PCR.....	20
2.3 NAMEN DELA.....	21
3 MATERIAL IN METODE.....	23
3.1 MATERIAL.....	23

3.1.1 Klinični vzorci vključeni v eksperimentalni del naloge primerjave učinkovitosti genotipizacijskih metod pri sočasni okužbi z večimi genotipi alfa-HPV.....	23
3.1.2 Klinični vzorci, vključeni v raziskovalni del naloge, pri katerih je bila predhodno dokazana okužba z genotipi beta-HPV.....	23
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Priprava eksperimentalne mešanice genotipov HPV.....	24
3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje gena L1 anogenitalnih genotipov HPV.....	24
3.2.2.1 Sestava reakcijske mešanice za reakcijo PCR.....	25
3.2.2.2 Pogoji pomnoževanja s PCR.....	26
3.2.3 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR.....	26
3.2.4 Encimska razgradnja produktov verižne reakcije s polimerazo.....	27
3.2.5 Čiščenje pridelkov PCR in določanje določanje koncentracije.....	29
3.2.6 Metoda kloniranja pridelkov PCR.....	31
3.2.6.1 Vključitev pridelkov PCR (inserti) v klonirne vektorje.....	31
3.2.6.2 Transformacija rekombinantne vektorske DNA v tarčne celice.....	33
3.2.7 Izbira transformiranih kolonij celic JM109 High Efficiency Competent Cell in izolacija rekombinantne vektorske DNA.....	34
3.2.7.1 Pomnožitev izbranih transformiranih kolonij celic JM109 High Efficiency Competent Cell.....	34
3.2.7.2 Liza transformiranih bakterijskih celic JM109 High Efficiency Competent Cell in izolacija vklonirnega vektorja pGEM®-T Easy Vector.....	35
3.2.8 Avtomatsko sekveniranje in določanje HPV genotipa z metodo BLAST.....	36
3.2.8.1 Določanje koncentracije izolirane plazmidne DNA.....	36
3.2.8.2 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	37
4 REZULATI.....	39
4.1 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI GENOTIPIZACIJSKE METODE RFLP IN METODE KLONIRANJA.....	39
4.2 OPREDELITEV GENOTIPOV BETA-HPV V PRIDELKIH PCR KLINIČNIH VZORCEV PREDHODNO POMNOŽENIH Z METODO VGNEZDENE PCR Z ZA BETA-HPV GENOTIPE ZNAČILNIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI M^a/H^a.....	41
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1 RAZPRAVA.....	44
5.1.1 Uvod.....	44
5.1.2 Analiza rezultatov.....	45

5.2 SKLEPI.....	49
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI.....	53
8 ZAHVALA.....	65

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem in onkogeni potencial (Poljak in sod., 2005: 62).....	6
Preglednica 2: Pregled metod za dokazovanje in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 2005; 64).....	11
Preglednica 3: Pripravljeni eksperimentalni vzorci z mešanico genotipov HPV enake medsebojne koncentracije DNA.....	24
Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov PGMY09/11 ^{MIX} (Gravittin sod., 2004).....	25
Preglednica 5: Standardni vzorci razgradnje 450 bp velikega dela gena L1 pomnoženega s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09/PGMY11 ^{MIX} (Bernard in sod., 1994).....	29
Preglednica 6: Dodani volumni pridelkov PCR pomnoženih s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09/11 ^{MIX} na podlagi ocenjene koncentracije očiščenih pridelkov PCR in izbranega molarnega razmerja s klonirnim vektorjem pGEM®-T Easy Vector v ligacijski reakciji.....	32
Preglednica 7: Dodani volumni pridelkov PCR pomnoženih z za EV-HPV genotipe značilne začetnimi oligonukleotidi M ^a /H ^a v ligacijske mešanice, na podlagi ocenjene koncentracije in zbranega molarnega razmerja klonirnim vektorjem pGEM®-T Easy Vector v ligacijski reakciji.....	32
Preglednica 8: Sestava ligacijske mešanice. X označuje dodani volumen PCR pridelka, ki je odvisen od njegove koncentracije ter izbranega molarnega razmerja s klonirnim vektorjem pGEM®-T Easy Vector.....	33
Preglednica 9: Predhodno vključeni in opredeljeni genotipi HPV z metodo encimske razgradnje PGMY09/PGMY11 ^{MIX} pridelkov PCR v eksperimentalnih vzorcih.....	40

Preglednica 10: Vključeni in opredeljeni genotipi HPV z metodo kloniranja v eksperimentalnih vzorcih.....	41
Preglednica 11: Predhodno opredeljeni genotipi beta-HPV kliničnih vzorcev z metodo vgnezdene PCR z za EV-HPV značilne začetne oligonukleotidi Ma/Ha in metodo določanja nukleotidnega zaporedja. X ^m – neopredeljena sočasna okužba z najmanj dvema genotipoma beta-HPV. X – neopredeljen genotip beta-HPV.....	42
Preglednica 12: Opredeljeni genotipi beta-HPV kliničnih vzorcev z metodo kloniranja.....	43
Preglednica 13: Skupno število pridobljenih nukleotidnih zaporedij za posamezen eksperimentalno pripravljen vzorec in število (delež) pridobljenih nukleotidnih zaporedij določenega genotipa HPV v posameznem eksperimentalnem vzorcu.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija genoma HPV16 (Poljak in sod., 2005: 60).....	3
Slika 2: Filogenetska razporeditev humanih virusov papiloma (Doorbar, 2006: 256).....	8
Slika 3: Opredelitev genotipov HPV v eksperimentalnih vzorcih z metodo encimske razgradnje PGMY09/PGMY11 ^{MIX} pridelka PCR.....	39

SEZNAM OKRAJŠAV

amp	ampicilin
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FISH	<i>in situ</i> hibridizacija na filtru
HC II	Digene Hybrid Capture test druge generacije
HIV	človeški virus imunske pomankljivosti
HPV	humani virusi papiloma
IPTG	izopropil- β -D-thiogalaktopiranozid
ISH	<i>in situ</i> hibridizacija
LCR	dolga regija kontrole
mRNA	obveščevalna ribonukleinska kislina
ORF	odprti bralni okvir
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFLP	metoda določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov
RLU	relativne svetlobne enote
RMV	rak materničnega vratu
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
TSR	Template Supresion Reagent
URR	zgornja regija kontrole
UV	ultravioletska svetloba
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

1 UVOD

Virusi papiloma so zelo raznovrstna skupina DNA virusov, med katerimi je največja in najpomembnejša skupina humanih virusov papiloma (HPV) (Poljak in sod., 1993). Taksonomsko jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ter rod *Papillomavirus* (de Villiers in sod., 2004). Preučevanje izolatov iz različnih delov sveta je pripeljalo do spoznanja, da obstaja med posameznimi HPV izredna genetska heterogenost. Tako HPV glede na stopnjo podobnosti nukleotidnega zaporedja razvrščamo v številne virusne genotipe. Do sedaj je opredeljenih že več kot 100 različnih genotipov in njihovo število še vedno narašča (de Villiers, 1994; de Villiers in sod., 2004).

Številne raziskave v zadnjih dvajsetih letih so nedvomno pokazale, da so HPV poglavitni etiološki dejavnik za razvoj raka materničnega vratu (RMV) (Stoler M.H., 2000; Walboomers in sod., 1999; Bosch in sod., 1995; Lazo, 1999; Nobbenhius in sod., 1999) in da sta stopnja displastičnih sprememb ploščatoceličnega epitela materničnega vratu in dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV najpomembnejša dejavnika tveganja za nastanek raka materničnega vratu (Lazo, 1999; Wallin in sod., 1999).

V nasprotju z jasno etiološko sliko povezave genotipov alfa-HPV z razvojem RMV, pa ostaja vzročna povezava razvoja različnih benignih in malignih kožnih lezij, vključno z nemelanomsko obliko kožnega raka pri imunsko oslabljenih bolnikih z okužbo z različnimi genotipi beta-HPV, še nerazjasnjeno področje (Berkhout in sod., 1995; Berkhout in sod., 2000; Bens in sod., 1998; Suretheran in sod., 1998; Boxman in sod., 2000; Boxman in sod., 2001; Meyer in sod., 2001; Majewski in Jablonska, 2002; Forslund in sod., 1999; Forslund in sod., 2003; Pfister in sod., 2003). Številne študije, (Majewski in Jablonska, 2002; Bernard, 2005) opravljene na bolnikih z avtosomno recesivno dedno boleznijo imenovano bradavičasta epidermodisplazija, so pokazale etiološko povezavo z zanj značilnimi kroničnimi okužbami z genotipi beta-HPV ter razvojem nemelanomske oblike kožnega raka.

Nedavno opravljene raziskave so pokazale prisotnost beta-HPV ne le v različnih kožnih lezijah imunsko oslABLjeni in zdravi populaciji, temveč tudi v lasnih mešičkih odvzetih iz različnih predelov telesa (Boxman in sod., 1997; Boxman in sod., 1999; Boxman in sod., 2000; Boxman in sod., 2001; Meyer in sod., 2001; Struijk in sod., 2003; Termorshuizen in sod., 2004; Wolf in sod., 2004; Kocjan in sod., 2005).

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV)

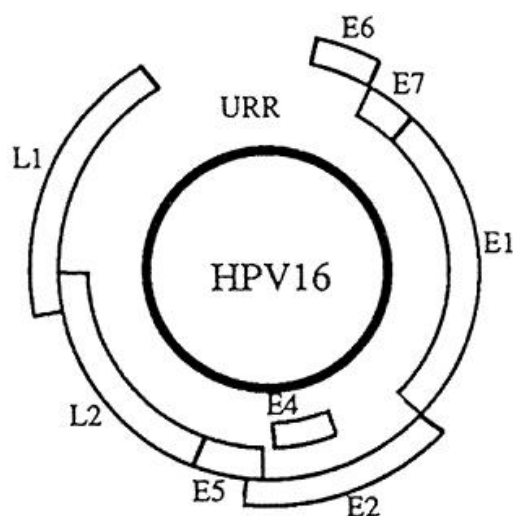
2.1.1 Zgradba HPV

Humani virusi papiloma predstavljajo izredno heterogeno skupino virusov DNA, ki jih etiološko povezujemo z različnimi benignimi in malignimi spremembami ploščatoceličnega epitelija (Poljak in sod., 2006). Taksonomsko jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, rod *Papillomavirus*, katerega ime je sestavljenka besede *papilla*, ki v latinščini pomeni bradavica oziroma sesek ter besede *oma*, ki v grščini pomeni tumor (van Ranst in sod., 1993).

HPV so majhni, goli virusi, ki v premeru merijo približno 55 nm. Dedni material je obdan z dvoslojnim beljakovinskim plaščem, imenovan kapsida. Kapsida je ikozaedrična in sestavljena iz 72 plaščnih morfoloških enot, kapsomer, ki predstavljajo dva tipa strukturnih beljakovin, tako imenovano veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino. Velika plaščna beljakovina ima povprečno molekulsko maso 55 kDa, z izredno ohranjenim aminokislinskim zaporedjem med virusi papiloma in predstavlja približno 80-90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Preostali del beljakovinskega plašča sestavlja mala plaščna beljakovina s povprečno molekulsko maso 76 kDa (Pfister in Fuchs, 1994).

2.1.2 Struktura in organizacija genoma HPV

Dedni material HPV predstavlja krožna, kovalentno zaprta dvojnovijska DNA, velikosti 7500-8000 baznih parov (bp), z molekularno maso $5,2 \times 10^6$ Da (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Organizacija genoma HPV je shematsko prikazana na sliki 1.



Slika 1. Organizacija genoma HPV16 (Poljak in sod., 2005: 60)

Virusni genom sestavljajo kodirajoča in nekodirajoča področja. Kodirajoča področja delimo na področje E (angl. early, zgodnje) in področje L (angl. late, pozno) (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Področje E vsebuje zapis za beljakovine povezane s podvojevanjem virusnega genoma in beljakovine, ki so odgovorne za transformirajoče (onkogene) učinke virusa. Večina do sedaj opredeljenih HPV ima najmanj 6 različnih genov E: E1, E2, E4, E5, E6, E7 (Stöppler in sod., 1994; Vousden 1993). Gena E6 in E7 sta med vsemi območji genoma HPV najbolj raziskana. Večina raziskovalcev meni, da sta beljakovini E6 in E7 najpomembnejši v onkogenezi novotvorb, ki nastanejo zaradi okužbe s HPV (Poljak in sod., 2005). Dokaz za to so pogosto najdeni prepisi genov E6 in E7 v različnih tumorjih in celičnih linijah (Vousden, 1993).

Transformirajoče lastnosti izraža tudi beljakovina E5, predvsem pri govejih virusih papiloma, medtem ko je temeljna funkcija beljakovine E5 HPV indukcija celične transformacije preko tirozin-kinaznih receptorjev nekaterih rastnih faktorjev (zur Hausen, 1996; Poljak in sod., 2005).

Virusna beljakovina E1 se veže na ori (angl. *origin of replication*) mesto podvojevanja virusnega genoma v nekodirajočem področju LCR (angl. *long control region*) in deluje kot encim z helikazno in ATP-azno aktivnostjo (Poljak in sod., 2005). Poleg tega, virusna beljakovina E1 igra pomembno vlogo pri virusnem razmnoževanju ter vzdrževanju HPV v obliki zunajkromosomskih delcev DNA, t.i. episomov.

Področje gena E2 nosi zapis za virusno beljakovino E2, ki uravnava prepisovanje in podvojevanja virusnega genoma, ter zapis za beljakovini, ki zaviralno uravnava prepisovanje genov E6 in E7. Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem znana. Dosedanje študije so pokazale, da se E4 veže na citokeratin okuženih epitelnih celic in povroči, da se struktura citoskeleta poruši. Zaradi porušenega citoskeleta celica dobi značilno obliko koilocita. Predvidevajo, da je porušenje citokeratinske mreže potrebno za lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okužene celice (Poljak in sod., 2005).

Vsi HPV imajo v področju L dve veliki, odprti mesti prepisovanja zapisov za beljakovine (ORF, angl. *open reading frames*), L1 in L2. Področje L1 je izredno ohranjeno zaporedje pri vseh HPV in nosi zapis za veliko virusno plaščno beljakovino. L2 kodira malo virusno plaščno beljakovino, ki se razlikuje pri posameznih genotipih HPV (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995).

Nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*), imenovano tudi URR (angl. *upstream regulatory region*), nosi zapis za regulatorne beljakovine, ki uravnava prepisovanje in podvojevanje tako virusnih kot tudi celičnih genov, ter obenem predstavlja mesto začetka virusne replikacije (Syrjänen K. in Syrjänen S., 2000)

2.1.3 Ravrščanje HPV

HPV so izjemno heterogena skupina DNA virusov, ki jih razvrščamo v različne virusne genotipe na podlagi skladnosti nukleotidnih zaporedij. Do danes je popolnoma opredeljenih in uradno priznanih že več kot 95 genotipov in 4 podtipi HPV. Genotipizacija HPV temelji na stopnji homologije DNA v genu L1. Po sklepu, ki so ga leta 1995 sprejeli na konferenci v Quebec City, nov genotip virusa opredelimo v primeru, če gre za več kot 10% neskladnosti nukleotidnega zaporedja z že znanimi genotipi HPV v področju L1. Če je neskladnost med 2 in 10 %, je to virusni podtip, in kadar je neskladnost pod 2 %, opredelimo nov virus kot različico enakega genotipa (de Villiers in sod., 2004; zur Hausen, 1996). Genotipi HPV so oštevilčeni povsem naključno-po vrtnem redu osamitve, in ne po bioloških lastnostih virusov ali njihovi genomski sorodnosti. Odkrivanje novih genotipov spremljajo v referenčnem centru za HPV (Deutsches Krebs-Forschungszentrum) v Heidelbergu, kjer določajo tudi zaporedne številne novo opredeljenih genotipov HPV. Za opredelitev in priznanje novega genotip HPV je potrebno celotni genom (lahko po delih) izolata HPV vklonirati v plazmidne vektorje ter mu določiti nukleotidno zaporedje oziroma značilne ORF. V primeru, da pridobimo genomsko zaporedje potencialnega novega genotipa HPV z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) in ne s klasičnim kloniranjem, namesto s HPV izolat (genotip) označimo s *canHPV* (can. angl. candidate) in z zaporedno številko (Poljak in sod., 2005).

Genotipe HPV razvrščamo v določen skupine na 2 načina: glede na tropizem za določeno vrsto epitelija in glede na skladnost nukleotidnih zaporedij (Poljak in sod., 1998).

2.1.3.1 Razvrščanje genotipov HPV glede na tkivni tropizem

Glede na tropizem za določeno vrsto epitelija poznane genotipe HPV razvrščamo v 4 skupine (Poljak in sod., 2005), kot je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem in onkogeni potencial (Poljak in sod., 2005: 62)

Sluznični (anogenitalni) genotipi HPV	
Visokorizični genotipi	HPC-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73, HPV-82
Verjetno visokorizični genotipi	HPV-26, HPV-53, HPV-66
Nizkorizični genotipi	HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81, candHPV-89
Genotipi z nejasnim onkogenim potencialom	HPV-34, HPV-55 (podtip HPV-44), HPV-57, candHPV-62, HPV-64 (podtip HPV-34), HPV-67, HPV-69, HPV-71, HPV-74, HPV-83, HPV-84, IS39 (podtip HPV-82)
Nesluznični (kožni) genotipi HPV	
HPV-1, HPV-3, HPV-4, HPV-10, HPV-28, HPV-29, HPV-41, HPV-48, HPV-50, HPV-60, HPV-63, HPV-65, HPV-78, HPV-88, HPV-94, HPV-95	
Kožno-sluznični genotipi HPV	
HPV-2, HPV-7, HPV-27, HPV-40, HPV-43, HPV-57, candHPV-91	
Genotipi EV-HPV, povezani z boleznijo epidermodysplasia verruciformis	
HPV-5, HPV-8, HPV-9, HPV-12, HPV-14, HPV-15, HPV-17, HPV-19, HPV-20, HPV-21, HPV-22, HPV-23, HPV-25, HPV-36, HPV-37, HPV-38, HPV-47, HPV-49, HPV-75, HPV-76, candHPV-92, candHPV-93, candHPV-96	

V prvo skupino uvrščamo sluznične oziroma anogenitalne HPV, ki okužijo ploščatocelični epitelij sluznic anogenitalnega predela. Glede na njihovo zmožnost povzročanja malignih preobrazb jih nadaljno delimo na visokorizične, verjetno visokorizične, nizkorizične in genotipe z nejasnim onkogenim potencialom (Poljak in sod., 2005). Medtem ko okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV etiološko povezujemo z nastankom intraepitelijskih neoplazij najvišje stopnje in malignimi ploščatoceličnimi tumorji, je okužba z nizkorizičnimi genotipi HPV povezana predvsem z vznikom in razvojem benignih novotvorb ploščatoceličnega epitela (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Genotipe HPV-26, HPV-53 in HPV-66 uvrščamo v skupino verjetno visokorizični genotipi HPV, saj je do danes zbranih premalo epidemioloških in bioloških raziskav, ki bi nakazovale filogenetsko uvrstitev teh virusov k visokorizičnim genotipom HPV (Poljak in sod. 2005).

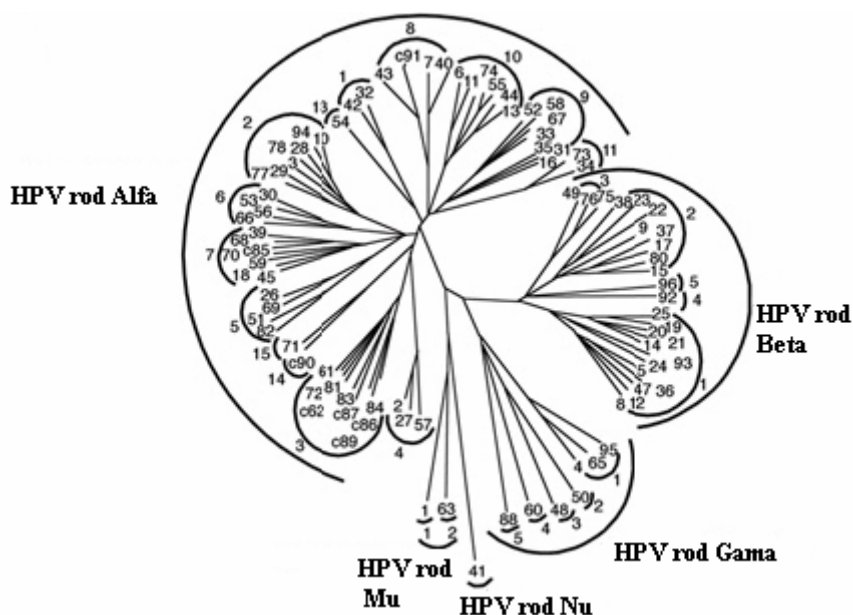
Nesluznični oziroma kožni genotipi HPV, kažejo afiniteto predvsem za poroženeli večskladen ploščatocelični epitel. Najpogosteje povzročajo različne benigne novotvorbe kože oziroma navadne kožne bradavice (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995; Poljak in sod., 2005).

V tretjo, kožno-sluznično skupino, uvrščamo genotipe HPV, ki lahko okužijo tako poroženevajoč kot tudi neporoženevajoč večvrstni ploščatocelični epitel in jih povezujejo tudi z neoplastičnimi spremembami epitela sluznic (de Villiers in sod., 2004).

V četrto skupino uvrščamo t.i. genotipe EV-HPV, prvotno osamljene iz resičastih novotvorb kože bolnikov z redko dedno boleznijo imenovano bradavičasta epidermodiplazija (*epidermodysplasia veruciformis*) (Poljak in sod., 2005). Te genotipe HPV pogosto odkrijemo pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom, in sicer pri bolnikih s presejenim organom ali pri bolnikih okuženih s HIV (Adams in sod., 1995).

2.1.3.2 Razvrščanje genotipov HPV glede na skladnost nukleotidnih zaporedij

Na podlagi primerjav celotnega zaporedja L1 ORF 96 genotipov HPV in 22 živalskih virusov papiloma, so de Villiersova in sodelovci leta 2004 objavili filogenetsko drevo s 16 rodovi in 45 vrstami virusov papiloma. Genotipe HPV taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, v rod *Papillomavirus*, natančneje v različne rodove virusov papiloma alfa, beta, gama, mu in nu. V rod alfa, ki predstavlja najštevilčnejšo skupino, uvrščamo sluznične, sluznično-genitalne in nekatere kožne genotipe HPV. Rod virusov papiloma beta sestoji pretežno iz genotipov EV-HPV, ki so bili prvotno izolirani iz resičastih novotvorb kože bolnikov z *epidermodysplasia verruciformis*. V rodove virusov papiloma gama, mu in nu uvrščamo preostale kožne genotipe HPV. V druge rodove družine *Papillomaviridae* so uvrščeni različni živalski papiloma virusi (de Villiers in sod., 2004).



Slika 2 : Filogenetska razporeditev humanih virusov papiloma (Doorbar, 2006: 256)

2.1.4 Razmnoževanje virusa HPV in njegovi onkogeni učinki

Tarčne celice za HPV so bazalne celice večvrstnega ploščatoceličnega epitela, ki predstavljajo tudi mesto začetka okužbe s HPV. Predpostavljajo, da imajo zaradi specifične povezave med HPV in določeno vrsto epitela, samo te celice receptorje za vstop HPV. Proces razmnoževanje HPV je natančno uravnan in je odvisen od prisotnosti oz. odsotnosti določenih regulatornih virusnih beljakovin in stopnje diferenciacije epiteljskih celic gostitelja (Doorbar, 2006). Ker bazalne epiteljske celice še niso dozorele, je razmnoževanje virusa v njih močno omejeno. Pozneje se sočasno z dozorevanjem okuženih celic povečuje tudi sposobnost razmnoževanja HPV v celici, kompletni virioni pa se sproščajo le iz popolnoma dozorelih celic (de Villiers, 2001; Schneider, 1994).

Ko okužene bazalne celice dozori v spinozne celice, postane znotrajcelično okolje ugodnejše za podvojevanje episomske DNA (zunajkromosomska DNA) in prepisovanje genov L1 in L2. Tako pride do sinteze velike in male plaščne virusne beljakovine in nastanka popolnih oblik virusa, ki so sposobne okužiti sosednje celice. Zaradi razmnoževanja HPV v povrhnjih epiteljskih celicah nastanejo za HPV značilne morfološke spremembe, imenovane koilocitoza (zur Hausen, 1996; Schneider, 1994).

Številne raziskave kažejo, da je fizikalno stanje HPV DNA v benignih in malignih tumorjih različno. Virusna DNA je v benignih spremembah skoraj vedno navzoča v episomalni obliki in v mnogoštevilnih kopijah. V malignih novotvorbah pa je virusna DNA skoraj vedno vključena v genom gostitelja (Poljak in sod. 1993). V nasprotju z nizkorizičnimi genotipi HPV imajo visokorizični genotipi HPV težnjo po vključitvi v genom gostiteljske celice. Pri vključevanju virusne DNA pride do prekinitve virusnega genoma na področju E1/E2. E2 gen nosi zapis za beljakovino, ki negativno uravnava izražanje genov E6 in E7 genoma HPV. Rezultat tega je povečano izražanje genov E6 in E7 in s tem kopičenje virusnih beljakovin E6 in E7 (Lazo, 1999; zur Hausen, 1996; Walboomers, 1999). Ti dve beljakovini imata sposobnost vezave na gostiteljski tumorje zavirajoči beljakovini p53 ter pRB in tako prepričita njuno normalno delovanje. Beljakovina p53 deluje kot aktivator in represor prepisovanja (Vousden, 1993; Lazo, 1999). Tako, beljakovina p53, v primeru okvare celične DNA zaustavi celično delitev v G1 fazi, vse dokler celični popravljalni mehanizmi ne popravijo napake. Z odpravljen

napako, nivo p53 upade in celični ciklus napreduje v S fazo. Poleg tega je za beljakovino p53 značilno tudi, da omogoči normalen potek programirane celične smrti tumorskih celic, apoptozo, in tako usihanje tumorjev. P53 namreč prepreči prepisovanje celičnega gena *bcl-2*, kar zmanjša prisotnost beljakovine Bcl-2, ki zavira apoptozo. Odsotnost ali nepravilno delovanje beljakovine p53 tako omogoča neovirano delitev celic s poškodovano DNA, kar lahko nadaljno vodi do kopičenje novih mutacij in s tem do maligne transformacije (zur Hausen, 1996; Lazo, 1999; Vousden, 1993; Koren, 1998).

Prav tako imata beljakovini E6 in E7 nizkorizičnih genotipov HPV sposobnost vezave na beljakovini p53 in pRB, vendar pa je njuna moč vezave približno sto-krat manjša kot pri visokorizičnih genotipih HPV (Summersgill in sod., 2000).

2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV

Okužbo s HPV lahko ugotovimo že z običajnim svetlobnomikroskopskim pregledom tkivnih vzorcev ali celičnih razmazov, če opazimo značilno spremenjene celice s hiperkromnimi in polimorfnimi jedri, ki jih obdaja svetel pas, vendar metoda ni zanesljiva (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Zaradi močne povezave med okužbo z določenimi genotipi HPV in rakom materničnega vratu, so se v zadnjih 30 letih razvile številne metode za dokazovanje HPV, ki jih delimo na tradicionalne in molekularne metode (preglednica 2).

Preglednica 2: Pregled metod za dokazovanje in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 2005; 64)

Tradicionalne metode
<ul style="list-style-type: none">• Svetlobna mikroskopija• Elektronska mikroskopija• Imunohistokemične metode
Molekularne metode
Hibridizacijske metode <ul style="list-style-type: none">• Hibridizacija Southern blot• Hibridizacija dot blot• Hibridizacija in situ• Hibridizacija in situ na filtru• Tekočinska hibridizacija (test Digene Hybrid Capture)
Metode pomnoževanja nukleinskih kislin <ul style="list-style-type: none">• Verižna reakcija s polimerazo s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi• Verižna reakcija s polimerazo z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi• Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)• PCR-encimsko oligonukleotidni test (Roche AMPLICOR HPV test)• Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA (NASBA)
Metoda določanja nukleotidnega zaporedja

2.2.1 Tradicionalne metode za diagnostiko okužbe s HPV

Odkrivanje okužbe s HPV epitelnih tkiv s tradicionalnimi svetlobnomikroskopskimi metodami ni zanesljivo (Chang F., 1990). Na okužbo pomislimo, ko najdemo v višje ležečih slojih epitelnih celic jedrne in citoplazemske atipije. Jedra so različnih oblik, skrčena, hiperkromna, kromatin je grudast, okoli jeder se pojavlja značilen svetel pas. Opisane spremembe, ki sta jih prva opisala Koss in Durfee leta 1956, imenujemo koilocitoza, in predstavljajo edini svetlobnomikroskopsko vidni citopatski učinek okužbe s HPV (Poljak in sod., 1993).

Poleg omenjene uporabe svetlobnega mikroskopa, k tradicionalnimi diagnostičnimi metodami prištevamo tudi uporabo elektronskega mikroskopa pri opazovanju virusnih delcev v odvzetem materialu ter imunohistokemične metode za odkrivanje strukturnih beljakovin virusa z uporabo mono- in poliklonskih protiteles (Crum, 1994; Poljak in sod., 1993; Reid in Lorincz, 1995; Trofatter, 1997).

Ker tradicionalne diagnostične metode niso zadosti občutljive in s tem zanesljive in ne omogočajo genotipizacije HPV, so se v diagnostiki okužb s HPV uveljavile metode molekularne diagnostike (Poljak in sod., 1998).

