

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Saša HABERL

**MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC
GENA E7 SLOVENSКИH IZOLATOV HUMANEGA
PAPILOMA VIRUSA GENOTIPA 31**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Saša HABERL

**MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA
E7 SLOVENSКИH IZOLATOV HUMANEGA PAPILOMA VIRUSA
GENOTIPA 31**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENOMIC DIVERSITY OF E7 GENE OF SLOVENIAN ISOLATES
OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPE 31**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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.

Saša Haberl

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 578.5/.7+577.2.083 (043) = 863
- KG virusi/humani virusi papiloma/HPV/ploščatocelični rak materničnega vratu/
HPV-31/polimorfizem/podtipske različice HPV/gen E7/sekveniranje/filogenetsko
drevo
- AV HABERL, Saša
- SA POLJAK, Mario (mentor)/SEME, Katja (recezentka)
- KZ SI – 1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2006
- IN MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA E7
SLOVENSКИH IZOLATOV HUMANEGA PAPILOMA VIRUSA GENOTIPA 31
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 60 str., 6 pregl., 5 sl., 104 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Številne raziskave v zadnjih dvajsetih letih so pokazale, da je okužba z visokorizičnimi genotipi humanih virusov papiloma (HPV) glavni etiološki dejavnik za nastanek ploščatoceličnega raka materničnega vratu (RMV). Na osnovi raziskovanja genoma genotipa HPV-16 so ugotovili, da je za nastanek cervikalne intraepitelijske neoplazije pomembna dolgotrajna okužba s specifično gensko različico visokorizičnega genotipa HPV. Genske različice HPV-16 so na podlagi filogenetskih analiz razdelili na evropske in ne-evropske. Okužba z ne-evropsko različico HPV-16 naj bi predstavljala povečano tveganje za nastanek RMV. Za boljše razumevanje molekularne epidemiologije HPV okužbe in molekularni pomen napredovanja intraepitelijskih neoplazij v RMV so potrebne nadaljne raziskave polimorfizma ostalih genotipov HPV poleg HPV-16. Tako so ugotovili, da genotip HPV-31, tesen sorodnik genotipa HPV-16 prav tako sestoji iz podtipskih različic. V naši diplomski nalogi smo želeli opredeliti podtipske različice gena E7 17 slovenskih izolatov HPV-31, osamljenih pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij (CIN I - CIN III) in RMV, in jih na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij uvrstiti v obstoječe filogenetske skupine. Kot novo različico gena E7 genotipa HPV-31 smo opredelili vsak izolat HPV-31, ki se je od referenčnega izolata HPV-31 (J04353) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v celotnem E7 ORF. Med 17 izolati HPV-31 slovenskih žensk smo našli le dve različici gena E7. Obstoj novih, še ne opisanih podtipskih različic genotipa HPV-31 med slovenskimi izolati nismo uspeli dokazati. Prav tako ne moremo povezati posamezne različice s povečanim tveganjem za nastanek RMV, kot je bilo v predhodnih raziskavah že potrjeno. Pri slovenskih izolatih najpogosteje najdene različice 31-E7-2, ki naj bi bila uvrščena k afriškim različicam, zaradi geografske lege najverjetneje ne moremo uvrstiti k različicam afriškega izvora. Z nadaljnimi raziskavami, ki bi zajele večje število izolatov HPV-31 bi to domnevo lahko potrdili.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.5/.7+577.2.083 (043) = 863
- CX viruses/human papillomaviruses/HPV/cervical cancer/HPV-31/polymorphism/
intratypic variants/gene E7/sequencing/phylogenetic tree
- AU HABERL, Saša
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)
- PP SI – 1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2006
- TI GENOMIC DIVERSITY OF E7 GENE OF SLOVENIAN ISOLATES OF
HUMAN PAPILOMAVIRUS GENOTYPE 31
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 60 p., 6 tab., 5 fig., 104 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the past two decades there has been a steady accumulation of data supporting hypothesis that infection with high-risk genotypes of human papillomavirus (HPV) plays the important role in the development of cervical cancer. A few previous studies that have investigated the genomic diversity of HPV-16 have reported that persistent infection with specific genomic variant of high-risk genotype HPV plays important role in the development of cervical cancer. Phylogenetic analysis of HPV-16 genomic variants revealed that they were classified into two broad categories: european and non-european variant. Infection with non-european HPV-16 variant presents greater risk in the development of cervical cancer. Differences in the polymorphism between types stress the importance of investigating other genotypes than HPV-16 to better understand molecular epidemiology of HPV infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia into cervical cancer. Previous reports revealed that HPV-13, closer relative of HPV-16 is also polymorphic. The purpose of our study was to define genomic variants of E7 gene of HPV-31 isolates among Slovenian women with different grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN I-CIN III) and cervical cancer. Nucleotides of E7 DNA that differed from the E7 HPV-31 prototype (J04353) were recorded as genomic variations. Among 17 primary HPV-31 slovenian isolates a total of 2 E7 genomic variants were identified, and both of them were previously reported. We also cannot associate specific E7 genomic variant to play important role in the development of cervical cancer, as was previously reported. There has also been reported that women from african descent are more frequently infected with 31-E7-2 HPV-31 genomic variant. Because of the geographical position of Slovenia, we assume that most frequently found 31-E7-2 slovenian variant is probably not of African descent. However, this assumption needs to be clarified in further studies which should include higher number of E7 HPV-31 isolates.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV)	3
2.1.1 Zgradba HPV	3
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	7
2.1.4 Razmnoževanje virusa HPV in njegovi onkogeni učinki.....	8
2.2 RAK MATERNIČNEGA VRATU	10
2.2.1 Epidemiologija raka materničnega vratu	10
2.2.2 Predrakave spremembe ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu ...	11
2.2.2.1 Razvrščanje predrakavih sprememb materničnega vratu	11
2.2.2.2 Odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu.....	12
2.3 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV	13
2.3.1 Tradicionalne diagnostične metode	13
2.3.2 Molekularne diagnostične metode	13
2.3.2.1 Hibridizacijske metode	14
2.3.2.1.1 Hibridizacija po Southernu.....	14
2.3.2.1.2 Hibridizacija dot-blot.....	15
2.3.2.1.3 Hibridizacija <i>in situ</i> na filtru.....	15
2.3.2.1.4 Hibridizacija <i>in situ</i>	15
2.3.2.1.5 Tekočinska hibridizacija.....	16
2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo	17