2.2.2 Molekularne metode za diagnostiko okužbe s HPV

Molekularne metode temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusnega genoma. Najpogosteje se uporabljajo različni hibridizacijski testi z RNA in DNA lovkami, usmerjenimi proti značilnim odsekom genomov različnih genotipov HPV, ali testi, zasnovani na verižni reakciji s polimerazo (PCR), s katerimi pomnožujemo značilna kratka zaporedja virusnega genoma, pridelek pomnoževanja pa naknadno dokazujemo z različnimi tehnikami (elektroforeza v gelu, encimska razgradnja, dot blot, encimski oligonukleotidni test) (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.1 Hibridizacijske metode

Hibridizacijske metode temeljijo na povezavi (hibridizaciji) med komplementarnimi predeli majhnih, označenih delcev nukleinskih kislin ali lovke in tarčno DNA. Lovke so lahko označene z različnimi radioaktivnimi (^3H , ^{32}P , ^{35}S) in neradioaktivnimi označevalci (biotin, digoksinin, fluorescentna barvila). Trdnost povezave med lovko in tarčno DNA variira od skladnosti nukleotidnega zaporedja obeh verig in od pogojev pri katerih poteka hibridizacija. Lovke so lahko značilne za posemezen, določen genotip (genotipsko-značilne lovke) ali za več genotipov HPV (skupinsko-značilne lovke) (Manos in Gravitt, 1993).

2.2.2.1.1 Hibridizacija po Southernu

Hibridizacija po Southernu je bila dolga leta temeljna metoda molekularne virologije za dokazovanje in tipizacijo HPV (zur Hausen in sod., 1974). Iz tkivnih vzorcev ali brisov sluznice sprva osamimo DNA, ki jo nato razrežemo z ustreznimi restrikcijskimi endonukleazami. Nastale fragmente DNA ločimo po velikosti z elektroforezo v gelu in jih prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano. Dodane označene lovke hibridizirajo le s fragmentni DNA na membrani, ki imajo povsem komplementarno zaporedje nukleotidov. Po hibridizaciji odstranimo pribitek lovke, položaj fragmentov DNA, ki so hibridizirali z lovkami, pa ugotovimo z avtoradiografijo ali ustrezno encimsko reakcijo (Southern, 1975).

Metoda predstavlja eno najbolj občutljivejših in specifičnih metod za odkrivanje okužb s HPV in je obenem edina, s katero lahko ugotovimo fizikalni status HPV DNA v celici, to je, ali gre za vključeno (integrirano) ali episomalno obliko (Poljak in sod., 1993). Ker pa je metoda časovno zamudna, draga, neprimerna za obdelavo večjega števila vzorcev in za izvedbo zahteva relativno velike količine DNA (5-10 μl), za rutinsko diagnostiko ni primerna (Brandsma in sod., 1989).

2.2.2.1.2 Hibridizacija dot-blot

Hibridizacija dot-blot je tehnično enostavnejša različica predhodno opisane metode, pri kateri nanašamo osamljeno DNA, brez predhodne encimske razgradnje, neposredno na najlonsko membrano. Sledi hibridizacija z radioaktivno ali neradioaktivno označenimi lovkami po postopku, opisanem v poglavju 2.2.2.1.1. V primeru uspešne hibridizacije je na filmu (radioaktivno označene lovke) ali na najlonski membrani (neradioaktivno označene lovke) viden madež (Poljak in sod., 1998).

Z uporabo te metode se izognemo razgradnji DNA z dragimi restrikcijskimi endonukleazami, ločevanju fragmentov DNA z elektroforezo v gelu in prenosu fragmentov DNA z gela na membrano, zato je metoda hitrejša, cenejša in primernejša za obdelavo večjega števila vzorcev. Negativne strani metode pa so manjša občutljivost v primerjavi z analizo Southern blot in nagnjenost k proizvajanju lažno pozitivnih rezultatov, če hibridizacije ne izvajamo v strogo nadzorovanih pogojih (Poljak in sod., 1993).

2.2.2.1.3 Hibridizacija *in situ* na filtru

Hibridizacija *in situ* na filtru (FISH, angl. filter *in situ* hybridization) je sodobnejša in nekoliko poenostavljena različica hibridizacije dot-blot, pri kateri se izognemo zamudnim postopkom izolacije DNA. Celice ali tkivo le kratkotrajno izpostavimo delovanju močnega reagenta, ki celice razkroji. Razpadle celice prenesemo na filter oz. membrano in izvedemo hibridizacijski postopek. Prednost metode je enostavnost, hitrost in zmožnost obdelave večjega števila vzorcev (Poljak in sod., 1998).

2.2.2.1.4 Hibridizacija *in situ*

Pri metodi hibridizacija *in situ* (ISH, angl. *in situ* hybridization) poteka denaturacija in hibridizacija v okuženih celicah (*in situ*) in ne na najlonskih ali nitroceluloznih membranah. Med vsemi hibridizacijskimi metodami je edina, s katero se poleg dokazovanja navzočnosti virusov istočasno natančno določi tudi lega virusnih nukleinskih kislin (Poljak in sod., 1993). ISH se izvaja na citoloških vzorcih ali na tkivnih rezinah, ki

so lahko sveže, zamrznjene, fiksirane v formalinu ali kakšnem drugem fiksativu. Pri razgradnji z različnimi proteazami celice postanejo prepustne in tako omogočajo radioaktivno in neradioaktivno označenim lovkam vstop v celico, kjer pride do hibridizacije z znotrajceličnimi tarčnimi nukleinskimi kislinami. Razvoj neradioaktivno označenih lovk in komercialnih diagnostičnih kompletov je omogočil uvedbo ISH v rutinsko diagnostiko okužbe s HPV. V večini diagnostičnih kompletov, ki jih uporabljamo danes, so lovke označene z biotinom. Uspešno hibridizacijo lovke s komplementarnim delom tarčne DNA prikažemo z visokoznačilnim avidinoma ali antibiotinskimi protitelesi, označenimi z alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo. Po dodatku encimskega substrata se del celice, kjer so iskana nukleotidna zaporedja oz. virusi, pri pozitivni reakciji obarva, kar opazujemo s svetlobnim mikroskopom (Poljak in sod., 1998; Autillo-Touati in sod., 1998).

Glavne prednosti metode so enostavnost, hitrost, ponovljivost, razmeroma nizka cena, možnosti hkratnega testiranja večjega števila vzorcev, možnost natančne lokalizacije virusne DNA v celici in možnost primerjave morfoloških sprememb v tkivih okuženih z določenim genotipom HPV. Metoda je primerna za testiranje starih, v formalinu fiksiranih vzorcev in tako nudi možnost retrogradnih raziskav.

V primerjavi z metodami, pri katerih poteka hibridizacija s predhodno osamljeno DNA, je ISH nekoliko manj občutljiva, kar je njena glavna pomanjkljivost. Druga pomanjkljivost je, da so komercialno dostopne lovke, ki so značilne za sedem genotipov HPV (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-31 in HPV-51) (Nuovo in Richart, 1989).

2.2.2.1.5 Tekočinska hibridizacija

Test Hybrid Capture (Digene Laboratories, Silver Spring, MD, ZDA) je trenutno edini test za diagnostiko okužbe s HPV, ki ima dovoljenje FDA za uporabo v humani medicini. Metoda temelji na tekočinski hibridizaciji, pri kateri pride do hibridizacije tarčne DNA HPV z neradioaktivno označenimi RNA lovkami prosto v tekočini. V mešanici so enovijačne RNA lovke dveh tipov: ene so usmerjene proti nizkorizičnim, druge pa proti visokorizičnim genotipom HPV. Nastali hibridizacijski kompleksi se vežejo na poliklonska protitelesa, vezana na netopen nosilec (notranjost reakcije posodice, vdolbinica

mikrotiterske ploščice). Hibride zaznamo z alkalno fosfatazo označenimi protitelesi proti hibridom RNA:DNA in s kemiluminiscentni substratom. Intenziteto svetlobe, ki jo oddaja kemiluminiscentni substrat, merimo z luminimetrom in jo izražamo v relativnih svetlobni enotah (RLU, angl. relative light units). Intenziteta sproščene svetlobe je sorazmerna količini vezanih hibridov oz. količini DNA HPV v kliničnem vzorcu (Poljak in sod., 1999).

Obstajata dve generaciji testa Hybrid Capture, od katerih se trenutno uporablja novejša, druga generacija testa (HC II). S kompletom lovk za visokorizične oz. nizkorizične genotipe HPV lahko s testom Digene Hybrid Capture (HC II) dokažemo skupino 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68) in skupino 5 nizkorizičnih (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43, HPV-44) genotipov HPV. Test HC II ne omogoča natančnega določanja genotipa HPV. V primerjavi z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) je manj občutljiv, vendar je bolj specifičen in ima večjo pozitivno napovedno vrednost za CIN III kot PCR. Pomankljivost testa HC II so občasno lažno pozitivni rezultati zaradi navzkrižne reaktivnosti visokorizičnega kompleta DNA lovk z nekaterimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test (Poljak in sod., 2002).

2.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) je trenutno najobčutljivejša metoda za dokazovanje okužbe s HPV in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 1994). Dokazovanje virusov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za virus značilnega majhnega odseka njegovega genoma. Reakcija je sestavljena iz 25 do 40 ponovitev temperaturnih ciklov zaporedne denaturacije osamljene DNA, spajanja izbranih začetnih oligonukleotidov s komplementarnimi zaporedji ter sinteze nove komplementarne DNA v področju med začetnima oligonukleotidoma. Vsaka novo sintetizirana kopija odseka DNA služi kot matrica v naslednjem ciklu reakcije. Na ta način se začetni tarčni odseki virusne DNA v reakciji eksponentno kopičijo (Poljak in sod., 1994).

Ker začetni oligonukleotidi izbirajo odsek genoma HPV, ki bo v reakciji pomnožen, je njihov pravilen izbor najpomembnejši korak optimizacije PCR (Poljak in sod., 1996; Manos in sod., 1989). Za pomnoževanje virusnega genoma HPV izbiramo med dvema različnima vrstama začetnih oligonukleotidov (genotipsko značilnimi in skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi). Raznolikost nukleotidnih zaporedij med posameznimi genotipi HPV onemogoča razvoj preprostih, univerzalnih začetnih oligonukleotidov in protokola PCR za dokazovanje vseh genotipov HPV (Poljak in sod., 2005). Pri določitvi genotipa HPV je potrebno izvesti veliko reakcij PCR z uporabo različnih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov. Kljub učinkovitosti in veliki specifičnosti nekaterih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov, genotipizacija z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi ni primerna za opredeljevanje genotipov v velikem številu vzorcev (Troffater, 1997; Reid in Lorincz, 1995).

Veliko uporabnejše so metode, ki temeljijo na uporabi skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnoževanje širokega spektra genotipov HPV v eni sami reakciji PCR (Bernard in sod., 1994; Troffater, 1997; Reid in Lorincz, 1995; Baay in sod., 1996; Resnick in sod., 1990). V literaturi so opisani številni skupinsko značilni začetni oligonukleotidi, ki pomnožujejo manjše ali večje odseke gena L1 (Manos in sod., 1989; Snijders in sod., 1990; Maki in sod., 1991; Williamson in Rybicki, 1991; Snijders in sod., 1991; de Roda in sod., 1995; Berkhout in sod., 1995), E6 (Yoshikava in sod., 1990; Resnick in sod., 1990; Lungu in sod., 1995), E6/E7 (Fujinaga in sod., 1991; Evander in Wadel, 1991), E7/E1 (Evander in Wadel, 1991) in E1 (Gregoire in sod., 1989; van den Brule in sod., 1990; Rodu in sod., 1991; Tieben in sod., 1993; Contorini in Leoncini, 1993). Izmed teh so največkrat uporabljeni skupinski značilni začetni oligonukleotidi MY09/MY11, GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450, 150 oz. 65 bp dolg odsek visoko ohranjenega virusnega genoma L1 (Poljak in sod., 2005).

Vsaki reakciji PCR sledi dokazovanje specifičnosti pridelkov, za kar je na voljo več metod:

- Pomnožene dele DNA ločimo z elektroforezo v gelu in njihove velikosti primerjamo z velikostjo standardnih delov DNA, ločenih v enakih razmerah elektroforeze.

Specifičnosti in občutljivost tovrstnega dokazovanja pridelka PCR je majhna (Poljak in sod., 1994).

- Z metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (RFLP, angl. restriction fragment length polymorphism) pridelek reakcije PCR izpostavimo delovanju restrikcijskih endonukleaz in nastali vzorec primerjamo s teoretično določenim vzorcem razgradnje pričakovanega odseka DNA. Obstajajo številne različice metod RFLP, ki se med seboj razlikujejo glede na število in vrsto uporabljenih restrikcijskih endonukleaz (Poljak in sod., 1998). Zanesljivost metode narašča s povečanjem števila restrikcijskih endonukleaz. Najzanesljivejša je metoda RFLP z uporabo 7 restrikcijskih encimov, s katero je omogoče opredeliti 44 različnih anogenitalnih genotipov HPV (Bernard in sod., 1994).
- V encimsko oligonukleotidnem testu dokazujemo pridelek PCR z značilnimi lovkami v mikrotitracijskih ploščicah. Rezultat hibridizacije odčitamo spektrofotometrično. Spektrofotometrična analiza omogoča objektivno interpretacijo rezultatov (Lungu in sod., 1995; Poljak in Seme, 1996). Roche AMPLICOR HPV Test (Roche Diagnostics) je komercialno dostopen test, ki temelji na encimsko oligonukleotidnem testu in s katerim je mogoče dokazati skupino 13 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68). Njegova pomankljivost je v tem, da ne omogoča neposredne genotipizacije HPV (Poljak in sod., 2005).
- Reverzni dot-blot je bila do sedaj največkrat uporabljena metoda za analizo pridelkov HPV PCR (Bauer in sod., 1991). Izvaja se po klasičnem protokolu za dot-blot, le da se na najlonsko membrano s pomočjo vakuuma nanaša pridelek PCR in ne osamljena DNA (Resnick in sod., 1994). Temu sledi hibridizacija z genotipsko značilnimi lovkami. Te morajo biti izbrane tako, da se v procesu hibridizacije vežejo na komplementarno zaporedje pomnoženega dela genoma, ki je značilno le za posamezne genotipe HPV.

- Reverzni line-blot je metoda, ki temelji na hibridizaciji s PCR pomnoženega odseka genoma HPV z genotipsko značilnimi lovkami, nanesenimi na nitrocelulozno membrano v obliki jasnih trakov (Kleter in sod., 1999). Metoda je primerna za analizo velikega števila vzorcev, saj omogoča sočasno hibridizacijo pridelkov PCR z velikim številom genotipsko značilnih lovk. Tako je mogoče opredeliti širok spekter genotipov HPV, med njimi tudi okužbe z več različnimi genotipi HPV (mešane okužbe). Pri družbi Innogenetics (Gent, Belgija) so razvili komercialno dostopen test INNO-LiPA, s katerimi je trenutno mogoče opredeliti 25 različnih anogenitalnih genotipov HPV: 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68/-73), 8 nizkorizičnih (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-70) in 4 genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom (HPV-34, HPV-53, HPV-66, HPV-74). Test temelji na pomnoževanju 65 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi SPF10 (Kleter in sod., 1999). Nedavno je družba Roche Diagnostics Molecular Systems (Branchburg, NJ) razvila dve različici metode reverzni line-blot za opredeljevanje anogenitalnih genotipov HPV. Tets prve generacije, s katerim je moč opredeliti 27 različnih genotipov HPV, temelji na pomnoževanju 450 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi MY09/MY11 (PGMY09/PGMY11) in HMB01 (Coutlée in sod., 1999). Nedavno razviti test druge generacije, Linear Array HPV Genotyping Test omogoča opredelitev 37 genotipov HPV (Poljak in sod., 2005).
- Z določanjem nukleotidnega zaporedja oz. sekvenčno analizo lahko dokončno in popolnoma potrdimo specifičnost pridelkov PCR oz. opredelimo genotip HPV (Feoli-Fonesca, 1999; Rady in sod., 1993; Rady in sod., 1995; Kitchin in Bootman, 1993). V primerjavi z drugimi molekularnimi metodami za genotipizacijo HPV, omogoča metoda določanja nukleotidnega zaporedja natančnejšo opredelitev že znanih genotipov HPV, odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic HPV in opredeljevanje novih genotipov HPV. Metoda je posebno primerna za dokazovanje in genotipizacijo kožnih genotipov HPV in genotipov EV-HPV, saj je tudi metod, s katerimi bi lahko potrdili specifičnost pridelkov PCR nastalih s pomnoževanjem s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi, zelo malo (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.2.1 PCR v realnem času

PCR v realnem času (angl. real time PCR) predstavlja nadgradnjo različice klasične PCR, kjer pomnoževanje tarčne DNA HPV poteka istočasno kot določanje specifičnosti pomnoženih pridelkov PCR z uporabo različnih fluorescentno označenih lovk (Molijn in sod., 2004). Metoda bo najverjetneje v nekaj letih postala najbolj uporabna metoda za dokazovanje in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.2.2 RT-PCR (angl. reverse transcriptase PCR)

Poleg opisanih metod, ki temeljijo na dokazovanju prisotne DNA HPV, se v zadnjem času uvajajo metode za dokazovanje sporočilne RNA (mRNA) nekaterih genotipov HPV. Tako je družba Norchip (Klokkarstua, Norveška) nedavno razvila komercialno dostopen test PreTect® HPV Proofer Kit, s katerim je mogoče opredeliti E6/E7 mRNA 5 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31 in HPV-45) (Molijn in sod., 2004).

2.5 NAMEN DELA

Dolgo trajajoča okužba z visokorizičnimi genotipi HPV je glavni etiološki dejavnik za nastanek raka materničnega vratu, druge najpogostejše oblike raka pri ženskah v svetu in tudi v Sloveniji (Lazo, 1999; Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Dokazovanje okužbe s HPV trenutno temelji izključno na uporabi molekularnih metod, med katerimi se najpogosteje uporabljata test tekočinske hibridizacije in verižna reakcija s polimerazo (PCR) (Ammatuna in sod., 2004). Občutljivost PCR je odvisna predvsem od pravilne izbire začetnih oligonukleotidov, kar je posebej opazno pri HPV, ki kažejo veliko genetsko raznolikost. Pri reakciji z verižno polimerazo lahko za pomnoževanje genoma HPV (dokaz okužbe s HPV) uporabimo genotipsko- ali skupinsko-značilno začetne oligonukleotide. Uporaba slednjih se je izkazala za primernejšo metodo, saj skupinsko-značilni oligonukleotidi, ki so komplementarni najbolj ohranjenim delom genoma večine genotipov HPV, omogočajo pomnoževanje širokega spektra genotipov v eni sami PCR reakciji. Za dokončno opredelitev genotipov HPV omogoča metoda določanja nukleotidnega zaporedja v primerjavi z drugimi molekularnimi metodami natančnejšo opredelitev že znanih genotipov HPV, odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic HPV in opredeljevanje novih genotipov (Poljak in sod., 2005). V primeru sočasne okužbe z večimi genotipi HPV hkrati, se za opredelitev genotipov alfa-HPV lahko poslužujemo metode encimske razgradnje pridelkov PCR (RFLP) ali pa z metodo kloniranja pridelke PCR najprej vgradimo v plazmidne vektorje, jih razmožimo v ustreznih bakterijskih sistemih in šele nato iz osameljene plazmidne DNA določimo specifična oligonukleotidna zaporedja (Williamson in sod., 2002). Ker je metoda kloniranja časovno zamudna, draga in dokaj tehnično zahtevna, se danes uporablja le v raziskovalne namene (Poljak in sod., 2005).

Zaradi dokaj poznega spoznanja vpletenosti določenih visokorizičnih genotipov beta-HPV v etiologijo razvoja kožnega raka, pri zdravih kot pri imunsko oslabljenih ljudeh, je trenutno za dokazovanje prisotnosti HPV v vzorcih kože na voljo ožji nabor molekularnih metod (Harwood in sod., 1999). Najpogosteje se za dokazovanje genotipov HPV kožnih vzorcev uporablja metoda vgnezdene PCR z za EV-genotipe HPV značilnimi začetnimi oligonukleotidni (M^a/H^a), ki omogoča pomnoževanje široke beta skupine genotipov beta-

HPV (Boxman in sod., 1999). Zaradi veliko večjega deleža vzorcev (30 % v primerjavi 10-20% pri anogenitalnih vzorcih) s sočasno okužbo z večimi genotipi beta-HPV je nadaljna, dokončna opredelitev genotipa z metodo določanja nukleotidnega zaporedja mnogokrat otežena (Harwood in sod., 2000). V literaturi sta opisani dve molekularni metodi opredelitve genotipov HPV v primerih sočasne okužbe z večimi genotipi HPV hkrati, in sicer predhodno omenjena metoda kloniranja pridelkov PCR ter različice metode vgnezdene PCR pri čemer v prvem koraku pomnožujemo s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi, ki se nalegajo na ohranjeno mesto vseh opredeljenih genotipov beta-HPV, v drugem koraku pa dodamo t.i. notranje za različne podskupine genotipov beta-HPV značilne začetne oligonukleotide (Harwood in sod., 1999).

V prvem delu diplomske naloge smo želeli primerjati učinkovitost metode encimske razgradnje pridelkov PCR (RFLP) in metode kloniranja pridelkov PCR pri odkrivanju sočasnih okužb z večimi genitalnimi genotipi HPV v predhodno pripravljenih vzorcih.

V drugem delu raziskave smo z optimizirano metodo kloniranja poskušali opredeliti genotipe HPV v kliničnih vzorcih z domnevno sočasno okužbo z večimi genotipi beta-HPV.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Klinični vzorci vključeni v eksperimentalni del naloge primerjave učinkovitosti genotipizacijskih metod pri sočasni okužbi z večimi genotipi alfa-HPV

Za primerjavo učinkovitosti genotipizacijske metode encimske razgradnje pridelkov PCR (RFLP) in metode kloniranja pridelkov PCR pri odkrivanju sočasnih okužb z večimi genotipi alfa-HPV smo vključili 4 izolate DNA kliničnih vzorcev s predhodno opredeljenimi genotipi alfa-HPV iz arhivske zbirke Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Iz izbranih izolatov DNA smo pripravili mešanico do 4 genotipov HPV, z enako medsebojno koncentracijo DNA.

3.1.2 Klinični vzorci, vključeni v raziskovalni del naloge, pri katerih je bila predhodno dokazana okužba z genotipi beta-HPV

V nalogo smo vključili 4 klinične DNA vzorce iz arhivske zbirke Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pri katerih je bila predhodno z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanje nukleotidnega zaporedja opredeljena okužba z vsaj enim genotipom beta-HPV.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava eksperimentalne mešanice genotipov HPV

Za eksperimentalni del naloge smo izbrali 4 izolate DNA kliničnih vzorcev s predhodno opredeljenimi genitalnimi genotipi HPV. Pripravili smo 4 eksperimentalne vzorce izolatov DNA, ki so vsebovale mešanico do 4 genitalnih genotipov z enako medsebojno koncentracijo DNA, ter jih pomnožili s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX} in PGMY11^{MIX} (preglednica 3).

Preglednica 3 : Pripravljeni eksperimentalni vzorci z mešanico genotipov HPV enake medsebojne koncentracije DNA

Št. eksp. vzorca	Vključeni genotipi HPV
1	HPV-53
2	HPV-53, HPV-31
3	HPV-53, HPV-54, HPV-16
4	HPV-53, HPV-54, HPV-16, HPV-31

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje gena L1 anogenitalnih genotipov HPV

Za pomnoževanje izbranih genotipov HPV eksperimentalnih vzorcev, smo uporabili skupinsko značilne oligonukletidne začetnike PGMY09^{MIX} in PGMY11^{MIX}, ki pomnožujejo 450 bp velik del gena L1 HPV najmanj 42 različnih anogenitalnih genotipov HPV (Gravitt in sod., 2000). Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so podane v preglednici 4.

Preglednica 4 : Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov PGMY09/11^{MIX} (Gravitt in sod., 2000)

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje začetnega nukleotida
PGMY11-A	5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3'
PGMY11-B	5'-GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG-3'
PGMY11-C	5'-GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG-3'
PGMY11-D	5'-GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG-3'
PGMY11-E	5'-GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG-3'
PGMY09-F	5'-CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC-3'
PGMY09-G	5'-CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC-3'
PGMY09-H	5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC-3'
PGMY09-I	5'- . . G CCA AGG GGA AAC TGA TC-3'
PGMY09-J	5'-CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC-3'
PGMY09-K	5'-CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC-3'
PGMY09-L	5'-CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC-3'
PGMY09-M	5'-CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC-3'
PGMY09-N	5'-CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC-3'
PGMY09-P	5'- . . G CCC AAC GGA AAC TGA TC-3'
PGMY09-Q	5'-CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC-3'
PGMY09-R	5'-CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC-3'

3.2.2.1 Sestava reakcijske mešanice za reakcijo PCR

Za pomnoževanje HPV DNA s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/11^{MIX} smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) in mešanico nukleotidov iz kompleta AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Za pomnoževanje DNA smo uporabili računalniško vodeni GeneAmp® PCR System tip 2400 (Applied Biosystems).

3.2.2.2 Pogoji pomnoževanja s PCR

V sterilno reakcijsko posodico za pomnoževanje s PCR z začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} smo odpipetirali 46 µl reakcijske mešanice in 4 µl osamljene DNA eksperimentalnega vzorca. Reakcijska mešanica je vsebovala po 2,1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 µl 10x PCR pufru (10x Gold PCR Buffer), 1,56 mM MgCl₂, 1,30 IU encima AmpliTaq DNA Polymerase, 0,4 µl oligonukleotidnega začetnika PGMY11^{MIX}, 1,4 µl oligonukleotidnega začetnika PGMY09^{MIX} in 35,21 µl deionizirane vode.

Pomnoževanje dela gena L1 z začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} smo izvedli s 40-kratnim ponavljanje temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 1 minuto pri 95 °C, 1 minuto pri 55 °C in 1 minuto pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 9 minut inkubirali pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo termostabilnega encima AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Zadnjemu ciklu PCR je sledila 4 minutna inkubacija pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C

3.2.3 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR

Pridelke PCR smo dokazovali z elektroforezo v gelu. Uporabljali smo elektroforezno aparaturo SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) in komercialno dostopne, že pripravljene hidrogelne za večkratno uporabo Wide Mini Clearose BG-EtBr (Elchrom Scientific AG). Geli so sestavljeni iz 1% agaroze prečno zamrežene s polimerom BG (1,4-butandiol diglicidileter) in omogočajo optimalno zaznavanje delcev DNA, velikih med 100 in 2000 bp. Elektroforezni pufer smo pripravili iz 1950 ml dvojno deionizirane vode, 50 ml 40x pufru TAE (Elchrom Scientific AG) in 100 µl (10 mg/ml) etidijevega bromida (Innogenetics N.V., Gent, Belgija) in z njim prelili v elektroforezno kadičko vstavljen gel tako, da je segal nivo pufru 2 do 3 mm nad zgornjo platinasto žičko v aparaturi. Etidijev bromid je interkalatno barvilo, ki se vgradi v dvojnovijačno DNA. Po izpostavitvi

ultravijolični (UV) svetlobi se etidijev bromid, vezan v dvojnovijačni DNA aktivira in tako omogoča opazovanje delcev DNA v gelu. Gel, ki smo ga uporabili vsebuje 13 vdolbinic (dolžine ene vdolbinice je 7 mm, širina 1,5 mm, višina 2,7 mm), v katere lahko naneseemo od 5 do 8 μ l mešanice pridelka PCR in pufra za nalaganje.

V začetno vdolbinico gela smo vedno dodali molekularni označevalec 100 bp (Roche Diagnostics), ki vsebuje delce velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600...1500 bp in dodatni 2642 bp dolg delec DNA.

V ostale vdolbinice gela smo nanašali mešanico, ki smo jo pripravili iz 6 μ l pridelka PCR in 1,5 μ l ustrezne tamponske raztopine Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG).

Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi 15 minut, s samodejno vključitvijo črpalke za kroženje pufra 1,5 minute po začetku elektroforeze in napetosti med elektrodama 120V. Po končani elektroforezi smo gel z nanešenimi vzorci pregledali pod UV svetlobo v UV transiluminatorju in ga fotografirali s polaroidno kamero. Specifičnost namnoženega pridelka PCR je določala njegovo velikost glede na velikost pozitivne kontrole in elektroforezne dolžinske lestvice 100 bp.

3.2.4 Encimska razgradnja produktov verižne reakcije s polimerazo

Za opredeljevanje genotipov DNA HPV eksperimentalnih vzorcev smo uporabili metodo encimske razgradnje produktov verižne reakcije s polimerazo (RFLP). Metodo RFLP smo izvedli z uporabo treh različnih različnih restrikcijskih endonukleaz DdeI, HaeIII in RsaI (Gibco-BRL, Bethesda, ZDA) po opisanem postopku: v sterilno 1,5 ml epruveto smo odpipetirali 5 μ l pridelka PCR in 10 μ l mešanice za encimsko razgradnjo, sestavljene iz 7,5 μ l sterilne deionizirane vode, 1 μ l restrikcijskega encima (5-10 UI) in 1,5 μ l ustreznega pufra. Pripravljeno mešanico smo 60 minut inkubirali na stresalniku pri 37 °C (Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Encimsko reakcijo smo zaustavili z dodatkom 2 μ l raztopine X (15% Ficoll 400, 0,35% brom-fenolno modrilo).

Za ločevanje posameznih delcev razgrajenega pridelka PCR smo uporabljali elektroforezno aparaturo SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) in komercialno dostopne, že pripravljene hidrogelne za enkratno uporabo Spreadex EL 800 Wide Mini (Elchrom Scientific AG), ki omogočajo optimalno zaznavanje delcev DNA velikosti med 60 in 800 bp. Elektroforezni pufer smo pripravili iz 1950 ml dvojno deionizirane vode predhodno ohlajene na 4 °C in 50 ml 40x pufra TAE (Elchrom Scientific AG) in z njim prelili v elektroforezno kadičko vstavljen gel tako, da je segal nivo pufra 2 do 3 mm nad zgornjo platinasto žičko v aparaturi.

V zadnjo, dvanajsto vdolbinico gela smo dodali molekularni označevalec 50 bp (Roche Diagnostic), ki vsebuje delce velikosti 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400...750 bp in dodatni 2642 bp dolg delec DNA. V ostale vdolbinice gela smo nanесли mešanico, ki smo jo pripravili iz 3,5 µl vzorca encimske razgradnje pridelka in 1,5 µl razredčene tamponske raztopine Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG).

Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi 115 minut, s samodejno vključitvijo črpalke za kroženje pufra 4,5 minute po začetku elektroforeze in napetosti med elektrodoma 120V.

Po končani elektroforezi smo gelu odstranili plastični hrbet in prenesli v banjico, kateri smo predhodno dodali 200 ml dvojno deionizirane vode in 8 µl (100mg/ml) etidijevega bromida (Innogenetics N.V.). Tako pripravljeno banjico z vloženim gelom smo inkubirali v temi (prekrili z alufolijo) pri sobni temperaturi na stresalniku za 45 minut. Po končani inkubaciji je sledil postopek razbarvanja oz. odstranitev nevezanega etidijevega bromida, pri čemer smo zavrgli deionizirano vodo z etidijevim bromidom in jo zamenjali za 200 µl dvojno deionizirane vode. Banjico z vloženim gelom smo ponovno prekrili z alufolijo in jo na stresalniku inkubirali prekonoči pri sobni temperaturi.

Po končani prekonočni inkubaciji smo gel pregledali pod UV svetlobo in ga fotografirali z digitalnim sistemom BioRad Gel Doc 2000 System (Bio-Rad, Hercules, ZDA). Vzorce encimske razgradnje pridelkov PCR smo s pomočjo programa Quantity One 4.5.2 primerjali s predhodno določenimi standardnimi vzorci razgradnje in na ta način opredelili

genotip HPV. Standardni vzorci razgradnje pridelkov PCR za v vzorcih uporabljene genotipe HPV so prikazani v preglednici 5

Preglednica 5 : Standardni vzorci razgradnje 450 bp velikega dela gena L1 pomnoženega s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} (Bernard HU in sod., 1994).

Genotip HPV	DdeI	HaeIII	RsaI
HPV16	452	444	310 72 70
HPV31	452	328 124	380 72
HPV45	324 131	447	338 72 45
HPV53	206 158 85	232 217	138 125 117 72

3.2.5 Čiščenje pridelkov PCR in določanje določanje koncentracije

Pridelke PCR eksperimentalnih vzorcev z izbranimi genitalnimi genotipi HPV, pomnoženih s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/11^{MIX}, kot tudi pridelke PCR vzorcev vključenih v raziskovalni del naloge, pri katerih je bila predhodno z metodo vgnedene PCR z za genotipe beta-HPV značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanje nukleotidnega zaporedja opredeljena sočasna okužba z dvema ali več genotipi EV-HPV, smo očistili s komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Eni volumski enoti pridelka PCR smo dodali 5 volumskih enot pufru PB in dobro premešali. Nastalo mešanico smo prenesli v mikrokolono, vloženo v 2 ml zbiralno tubico in centrifugirali 1 minuto pri 13000

rpm. Izpirek in zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa postavili v novo zbiralno tubico in dodali 750 μ l pufra PE. Sledilo je enominutno centrifugiranje vzorca pri 13000 rpm. V nadaljevanju smo mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico in centrifugirali 1 minuto pri 15000 rpm. V zadnji fazi smo mikrokolono postavili v novo 1,5 ml tubico, dodali 30-50 μ l pufra EB (10 mM Tris-Cl, pH=8,5) in vzorec inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Pridelke PCR smo iz membranskega filtra mikrokolone eluirali z enominutnim centrifugiranjem pri hitrosti 13000 rpm in jih do uporabe shranili pri -20°C. Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določali na 1,7% agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku. V stekleno čašo smo odtehtali 0,85 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in dodali 50 ml 1x pufra TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH=8,3). Rastopino agaroze smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Rastopini smo dodali 5 μ l etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics N.V.) in jo ohladili v kalupu z elektroforeznimi glavnički.

Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Submarine Unit (Hoefler, San Francisco, ZDA) in ga prelili s puffrom 1x TAE, ohlajenim na 4°C. V začetno vdolbinico smo dodali 10 μ l koncentracijskega molekularnega označevalca Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Vilnius, Litva), ki vsebuje različno velike delce DNA (80-1031 bp) v koncentracijah 0.8, 1, 2, 3, 4, 10, 6, 7, 8, 9 in 10 ng/ μ l. V ostale vdolbinice gela smo nanašali mešanico, ki smo jo pripravili iz 10 μ l očiščenega pridelka PCR in 2 μ l ustrezne tamponske raztopine 6x MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 30 minut in napetosti med elektrodama 120V. Po končani elektroforezi smo gel z očiščenimi pridelki PCR pregledali pod UV svetlobo na UV transiluminatoriju in ga fotografirali s polaroidno kamero. Iz primerjave intenzitete delcev DNA koncentracijskega molekularnega označevalca in pridelkov PCR, smo s pomočjo programa BioRad Gel Doc 2000 System (Bio-Rad) določili koncentracije pridelkov PCR.

3.2.6 Metoda kloniranja pridelkov PCR

Za vgrajevanje (kloniranje) očiščenih pridelkov PCR v klonirne vektorje in transformacijo tračnih celic smo uporabili komponente, ki so sestavni del del kompleta pGem®-T Easy Vector System (Promega, Madison, ZDA) in sledili priloženem protokolu.

3.2.6.1 Vključitev pridelkov PCR (inserti) v klonirne vektorje

Za posamezen pridelek PCR smo v 1,5 ml sterilno epruveto, z nizko anafiniteto vezave DNA, zamešali po 5 µl ligacijskega pufra 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 1 µl raztopine pGem®-T Easy Vector in 1 µl raztopine T4 DNA Ligase. Tako pripravljenim ligacijskim mešanicom smo dodali različne volumne pridelkov PCR, ki so variirali glede na predhodno izmerjene koncentracije in na izbrano molarno razmerje s klonirnim vektorjem (preglednica 6 in 7). V kolikor je bil končni volumen ligacijske mešanice manjši od 10 µl, smo le-tega dopolnili z deonizirano vodo. Sočasno smo pripravili še dve kontrolni ligacijski mešanici: pozitivno kontrolno ligacijsko mešanico, ki je namesto PCR pridelka vsebovala 2 µl raztopine Control Insert DNA, ter negativno kontrolno ligacijsko mešanico, brez dodanega pridelka PCR kot tudi raztopine Control Insert DNA (preglednica 8). Tako pripravljene ligacijske mešanice smo nato dobro premešali in inkubirali preko noči pri 4°C.

Preglednica 6: Dodani volumni pridelkov PCR pomnoženih s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09/11^{MIX} na podlagi ocenjene koncentracije očiščenih pridelkov PCR in izbranega molarnega razmerja s klonirnim vektorjem pGEM®-T Easy Vector v ligacijski reakciji

Vzorec	Ocenjena koncentracija pridelka PCR	Molarno razmerje pridelok PCR : klonirni vektor v ligacijski mešanici	Dodani volumen pridelka PCR v ligacijsko mešanico
1	4 ng/μl	2 : 1	3,75 μl
2	4 ng/μl	2 : 1	3,75 μl
3	6 ng/μl	3 : 1	3,75 μl
4	6 ng/μl	4 : 1	5 μl

Preglednica 7: Dodani volumni pridelkov PCR pomnoženih z za EV-HPV genotipe značilne začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a v ligacijske mešanice, na podlagi ocenjene koncentracije in izbranega molarnega razmerje s klonirnim vektorjem pGEM®-T Easy Vector v ligacijski reakciji

Vzorec	Ocenjena koncentracija pridelka PCR	Molarno razmerje pridelok PCR : klonirni vektor v ligacijski mešanici	Dodani volumen pridelka PCR v ligacijsko mešanico
1	20 ng/μl	3 : 1	1,13 μl
2	20 ng/μl	1 : 1	0,37 μl
3	6 ng/μl	3 : 1	3,75 μl
4	8 ng/μl	3 : 1	2,8 μl

Preglednica 8: Sestava ligacijske mešanice. X označuje dodani volumen PCR pridelka, ki je odvisen od njegove koncentracije ter izbranega molarnega razmerja s klonirnimi vektorjem pGEM®-T Easy Vector

Komponente	Standardna reakcija s PCR pridelkom	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
Ligacijski pufer (2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase)	5 µl	5 µl	5 µl
Vklonirni vektor (pGEM®-T Easy Vector)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR pridelek *	X µl	/	/
Kontrolni insert DNA (Control Insert DNA)	/	2 µl	/
Ligaza (T4 DNA Ligase)	1 µl	1 µl	1 µl
Distilirana voda, do končnega volumna ligacijske mešanice	10 µl	10 µl	10 µl

* - glej preglednico 6 in 7

3.2.6.2 Transformacija rekombinantne vektorske DNA v tarčne/kompetentne celice

Za postopek transformacije ligacijske mešanice s tarčnimi celicami JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega) smo predhodno pripravili LB (Luria-Bertani) agarске plošče z dodanim ampicilinom, IPTG (izopropil-β-D-thiogalaktopiranozid, Promega) ter X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid, Promega). Za pripravo 1000 ml LB medija smo zamešali 10 g kazein peptona (Bacto®-tryptone), 5 g kvasnega ekstrakta (Bacto®-yeast extract), 5 g NaCl ter dodali 1000 ml destilirane vode. Končni pH=7 smo uravnali s pomočjo dodanega NaOH. Tako pripravljenemu LB mediju smo na koncu dodali še 15g agarja in ga nato avtoklavirali. Ohlajenemu LB mediju smo dodali ampicilin s končno koncentracijo 100 µg/ml in ga odpipetirali po 30-35ml v 85 mm plastične petrijevke. Na celotno površino strjenega agarja smo nanесли 100 µl 100mM IPTG in 20 µl 50 mg/ml X-gal. Tako pripravljene plošče smo shranili do uporabe pri temperaturi 4 °C.

V sterilne, ohlajene v ledeni kopeli 1,5 ml epruvete, smo odpipetirali po 2 µl prekonočno inkubirane ligacijske mešanice. Tarčne/kompetentne celice JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega) zamrznjene na -70 °C, smo odtalili v ledeni kopeli, narahlo

premešali in jih po 50 µl odpipetirali v epruvete z dodanimi ligacijskimi mešanici. Vsebinsko epruvet smo narahlo premešali ter jih za 20 minut inkubirali v ledeni kopeli. V naslednjem koraku je sledil t.i. vročinski šok (angl. heat shock), pri katerem smo celice za 45-50 sekund inkubirali v vodni kopeli s temperaturo 42 °C in jih nato takoj prestavili za 2 minuti v ledeno kopel. Na koncu smo vsaki epruveti s transformiranimi celicami dodali po 950 µl SOC medija in jih inkubirali v stresalniku s hitrostjo 150 rpm za 90 minut pri 37°C. Za pripravo 100 ml SOC medija smo uporabili in izvedli po naslednjem postopku : v 97 ml deionizirane vode smo dodali 2 g kazein peptona (Bacto®-tryptone), 0,5 g kvasnega ekstrakta (Bacto®-yeast extract), 1ml 1M NaCl in 0,25 ml 1M KCl ter mešali do popolne raztopitve vseh kemikalij. Tako pripravljeno mešanico smo avtoklavirali, ohladili na sobno temperaturo in dodali raztopini glukoze ter Mg²⁺, obe s končno koncentracijo 20mM.

Na predhodno pripravljene petrijevke s LB amp/IPTG/X-gal smo odpipetirali po 100 µl inkubirane transformirane kulture celic in jih s pomočjo steklenih hokejk razmazali po celotni površini petrijevke. Tako pripravljene plošče s transformiranimi celicami smo inkubirali preko noči (16-24 ur) pri temperaturi 37 °C.

3.2.7 Izbira transformiranih kolonij celic JM109 High Efficiency Competent Cell in izolacija rekombinantne vektorske DNA

Za lizo transformiranih tarčnih celic in izolacijo rekombinantnega klonirnega vektorja smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Sytem (Promega) po navodilih proizvajalca.

3.2.7.1 Pomnožitev izbranih transformiranih kolonij celic JM109 High Efficiency Competent Cell

Po prekonočni inkubaciji transformiranih celic JM109 High Efficiency Competent Cell na LB amp/IPTG/X-gal ploščah, smo izbrali posamezne bele kolonije tarčnih celic JM109 (s transformiranimi rekombinantnimi klonirnimi vektorji), jih s plastičnimi ezami prenesli

v steklene epruvete z dodanimi 5 μ l LB/amp gojišča in inkubirali 16 ur v stresalniku pri 37 °C.

Za pripravo 1000 ml LB gojišča z ampicilinom smo zamešali 10 g kazein peptona (Bacto®-tryptone), 5 g kvasnega ekstrakta (Bacto®-yeast extract), 5 g NaCl in dodali 1000 ml destilirane vode. S pomočjo NaOH smo uravnali končni pH=7. Tako pripravljeno LB gojišče smo avtoklavirali, ohladili do temperature 50 °C in nato dodali ampicilin s končno koncentracijo 100 μ g/ml. V končnem koraku smo gojišče odpipetirali po 5 μ l v posamezne stekle epruvete in jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.2.7.2 Liza transformiranih bakterijskih celic JM109 High Efficiency Competent Cell in izolacija vklonirnega vektorja pGEM®-T Easy Vector

Steklene epruvete z namnoženimi kulturami celic JM109 smo centrifugirali 5 minut pri 10000 x g in dobili skupek bakterijskih celic v obliki usedline, z jasno ločenim supernatantom gojišča, ki smo zavrgli. Usedlini bakterijskih celic smo nato dodali 250 μ l raztopine Cell Resuspension Solution in jo z vorteksiranjem popolnoma resuspendirali. Celotni volumen raztopine bakterijskih celic smo prenesli v sterilne 1,5 ml epruvete in jim dodali po 250 μ l lizacijske raztopine Cell Lysis Solution. Lizirane celice smo premešali z rahlim obračanjem (4x) epruvete in jih nato inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut do zbistritve raztopine. V naslednjem koraku smo dodali po 10 μ l raztopine Alkaline Protease Solution, ponovno premešali (s 4x rahlim obračanjem epruvet) in inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut. V zadnjem koraku smo celicam dodali po 350 μ l raztopine Wizard® SV Neutralization Solution, jih ponovno premešali (s 4x rahlim obračanjem epruvet) in centrifugirali 10 minut pri maksimalni hitrosti (14000 x g) na sobni temperaturi.

Nastali supernatant raztopine plazmidne DNA smo prenesli v mikrokolono, vloženo v 2 ml zbiralno tubico in centrifugirali 1 minuto pri 13000 rpm. Izpirek smo zavrgli, mikrokolono vložili nazaj v zbiralno tubico ter dodali 750 μ l raztopine Column Wash Solution. Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 13000 rpm. Nastali izpirek smo zavrgli, mikrokolono vložili nazaj v zbiralno tubico, ter ponovili postopek z dodatkom 250 μ l raztopine Column

Wah Solution in dvominutnim centrifugiranjem pri 13000 rpm. V nadaljevanju smo mikrokolono prenesli v sterilno 1,5 µl epruveto ter dodali 100 µl raztopine Nuclease-Free Water. Plazmidne DNA smo iz membranskega filtra eulirali z enominutnim centrifugiranjem pri 13000 rpm in jih do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.8 Avtomatsko sekveniranje in določanje HPV genotipa z metodo BLAST

3.2.8.1 Določanje koncentracije izolirane plazmidne DNA

Koncentracijo izolirane plazmidne DNA smo določali na 1,7 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku. V stekleno čašo smo odtehtali 0,85 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich) in dodali 50 ml 1x puфра TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH = 8,3). Raztopino agaroze smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Raztopini smo dodali 5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics N.V.) in jo ohladili v kalupu z elektroforeznimi glavnički.

Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Submarine Unit (Hoefer) in ga prelili s puфrom 1x TAE, ohlajenim na 4°C. V začetno vdolbinico smo dodali mešanico 4 µl koncentracijskega molekularnega označevalca High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, ZDA), ki vsebuje različno velike delce DNA (1000-10000 bp) v koncentracijah 5, 10, 15, 20, 30 in 50 ng/µl ter 1 µl ustrezne tamponske raztopine 6x MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas). V ostale vdolbinice gela smo nanašali mešanico pripravljeno iz 4 µl izolirane plazmidne DNA in 1 µl ustrezne tamponske raztopine 6x MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 45 minut in napetosti med elektrodama 120V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV svetlobo. Iz primerjave intenzitete delcev DNA koncentracijskega molekularnega označevalca in plazmidnih DNA, smo s pomočjo programa BioRad Gel Doc 2000 System (Bio-Rad) določili koncentracije plazmidnih DNA.

3.2.8.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Plazmidni DNA smo določili nukleotidno zaporedje s komercialno dostopnim kompletom BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Reakcijska mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja izbrane plazmidne DNA je vsebovala 2 µl 5x sekvenčnega puфра (5x Sequencing Buffer), 4 µl BigDye® Terminator v1.1, 2,54 µl desnega začetnega oligonukleotida pUC/M13 oziroma 2,32 µl levega začetnega oligonukleotida pUC/M13, 300 ng plazmidne DNA in deonizirano vodo do 20 µl skupnega reakcijskega volumna.

Sekvenčno reakcijo smo izvedli s 25-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 4 min pri 60 °C.

Odstranitev nevgrajenih dideoksinukleotidov smo izvedli s pomočjo kompleta DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Mikrokolono s filtrom, ki vsebuje raztopino resina, smo narahlo pretresli, za četrtno navoja odvili pokrovček in odlomili spodnji del mikrokolone. Nato smo mikrokolono vložili v 2 ml zbiralno tubico in centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa postavili v novo 1,5 ml tubico. Na sredino strjenega gela, ki je v mikrokoloni nastal po centrifugiranju raztopine resina, smo nanесли celotno sekvenčno reakcijo in ponovno centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Reakcijske posodice z eluirano DNA smo nato prenesli v vakuumsko centrifugo Speed VAC SC110 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, ZDA) in sušili natanko 20 minut. V nadaljevanju smo posušeni DNA dodali 25 µl na sobno temperaturo ogrete denaturacijske raztopine Template Supresion Reagent (TSR) in nastalo mešanico prenesli v 0,2 ml reakcijske posodice za PCR. V zadnji fazi smo vzorce denaturirali 2 minuti pri 95 °C in jih takoj, za najmanj 2 minuti postavili v ledeni blok (-20 °C).

Sekvenčna analiza oziroma določanje nukleotidnega zaporedja je bila izvedena na aparaturi za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Po končanem delu računalniški program Sequencing Analysis, ki je povezan z aparaturo ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, avtomatsko obdela podatke v obliki elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

Nukleotidno zaporedje iz elektroferograma smo analizirali in obdelali z uporabo računalniškega programa BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University, ZDA). Iz primerjave komplementarnih nukleotidnih zaporedij smo za posamezen izolat HPV sestavili smiselno (angl.sense) nukleotidno zaporedje in ga uporabili za določitev genotipa HPV.

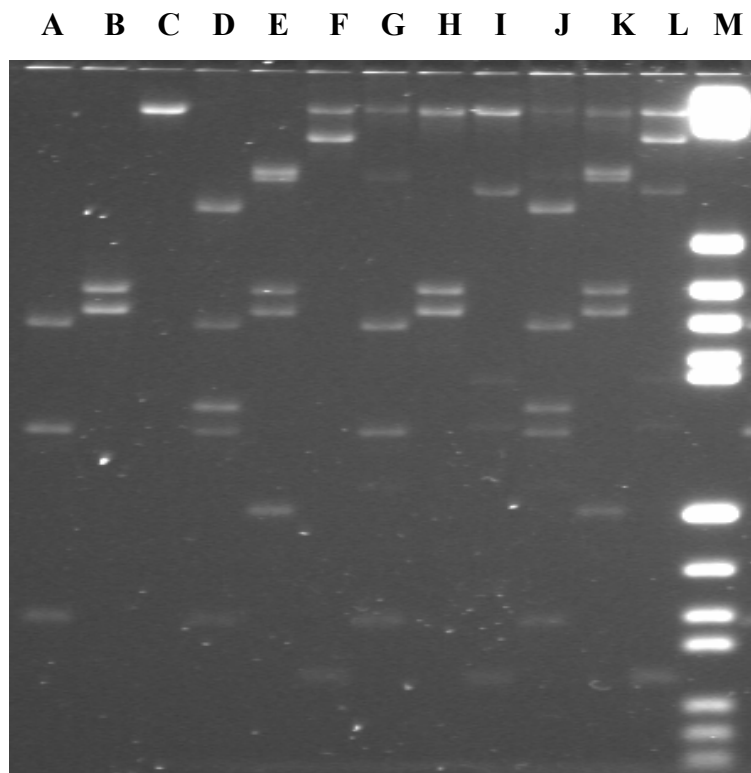
Primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij izolatov HPV z uradno priznanimi in potencialno novimi genotipi HPV smo izvedli z računalniškim programom BLAST (BLAST, 2006). Program BLAST deluje tako, da iz množice nukleotidnih zaporedij v genski banki EMBL izbere tisto(a), ki z izbranim nukleotidnim zaporedjem doseže najboljšo pozicijsko homologijo ($E = \sim 0$). Rezultate BLASTA smo potrdili s primerjavo (angl.pairwise alignment) izbranega nukleotidnega zaporedja z nukleotidnim zaporedjem referenčnega izolata HPV in izračunali odstotek podobnosti (angl. percentage of similarity).

4 REZULATI

4.1 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI GENOTIPIZACIJSKE METODE RFLP IN METODE KLONIRANJA

Za primerjavo učinkovitosti genotipizacijske metode RFLP in metode kloniranja za dokazovanje sočasnih okužb z večimi genotipi HPV smo pripravili 4 eksperimentalne vzorce z mešanico do 4 genotipov, enake medsebojne koncentracije DNA, ter jih pomnožili s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}.

Na sliki 3 so prikazani primeri opredelitve genotipov HPV vključenih v posamezne eksperimentalne vzorce z metod encimske razgradnje PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} pridelkov PCR.



Slika 3: Opredelitev genotipov HPV v eksperimentalnih vzorcih z metodo encimske razgradnje PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} pridelka PCR. Elektroforezna ločitev pridelka PCR eksperimentalnega vzorca št.1 genotipa HPV53 z DdeI (kolona A; 212 bp, 157 bp, 88 bp), HaeIII (kolona B; 233bp, 219 bp), RsaI (kolona C; 447 bp). Elektroforezna ločitev pridelka PCR eksperimentanega vzorca št. 2 genotipa HPV53 z DdeI (kolona D: 210 bp, 156 bp, 87 bp), HaeIII (kolona E; 232 bp, 218 bp), RsaI (kolona F; 447 bp) ter genotipa HPV31 z DdeI (kolona D; 304 bp, 167 bp), HaeIII (kolona E; 348 bp, 124 bp), RsaI (kolona F; 401 bp, 71bp). Elektroforezna ločitev pridelka PCR eksperimentalnega vzorca št. 3 genotipa HPV53 z DdeI (kolona G; 210 bp, 156 bp, 87 bp), HaeIII (kolona H; 233 bp, 219 bp), RsaI (kolona I; 447 bp), genotipa HPV16 z DdeI (kolona G; 450 bp), HaeIII (kolona H; 449 bp), Rsa I (kolona I; 328 bp, 70 bp) ter genotipa HPV45 z DdeI (kolona G; 345 bp, 133 bp), HaeIII (kolona H; 455 bp), RsaI (kolona I; 181 bp, 158 bp). Elektroforezna ločitev pridelka PCR eksperimentalnega vzorca št. 4 genotipa HPV53 z DdeI (kolona J; 211 bp, 157 bp, 87 bp), HaeIII (kolona K; 234 bp, 220 bp), RsaI (kolona L; 447 bp), genotipa HPV16 z DdeI (kolona J; 450 bp), HaeIII (kolona K; 470 bp), RsaI (kolona L; 328 bp, 71 bp), genotipa HPV45 z DdeI (kolona J; X bp, X bp), HaeIII (455 bp), RsaI (183 bp, 160bp), ter genotipa HPV31 z DdeI (kolona J; 306 bp, 168 bp), HaeIII (kolona K; 352 bp, 125 bp), RsaI (kolona L; 403 bp, 71 bp). Elektroforezna kolona M: molekularni označevalec DNA Molecular Weight Marker V (Roche, Basel, Švica).

Z metodo encimske razgradnje pridelkov PCR pomnoženih s skupinsko značilnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} smo uspešno opredelili vse vključene genotipe HPV v posamezne eksperimentalne vzorce (preglednica 9)

Preglednica 9: Predhodno vključeni in opredeljeni genotipi HPV z metodo encimske razgradnje PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} pridelkov PCR v eksperimentalnih vzorcih

Št. eksp. vzorca	Vključeni genotipi HPV v eksp. vzorcih	Opredeljeni genotipi HPV z metodo encimske razgradnje pridelkov PCR v eksp. vzorcih
1	HPV-53	HPV-53
2	HPV-53, HPV-31	HPV-53, HPV-31
3	HPV-53, HPV-45, HPV-16	HPV-53, HPV-45, HPV-16
4	HPV-53, HPV-45, HPV-16, HPV-31	HPV-53, HPV-45, HPV-16, HPV-31

Preglednica 10 prikazuje opredelitev genotipov HPV z metodo kloniranja v posameznih eksperimentalnih vzorcih. Pri eksperimentalnih vzorcih z enim (HPV-53), dvema (HPV-53, HPV-31) in štirimi genotipi HPV (HPV-31, HPV-53, HPV-45, HPV-16) smo z metodo kloniranja uspešno dokazali prisotnost vseh vključenih genotipov HPV. Pri vzorcu z vključenimi 3 genotipi HPV (HPV-53, HPV-45, HPV-16), smo uspešno upredelili le 2 genotipa HPV (HPV-53, HPV-45).

Preglednica 10 : Vključeni in opredeljeni genotipi HPV z metodo kloniranja v eksperimentalnih vzorcih

Št. eksp. vzorca	Vključeni genotipi HPV v eksp. vzorcu	Opredeljeni genotipi HPV z metodo kloniranja v eksp. vzorcu
1	HPV-53	HPV-53
2	HPV-53, HPV-31	HPV-53, HPV-31
3	HPV-53, HPV-45, HPV-16	HPV-53, HPV-45
4	HPV-53, HPV-45, HPV-16, HPV-31	HPV-53, HPV-45, HPV-16, HPV-31

4.2 OPREDELITEV GENOTIPOV BETA-HPV V PRIDELKIH PCR KLINIČNIH VZORCEV PREDHODNO POMNOŽENIH Z METODO VGNEZDENE PCR Z ZA BETA-HPV GENOTIPE ZNAČILNIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI M^a/H^a

V nalogo smo vključili 4 klinične vzorce pridelkov PCR pri katerih je bila predhodno z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanjem nukleotidnega zaporedja opredeljena okužba s beta-HPV. Pri treh

vzorcih odvzetih bolnikoma s kožno-sluzničnimi spremembami oz. osebi brez kliničnih znakov okužbe s HPV, je bila opredeljena sočasna okužba z najmanj dvema tipoma beta-HPV. Ti vzorci so bili odvzeti, pri bolniku s kožnimi spremembami iz tkiva kožne bradavice, pri bolniku s sluzničnimi spremembami (genitalne bradavice) iz dlačnih mešičkov obrvi in pri osebi brez kliničnih znakov okužbe s HPV iz dlačnih mešičkov pubičnega predela. Pri enem vzorcu, odvzetemu bolniku s kožnimi spremembami (tkivo kožne bradavice), pa je bila dokazana okužba le z enim tipom beta-HPV (preglednica 11).

Preglednica 11 : Predhodno opredeljeni genotipi beta-HPV kliničnih vzorcev z metodo vgnezdne PCR z za EV-HPV značilne začetne oligonukleotidi M^a/H^a in metodo določanja nukleotidnega zaporedja

X^m – neopredeljena sočasna okužba z najmanj dvema genotipoma beta-HPV. X – neopredeljen genotip beta-HPV

Klinični vzorec	Klinični znaki okužbe s HPV	Vir oz. mesto odvzetega vzorca	Opredeljeni genotipi beta-HPV z M ^a /H ^a PCR
1	Genitalne bradavice	Dlačni mešički obrvi	X ^m
2	Brez kliničnih znakov	Dlačni mešički pubičnega predela	HPV-14D + X
3	Kožne bradavice	Tkivo bradavice (roka)	HPV-36
4	Kožne bradavice	Tkivo bradavice (roka)	HPV-X14b + X

Preglednica 12 prikazuje rezultate opredelitve genotipov beta-HPV pridelkov PCR kliničnih vzorcev z metodo kloniranja. Za opredelitev genotipov beta-HPV v posameznem kliničnem vzorcu smo odvzeli 10 belo obarvanih kolonij transformiranih kolonij celic JM109 zrastleh na LB amp/IPTG/X-gal ploščah in sledili postopkom opisanih v poglavju metode dela. Tako smo pridobili 10 nukleotidnih zaporedij pridelkov PCR, katerim smo določili genotipe beta-HPV.

Preglednica 12: Opredeljeni genotipi beta-HPV kliničnih vzorcev z metodo kloniranja

Klinični vzorec	Klinični znaki okužbe s HPV	Vir oziroma mesto odvzetega vzorca	Opredeljeni genotipi beta-HPV z metodo kloniranja
1	Genitalne bradavice	Dlačni mešički obrvi	HPV-22, HPV-38, RTRX7
2	Brez kliničnih znakov	Dlačni mešički pubičnega predela	HPV-14D, HPV-36, HPV-38
3	Kožne bradavice	Tkivo bradavice (roka)	HPV-36
4	Kožne bradavice	Tkivo bradavice (roka)	HPV-X14b, HPV-2a

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvod

Humani virusi papiloma (HPV) so zelo heterogena skupina virusov DNA, ki jih etiološko povezujemo s številnimi benignimi in malignimi novotvorbami ploščatoceličnega epitelija. Do sedaj je poznanih že več 100 genotipov HPV in jih glede na skladnost nukleotidnih zaporedij razvrščamo v pet rodov (alfa, beta, gama, mu in nu) (de Villiers in sod., 2004).