2.4. MOLEKULARNA OPREDELITEV IN POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-16 IN HPV-31.....	21
2.4.1 Odkritje in razvrščanje HPV-31	21
2.4.2 Podtipe različe HPV-16 in njihov pomen	22
2.4.3 Podtipe različe HPV-31 in njihov pomen	22
2.5 NAMEN DELA.....	24
3 MATERIAL IN METODE.....	25
3.1 MATERIAL	25
3.2 METODE	25
3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje gena E7 DNA HPV-31 ...	25
3.2.1.1 Sestava reakcijske mešanice za reakcijo PCR.....	26
3.2.1.2 Pogoji pomnoževanja s PCR	26
3.2.2 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR.....	27
3.2.3 Avtomatsko sekveniranje in določanje podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31	28
3.2.3.1 Čiščenje pridelkov PCR in določanje koncentracije	28
3.2.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	29
3.2.3.3 Analiza nukleotidnih zaporedij in določanje podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31	30
3.2.4 Filogenetska analiza podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31.....	30
4 REZULTATI.....	32
4.1 RAZPOREDITEV IZOLATOV HPV-31 GLEDE NA RAZLIČNE STOPNJE INTRAEPITELIJSKIH NEOPLAZIJ IN RAKA MATERNIČNEGA VRATU	32
4.2. DOLOČANJE PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31	33
4.3 RAZPOREDITEV RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31 GLEDE NA RAZLIČNE STOPNJE INTRAEPITELIJSKIH NEOPLAZIJ IN RAKA MATERNIČNEGA VRATU	34
4.4 FILOGENETSKA ANALIZA PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31.....	35