V rod virusov papiloma alfa uvrščamo sluznične, kožno-sluznične in nekatere kožne genotipe HPV, ki jih glede na zmožnost povzročanja benignih oziroma (pre)malignih sprememb ploščatoceličnega epitelija delimo na nizkorizične (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44) in visokorizične (HPV-16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 in 83) genotipe HPV (Muñoz in sod., 2003). Za bolnike z avtosomno recesivno dedno boleznijo, imenovano bradavičasta epidermodisplazija (angl. epidermodysplasia verruciformis), je značilna kronična okužba z virusi papiloma rodu beta in naknadnim razvojem nemalonomske oblike kožnega raka (Majewski in Jablonska, 2002). Beta genotipe HPV prav zaradi tesne povezave z bradavičasto epidermodisplazijo pogosto imenujemo genotipi EV-HPV (epidermodysplasia verruciformis-HPV). Po podatkih iz literature je s temi virusi okuženih v povprečju 40-70 % zdravih ljudi, vendar se značilne spremembe povrhnjice kože razvijejo le pri majhnem deležu okuženih, najveretneje kot posledica dolgotrajne imunske pomanjkljivosti in posledične aktivacije virusa (npr. po presaditvi ali pri osebah, okuženih z virusom HIV) (Berkhout in sod., 1995; Berkhout in sod., 2000; Bens in sod., 1998). Nekatere novejšje študije so potrdile prisotnost genotipov beta-HPV ne le v različnih kožnih lezijah, ampak tudi v lasnih foliklih različnih predelov telesa tako pri zdravih kot tudi pri imunsko oslabljenih osebah (Boxman in sod., 1997; Boxman in sod., 1999; Boxman in sod., 2000; Boxman in sod., 2001; Kocjan in sod., 2005).

Test Hybrid Capture druge generacije (HC II) (Digene laboratories) je trenutno edini test za diagnostiko okužbe s HPV, ki ima dovoljenje ameriške FDA za uporabo v humani medicinski mikrobiologiji. Metoda omogoča prepoznavo okužbe s 5 nizkorizičnimi

genotipi (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43, HPV-44) in 13 visokorizičnimi genotipi (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68). Pomankljivost testa HC II je občasno lažno pozitiven rezultat zaradi navzkrižne reaktivnosti visokorizičnega kompleta DNA lovk z nekaterimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test ter slabo ločljivost različnih genotipov HPV v kliničnih vzorcih s prisotnimi multiplimi genotipi HPV (Poljak in sod., 2002).

5.1.2 Analiza rezultatov

V prvem delu raziskave smo primerjali učinkovitost genotipizacijske metode RFLP in metode kloniranja pridelkov PCR s pomočjo klonirnega vektorja pGEM®-T Easy Vector (Promega). Za primerjavo metod smo izbrali klinične vzorce z znanimi genotipi alfa-HPV. Pripravili smo mešanico do štirih genotipov HPV, z enako medsebojno koncentracijo DNA, ter jih pomnožili s PGMY09/PGMY11^{MIX} oligonukleotidnimi začetniki, ki omogočajo pomnoževanje 450 bp dolg odsek najbolj ohranjenega dela genoma HPV, gena L1 (Gravitt in sod., 2000).

Pričakovali smo, da bomo v predhodno eksperimentalno pripravljenih vzorcih z metodo RFLP in metodo kloniranja pridelkov PCR dokazali enako stopnjo učinkovitosti odkrivanja sočasnih okužb z večimi genotipi alfa-HPV.

Z metodo RFLP smo uspešno opredelili prisotnost vseh genotipov HPV v eksperimentalnih vzorcih. Intenziteto UV svetlobe posameznega vzorca razgradnje značilnega za določen genotip HPV, lahko pripišemo verjetnosti učinkovitejšega pomnoževanja določenega genotipa HPV z izbranimi oligonukleotidnimi začetniki PGMY09/PGMY11^{MIX}. Izkazalo se je, da v eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi genotipi HPV-53, HPV-16 in HPV-45 ima vzorec razgradnje genotipa HPV-53 največjo intenziteto UV svetlobe, na podlagi česar lahko sklepamo o učinkovitejšem pomnoževanju dotičnega genotipa. Prav tako je v eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi štirimi genotipi (HPV-16, HPV-31, HPV-45, HPV-53) prišlo do večje intenzitete UV

svetlobe vzorca razgradnje genotipa HPV-31 in HPV-53 v primerjavi s preostalima prisotnima genotipoma HPV (HPV-16, HPV-45).

Kot posledico učinkovitejšega pomnoževanja določenih genotipov HPV, lahko pripišemo oteženi in neuspešni opredelitvi vseh prisotnih genotipov HPV v eksperimentalnih vzorcih z metodo kloniranja pridelkov PCR. V primeru eksperimentalnega vzorca s prisotnimi tremi genotipi HPV (HPV-16, HPV-45, HPV-53) smo določili genotip 27 kloniranim nukleotidnim zaporedjem, od katerih je bil v 93 % opredeljen genotip HPV-53 in v 7 % genotip HPV-45. Prevladujoča prisotnost genotipa HPV-53 in s tem otežena opredelitev preostalih dveh genotipov HPV sovpada z rezultati intenzitete UV svetlobe genotipa HPV-53 pri metodi RFLP. Prav tako smo potrdili domnevo učinkovitejšega pomnoževanja genotipa HPV-31 in HPV-53 na podlagi večje intenzitete UV svetlobe vzorcev razgradnje v eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi štirimi genotipi (HPV-16, HPV-31, HPV-45, HPV-53), saj smo izmed 20 kloniranim nukleotidnim zaporedjem v 65 % opredelili genotip HPV-31, v 30 % genotip HPV-53 in le v 2,5 % genotip HPV-45 in HPV-16 (preglednica 13).

Preglednica 13 : Skupno število pridobljenih nukleotidnih zaporedij za posamezen eksperimentalno pripravljen vzorec in število (delež) pridobljenih nukleotidnih zaporedij določenega genotipa HPV v posameznem eksperimentalnem vzorcu

Eksperimentalni vzorec	Prisotni genotipi HPV	Skupno število nukleotidnih zaporedij z opredeljenim genotipom HPV	Število (odstotek) nukleotidnih zaporedij posameznega genotipa HPV
1	HPV-53	1	1 (100%) HPV-53
2	HPV-31, HPV-53	2	1 (50 %) HPV-31, 1 (50 %) HPV-53
3	HPV-53 HPV-45, HPV-16	27	25 (93 %) HPV-53, 2 (7 %) HPV-45
4	HPV-31, HPV-53, HPV-45, HPV-16	20	13 (60 %) HPV-31, 6 (30 %) HPV-53, 1 (5 %) HPV-45, 1 (5 %) HPV-16

V drugem delu raziskave smo poskušali z metodo kloniranja opredeliti genotipe beta-HPV v treh izbranih kliničnih vzorcih, pri katerih je bila predhodno z metodo vgnedene PCR z za beta-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a (Boxman in sod., 1999) in določanjem nukleotidnega zaporedja opredeljena sočasna okužba z večimi genotipi beta-HPV. Vir odvzetega materiala izbranih kliničnih vzorcev je pri bolniku z navadnimi kožnimi bradavicami predstavljal tkivo bradavice, pri bolniku z genitalnimi bradavicami dlačni mešički obrvi in pri zdravi osebi dlačni mešički pubičnega predela. V ta del raziskave, smo poleg omenjenih treh kliničnih vzorcev s sočasno okužbo z večimi genotipi HPV hkrati, vključili še klinični vzorec (tkivo bradavice) bolnika z kožnimi bradavicami, pri katerem je bila predhodno dokazana okužba z genotipom HPV-36.

Med vsemi izbrani kliničnimi vzorci s predhodno opredeljenimi mešanimi okužbami z večimi genotipi beta-HPV, smo v vzorcu dlačnih mešičkov obrvi bolnika z genitalnimi bradavicami, pričakovali največji »repertoar« genotipov beta-HPV. Številne opravljene

študije opisujejo dlačne mešičke obrvi kot ugodno okolje za razvoj okužbe z genotipi beta-HPV, ki zaradi daljše in s tem posledično večje količine izpostavljenosti UV svetlobi, primore k zmanjševanju okolijske celične imunosti (Akgul in sod., 2005). Prav tako smo v vzorcu dlačnih mešičkov obrvi z večjo verjetnostjo pričakovali tiste genotipe beta-HPV, predvsem zaradi podobnih laboratorijskih pogojev izvedbe metode PCR in geografskega vira izbranih vzorcev (slovenski bolniki z genitalnimi bradavicami), kateri so bili opredeljeni v študiji (Poljak in sod., 2005) opravljeni na slovenskih bolnikih z genitalnimi bradavicami.

Z metodo kloniranja pridelkov PCR kliničnih vzorcev z opredeljenimi sočasnimi okužbami z večimi genotipi beta-HPV smo opredelili prisotne tri različne genotipe beta-HPV in sicer v vzorcu dlačnih mešičkov obrvi HPV-22, HPV-38 in RTRX-7 in v dlačnih mešičkih pubičnega predela HPV-14D (predhodno opredeljen z metodo vgnezdene PCR), HPV-36 in HPV-38. V vzorcu tkiva kožne bradavice smo dokazali genotipa HPVX-14b (predhodno opredeljen z metodo vgnezdene PCR) in HPV-2a. V vzorcu (tkivo kožne bradavice) s predhodno z metodo vgnezdene PCR opredeljenim genotipom HPV-36, smo z metodo kloniranja v vseh klonirnih nukleotidnih zaporedjih potrdili prisotnost omenjenega genotipa .

5.2 SKLEPI

- V prvem delu raziskave smo pripravili štiri eksperimentalne vzorce, ki so vsebovali mešanico do štirih genitalnih genotipov HPV, z enako medsebojno koncentracijo DNA, ter jih pomnožili s PGMY09/11^{MIX} oligonukleotidnimi začetniki. Z genotipizacijsko metodo RFLP smo uspešno dokazali prisotnost vseh genitalnih genotipov HPV v posameznih eksperimentalnih vzorcih, medtem ko se je metoda kloniranja izkazala za neuspešno pri eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi tremi genitalnimi genotipi HPV.
- Drugi del raziskave je zajel tri klinične vzorce, v katerih je bila predhodno z metodo vgnezdene PCR z za EV-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanjem nukleotidnega zaporedja opredeljena sočasna okužba z najmanj dvema genotipoma beta-HPV, ter klinični vzorec z opredeljenim genotipom HPV-36. Največji nabor genotipov EV-HPV smo z metodo kloniranja pridelkov PCR opredelili pri vzorcih dlačnih mešičkov obrvi in pubičnega predelela. Rezultati se skladajo s podatki objavljenih študij, ki potrjujejo največjo »gostoto« genotipov beta-HPV izoliranih prav iz teh področij.

6 POVZETEK

Rak materničnega vratu je predvsem v razvitih državah, za rakom dojk drugi najpogostejši rak pri ženskah. Poglavitni etiološki dejavnik za razvoj raka materničnega vratu predstavlja dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV rodu alfa in izražanja virusnih onkogenov E6 in E7 (Stoler, 2000; Walboomers in sod., 1999; Bosch in sod., 1995; Lazo, 1999; Nobbenhius in sod., 1999). Dokazovanje okužbe s HPV trenutno temelji izključno na uporabi molekularnih metod, med katerimi se najpogosteje uporabljata test tekočinske hibridizacije druge generacije (HC II) in verižna reakcija s polimerazo (PCR) z uporabo skupinsko-značilnimi začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo pomnoževanje širokega spektra genotipov v eni sami PCR reakciji. V primeru sočasne okužbe z večimi genotipi HPV hkrati, se za dokončno opredelitev genotipov alfa-HPV lahko poslužujemo metode encimske razgradnje pridelkov PCR (RFLP) (Bernard in sod., 1994) ali pa z metodo kloniranja pridelke PCR najprej vgradimo v plazmidne vektorje, jih namnožimo v ustreznih bakterijskih sistemih in šele nato iz osameljene plazmidne DNA določimo oligonukleotidna zaporedja kloniranih pridelkov PCR. Ker je metoda kloniranja časovno zamudna, draga in dokaj tehnično zahtevna, se danes uporablja le v raziskovalne namene (Poljak in sod., 2005).

Čeprav je že leta 1922 Lewandowsky s sodelovci postavil sum povezave med kožnimi bradavicami in razvojem malignih sprememb ploščatoceličnega epitelija kože pri bolnikih z bradavičasto epidermodisplazijo, je to področje zaradi otežene zaznave HPV DNA v odvzetih vzorcih malignih sprememb kože, ostalo še do nedavnega neraziskano (Harwood in sod., 1999). Z vpeljavo molekularnih metod, predvsem metode PCR, v diagnostiko okužb HPV, so različne študije objavile visok delež prevalence HPV DNA v nemalonomskih oblikah kožne raka tako pri imunsko oslABLjeni populaciji (bolniki z bradavačisto epidermodisplazijo, bolniki po presaditvi in pri osebah, okuženih s HIV) kot tudi pri zdravih ljudeh (Harwood in sod., 2000). Nedavno opravljene študije so pokazale prisotnost beta-HPV ne le v različnih kožnih lezijah, temveč tudi v dlačnih mešičkih različnih delov telesa tako pri zdravi kot pri imunsko oslABLjeni populaciji ljudi (Boxman in sod., 1997; Boxman in sod., 1999; Boxman in sod., 2000; Boxman in sod., 2001; Kocjan in sod., 2005).

Najpogosteje se za dokazovanje genotipov beta-HPV v vzorcih različnih kožnih sprememb uporablja metoda vgnezdene PCR z za beta-genotipe HPV značilnimi začetnimi oligonukleotidi (M^a/H^a), ki omogoča pomnoževanje široke beta skupine genotipov HPV. Zaradi večjega odstotka vzorcev (30 % v primerjavi 10-20% pri anogenitalnih vzorcih) s sočasno okužbo z večimi genotipi beta-HPV je nadaljna, dokončna opredelitev genotipa z metodo določanja nukleotidnega zaporedja mnogokrat otežena. V literaturi sta opisani dve molekularni metodi opredelitve genotipov HPV mešane okužbe, in sicer predhodno omenjena metoda kloniranja pridelkov PCR (Boxman in sod., 1997) ter različice metode vgnezdene PCR pri čemer v prvem koraku pomnožujemo s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi, ki se nalegajo na ohranjeno mesto vseh opredeljenih genotipov beta-HPV, v drugem koraku pa dodamo tako imenovane notranje, za različne podskupine genotipov beta-HPV značilne začetne oligonukleotide (Harwood in sod., 1999).

V prvem delu diplomske naloge smo primerjali učinkovitost genotipizacijske metode RFLP in metode kloniranja pridelkov PCR pri odkrivanju sočasnih okužb z večimi genotipi alfa-HPV. Za primerjavo metod smo izbrali štiri klinične vzorce z znanimi genotipi alfa-HPV. Pripravili smo eksperimentalne vzorce z mešanico do štirih genotipov HPV, z enako medsebojno koncentracijo DNA, ter jih pomnožili s PGMY09/11^{MIX} oligonukleotidnimi začetniki.

Z genotipizacijsko metodo RFLP smo tako uspešno opredelili genotipe HPV prisotne v vseh eksperimentalnih vzorcih, medtem ko z metodo kloniranja nismo uspeli opredeliti prisotnega genotipa HPV-16 v eksperimentalnem vzorcu z mešanico treh genotipov HPV. Razlog za neuspešno, oteženo opredelitvijo genotipa HPV-16 v eksperimentalnem vzorcu s prisotnimi tremi genotipi alfa-HPV, lahko pripišemo učinkovitejšemu pomnoževanju drugih dveh prisotnih genotipov, predvsem genotipa HPV-53.

V drugem delu raziskave smo z optimizirano metodo kloniranja poskušali določiti genotipe HPV v treh kliničnih vzorcih, v katerih je bila predhodno z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV genotipe značilnimi začetnimi oligonukleotidi M^a/H^a in določevanjem nukleotidnega zaporedja opredeljena sočasna okužba z dvema ali več genotipi beta-HPV

hkrati. V raziskavo smo vključili še dodatni klinični vzorec, prav tako z enakim, predhodno opisanim postopkom, opredeljenim genotipom HPV-36.

Z optimizirano metodo kloniranja pridelkov PCR smo v kliničnih vzorcih z domnevno sočasnimi okužbami z večimi genotipi beta-HPV, uspešno dokazali prisotnost dveh ali več genotipov beta-HPV v posameznem vzorcu. V vzorcu dlačnih mešičkov obrvi in pubičnega predela smo opredelili prisotnost treh genotipov beta-HPV, kar se sklada z različnimi objavljenimi študijami, ki potrjujejo visok delež genotipov beta-HPV izoliranih iz omenjenih predelov telesa (dlačnih mešički obrvi in pubičnega predela). V kliničnem vzorcu (tkivo kožne bradavice) smo poleg z metodo vgnezdene PCR opredeljenega genotipa HPV-X14b, z metodo kloniranja opredelili še dodatni genotip HPV-2a. Z metodo kloniranja smo v kliničnem vzorcu potrdili okužbo le z enim genotipom beta-HPV (HPV-36) in s tem potrdili skladnost z metodo vgnezdene PCR z za beta-HPV značilnimi oligonukleotidnimi začetniki M^a/H^a.

7 VIRI

- Adams V., Kempf W., Hessam S., Briner J., Schmid M., Moos R., Pfaltz M. 1995. Detection of several types of human papilloma viruses in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Journal of Medical Virology*, 46: 189-93
- Akgul B., Lemme W., Garcia-Escudero R., Storey A., Pfister H.J. 2005. UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 in 8 in primary keratinocytes. *Archives of Virology*, 150: 145-151
- Ammatuna P., Giovanelli L., Lama A., Capra G., Giordano V., Arico P. 2004. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: Analysis of the New PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 8: 3861-4
- Autillo-Touati A., Joannes M., d'Ercole C., Robaglia-Schlupp A., Lambert A., Mazzarella E., Blanc B., Seite R. 1998. HPV typing by in situ hybridization on cervical cytologic smears with ASCUS. *Acta Cytologica*, 42, 3: 631-638
- Baay M.F.D., Quint W.G.V., Koudstaal J., Hollema H., Duk J.M., Burger M.M., Stolz E., Herbrink P. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 3: 745-747
- Bauer H.M., Ting Y., Greer C.E., Chambers J.C., Tashiro C.J., Chimera J., Reingold A., Manos M. 1991. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by PCR-based method. *JAMA*, 265: 472-477
- Bens G., Wieland U., Hofmann A, Hopfl R, Pfister H. 1998. Detection of new human papillomavirus sequence in skin lesions of a renal transplant recipient and characterization of one complete genome related to epidermodysplasia verruciformis-associated types. *Journal of General Virology*, 79: 779-787

Berkhout R.J., Tieben L.M., Smits H.L., Bavinck B.J., Vermeer B.J., Schegget J. 1995. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancer from renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 690-695

Berkhout R.J., Bouwe Bavinck J.N., Schegget J. 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2087-2096

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

Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah K.V. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 11: 796-802

Bosch F.X., Manos M.M., Munoz N, Meier C.J.L.M., Shah K.V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinial Pathology*, 55: 244-65

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: 712-715

- Boxman I.L., Hogewoning A., Mulder L.H., Bouwes Bavinck J.N., ter Schegget J. 1999a. Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic in perianal hair from patients with genital warts. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2270-2273
- Boxman I.L., Mulder L.H., Russel A., Bouwes Bavinck J.N., Green A., ter Schegget J. 1999b. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *British Journal of Dermatology*, 141: 246-249
- Boxman I.L., Russell A., Mulder L.H., Bavinck J.N., ter Schegget J., Green A. 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. *International Journal of Cancer*, 86: 118-121
- Boxman I.L., Russell A., Mulder L.H., Bavinck J.N., ter Schegget J., Green A. 2001. Association between epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hair and solar keratoses. *Journal of Investigative Dermatology*, 117: 1108-1112
- Brandsma J.L., Burk R.D., Lancaster W.D., Pfister H., Schiffman M.H. 1989. Interlaboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *International Journal of Cancer*, 43, 2: 260-262
- Chang F. 1990. Role of papillomaviruses. *Journal of Clinical Pathology*, 43: 269-76
- Contorini M., Leoncini P. 1993. Typing of human papillomavirus DNAs by restriction endonuclease mapping of the PCR products. *Journal of Virological Methods*, 41: 29-36
- Coutlée F, Gravitt P, Richardson H, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Yoyer H. 1999. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1852-1857

- Crum C.P. 1994. Genital papillomaviruses and related neoplasms: causation, diagnosis and classification (Bethesda). *Modern Pathology*, 7, 1: 138-145
- de Roda Husman A.M., Walboomers J.M.M., van den Brule A.J.C., Meijer C.J.L.M., Snijders P.J.F. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76: 1057-1062
- de Villiers E.M. 1994. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 186: 1-12
- de Villiers E.M. 2001. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 12: 57-64
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Husen H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541
- Evander M., Wadell G. 1991. A general primer pair for amplification and detection of genital papillomavirus types. *Journal of Virological Methods*, 31: 239-250
- Feoli-Fonesca J.C., Oligny L.L., Yotov W.V. 1999. New method for automatic detection and typing of single and multiple superimposed human papillomavirus sequences. *Diagnostic Molecular Pathology*, 8: 216-221
- Forslund O., Antonsson A., Nordin P., Stenquist B., Hansson B.G. 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumors and normal skin. *Journal of General Virology*, 80: 2437-2443

- Forslund O., Ly H., Higgins G. 2003. Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested 'hanging droplet' PCR. *Journal of Virological Methods*, 110: 129-136
- Fujinaga Y., Shimada M., Okizawa K., Fukushima M., Kato I., Fujinaga K. 1991. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 72: 1039-1044
- Gravitt P.E., Peyton C.L., Alessi T.Q., Wheeler C.M., Coutlee F., Hildesheim A. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 357-61
- Gregoire L., Arella M., Campiona-Piccardo J., Lancaster W.D. 1989. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 2660-2665
- Harwood C.A., McGregor J.M., Proby C.M., Breuer J. 1999. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 249-253
- Harwood C.A., Spink P.J., Suretheran T., Leigh I.M., de Villiers E.M., McGregor J.M., Proby C.M., Breuer J. 1999. Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *Journal of Clinical Microbiology*, 37,11: 3545-3555
- Harwood C.A., Suretheran T., McGregor J.M., Spink P.J., Leigh I.M., Breuer J., Proby C.M. 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Journal of Medical Virology*, 61: 289-297
- Jacobs M.V., Snijders P.J., van den Brule A.J., Helmerhost T.J., Meijer C.J., Walboomers J.M. 1997. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method

for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 791-795

Kitchin P.A., Bootman J.S. 1993. Quality control of the polymerase chain reaction. *Medical Virology*, 3: 107-114

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

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

Ko C.B., Walton S, Keczkes K, Bury H.P.R., Nicholson C. 1994. The emerging epidemic of skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 130: 269-72

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 wart. *Infection, Genetics and Evolution*, 5: 255-259

Koren S. 1998. Virusna onkogeneza V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 65-89

Lazo P.A. 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *British Journal of Cancer*, 80: 2008-2018

Lungu O., Sun X.W., Wright T.C. Jr., Ferenczy A., Richart R.M., Silverstein S. 1995. A polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting

human papillomavirus in cervical carcinomas and high-grade cervical cancer precursors. *Obstetrics and Gynecology*, 85: 337-342

Majewski S., Jablonska S. 2002. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus contribute to malignant and benign epidermal proliferation? *Archives of Dermatology*, 138: 649-654

Maki H., Saito S., Ibaraki T., Ochijo M., Yoshie O. 1991. Use of universal and type-specific primers in the polymerase chain reaction for the detection and typing of genital human papillomaviruses. *Japanese Journal of Cancer Research*, 82: 411-419

Manos M.M., Ting Y., Wright D.K. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 7: 209-214

Manos M.M., Gravitt P.E. 1993. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Laboratory Animal Science*, 43, 1: 5-10

Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J., 2004. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infection. *Journal of Clinical Virology*, 32: 43-51

Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., Herrero R., Castillasagué X., Shah V.K., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348: 518-27

Nobbenhuis M.A.E., Walboomers J.M.M., Helmerhorst T.J.M., Rozendaal L., Remmink A.J., Risse E.K., van den Linden H.C., Voorhorst F.J., Kenemans P., Meijer C.J. 1999. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*, 354: 20-25

- Nuovo G.J., Richart R.M. 1989. A comparison of slot blot, southern blot and in situ hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions. *Obstetrics and Gynecology*, 74, 4: 673-678
- Orth G. 1986. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Foundation Symposium*, 120: 157-174
- Pfister H, Fuchs P.G. 1994. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*, 37: 143-149
- Poljak M., Ferluga D., Gale N., Petrovec M. 1993. Molekularna diagnostika okužbe s humanim virusom papiloma (HPV) v patologiji. *Zdravniški vestnik*, 62: 105-109
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo-nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400
- Poljak M., Seme K. 1996. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 56: 231-8
- Poljak M., Seme K., Koren S. 1996. The polymerase chain reaction: a critical review of its uses and limitations in diagnostic microbiology. *Periodicum Biologorum*, 98, 2: 183-190
- Poljak M., Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J. 1998. Neposredno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, *Medicinski razgledi*: 129-142
- Poljak M., Seme K., Gale N. 1998. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 5: 216-234
- Poljak M, Brenčič A, Seme K, Vince A, Marin IJ. 1999. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human

papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*; 37: 796-7

Poljak M, Marin I.J., Seme K, Vince A. 2002. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high risk cocktail. *Journal of Clinical Virology*; 25: S89-S97

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

Proby C, Storey A, McGregor J, Leight I. 1996. Does human papillomavirus infection play a role in non-melanoma skin cancer? *Papillomavirus Report*, 7: 53-60

Rady P.L., Chin R., Arany I., Hughes T.K., Tyring S.K. 1993. Direct sequencing of consensus primer generated PCR fragments of human papillomaviruses. *Journal of Virological Methods*, 43: 335-350

Rady P.L., Arany I., Hughes T.K., Tyring S.K. 1995. Type-specific primer mediated direct sequencing of consensus primer-generated PCR amplicons of human papillomaviruses: a new approach for simultaneous detection of multiple viral type. *Journal of Virological Methods*, 53: 245-254

Reid R., Lorincz A.T. 1995. Human papillomavirus test. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 9: 65-103

Resnick R.M., Cornellisen M.T.E., Wright D.K., Eichinger G.H., Fox H.S., ter Schegget J., Manos M.M. 1990. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *Journal of the National Cancer Institut*, 82: 1477-1484

- Rodu B., Christian C., Synder R.C., Ray R., Miller D.M. 1991. Simplified PCR-based detection and typing strategy for human papillomaviruses utilizing a single oligonucleotide primer set. *Biotechniques*, 10: 632-637
- Schneider A. 1994. Natural History of Genital Papillomavirus Infections. *Intervirology*, 37: 201-214
- Snijders P.J., van den Brule A.J., Schrijnemakers H.F., Snow G., Meijer C.J., Walboomers J.M. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology*, 71: 173-181
- Snijders P.J., Meijer C.J., Walboomers J.M. 1991. Degenerate primers based on highly conserved regions of amino acid sequence in papillomaviruses can be used in generalized polymerase chain reaction to detect productive papillomavirus infection. *Journal of General Virology*, 72: 2781-2786
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517
- Stoler M.H. 2000. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology*, 19, 1: 16-28
- Stöppler H., Stöppler M.C., Schlegel R. 1994. Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirology*, 37: 168-179
- Summersgill F.K., Smith E.M., Kirchner L.H., Haugen T.H., Turek L.P. 2000. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surgery*, 90: 335-339
- Surentheran T., Harwood C.A., Spink P.J., Sinclair A.L., Leigh I.M., Proby C.M., McGregor J.M., Breuer J. 1998. Detection and typing of human papillomavirus in

mucosal and cutaneous biopsy from immunosuppressed and immunocompetent patients and patients with epidermodysplasia verruciformis: a unified diagnostic approach.

Journal of Clinical Pathology, 51: 606-610

Syrjänen K., Syrjänen S. 2000. Infections in human pathology. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 615 str.

Tieben L.M., ter Schegget J., Minnaar R.P., Bouwes Bavinck J.N., Berkhout R.J.M., 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: 265-280

Trofatter K.F. 1997. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. American Journal of Medicine, 102, 5A: 21-27

Uršič-Vrščaj M., Poljak M. 1995. Voznik ali sopotnik? Pomen okužbe s humanimi virusi papiloma v etiologiji nekaterih novotvorb pri človeku. Zdravniški vestnik, 64: 223-228

van den Brule A.J.C., Snijders P.J.F., Gordijian R.L.J., Bleker O.P., Meijer C.J.L.M., Walboomers J.M.M. 1990. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. International Journal of Cancer, 45: 644-649

van Ranst M.A., Tachezy R., Delius H., Burk R.D. 1993. Taxonomy of the human papillomaviruses. Papillomavirus Research, 4: 61-65

Vousden K. 1993. Interaction of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. FASEB Journal, 7: 872-879

- Walboomers J.M.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189: 12-19
- Wallin K.L., Wiklund F., Ångström T., Bergman F., Stendahl U., Wadell G., Hallmans G., Dillner J. 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 341, 22: 1633-1368
- Williamson A.L., Rybicki E.P. 1991. detection of genital human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with degenerate nested primers. *Journal of Medical Virology*, 33: 165-171
- Williamson A.L., Kay P., Meehan K. 2002. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *Journal of Virological Methods*, 150: 159-170
- Yoshikawa H., Kawana T., Kitagawa K., Mizuno M., Yoshikura H., Iwamoto A. 1990. Amplification and typing of multiple cervical cancer-associated human papillomavirus DNA using a single pair of primers. *International Journal of Cancer*, 45: 990-992
- zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors.I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cencer*, 13: 650-656
- zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infection-a major cause of human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288: F55-F78

8 ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med. se zahvaljujem za pomoč in strokovno vodenje pri izvedbi diplomske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi prof. dr. Katji Seme, dr. med. za kritične pripombe in nasvete.

Boštjan Kocjan, hvala Ti za vso pomoč in vzpodbudne besede v dnevih, ko nič ni bilo tako kot bi moralo biti.

Predvsem pa se zahvaljujem očetu in mami za podporo v času študija.