5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	40
5.1 RAZPRAVA.....	40
5.1.1 Uvod.....	40
5.1.2 Analiza rezultatov.....	40
5.2 SKLEPI.....	43
6 POVZETEK.....	44
7 VIRI.....	46
8 ZAHVALA.....	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem (Poljak in sod., 2005: 62).....	6
Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za področje gena E7 genotipa HPV-31 in velikosti pričakovanih pridelkov PCR.....	25
Preglednica 3: Razvrstitev 17 izolatov HPV-31 glede na opredelitev sprememb ploščatoceličnega epitelija po klasifikaciji po Papanicolaou in po klasifikaciji po CIN osamljenih pri slovenskih ženskah.....	33
Preglednica 4: Različice gena E7 17 slovenskih izolatov HPV-31 s spremembami v aminokislinskem zaporedju v primerjavi z referenčnim izolatom: akkratica označuje aminokislino. Mesto, kjer ni prisotna mutacija v primerjavi z referenčnim izolatom je osenčeno, medtem ko črka predstavlja mutirano bazo. Frekvenca označuje število izolatov za posamezno različico.....	34
Preglednica 5: Različice gena E7 genotipa HPV-31 pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij in rakom materničnega vratu.....	35
Preglednica 6: Filogenetska razvrstitev različic gena E7 17 slovenskih in 41 kanadskih izolatov HPV-31.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija genoma HPV16 (Poljak in sod., 2005: 60).....	4
Slika 2: Filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodnost virusov papiloma (Doorbar, 2006: 526).....	8
Slika 3: Z UPGMA metodo izrisano filogenetsko drevo 17 slovenskih različic gena E7 genotipa HPV-31 (31-E7-1-S1 in 31-E7-2-S1-1 do 31-E7-2-S1-16) in 41 kanadskih različic gena E7 genotipa HPV-31 (31-E7ref-1 do 31-E7ref-9; 31-E7-1-1 do 31-E7-1-9; 31-E7-2-1 do 31-E7-2-18; 31-E7-3 do 31-E7-7).....	36
Slika 4: Z metodo najbližjega soseda izrisan filogram 8 različic gena E7 genotipa HPV-31 slovenskih (31-E7-1-S1 in 31-E7-2-S1) in kanadskih žensk (31-E7ref, 31-E7-3, 31-E7-4, 31-E7-5, 31-E7-6 in 31-E7-7).....	37
Slika 5: Z metodo najbližjega soseda izrisano zvezdasto filogenetsko drevo 8 različic gena E7 genotipa HPV-31 slovenskih (31-E7-1-S1 in 31-E7-2-S1) in kanadskih žensk (31-E7ref, 31-E7-3, 31-E7-4, 31-E7-5, 31-E7-6 in 31-E7-7).....	38

SEZNAM OKRAJŠAV

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
ISH	<i>in situ</i> hibridizacija
LCR	dolga regija kontrole
NJ	metoda najbližjega soseda
ORF	odprti bralni okvir
PAP	test Papanicolao
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFLP	metoda določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov
RLU	relativne svetlobne enote
RMV	rak materničnega vratu
RNA	ribonukleinska kislina
TSR	Template Supresion Reagent
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine
URR	zgornja regija kontrole
UV	ultravioletska svetloba

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). HPV taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ter rod *Papillomavirus* (zur Hausen, 1996; de Villiers in sod., 2004).

Številne raziskave v zadnjih dvajsetih letih so nedvomno pokazale, da so HPV glavni etiološki dejavnik za razvoj raka materničnega vratu (RMV) (Stoler, 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). Do sedaj je odkritih že 96 genotipov HPV, od katerih sta najbolj raziskana genotipa 16 in 18, ki sta povezana z nastankom malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela spolovil ter rodil in ju tako uvrščamo v skupino visokorizičnih genotipov HPV (de Villiers in sod., 2004).

Leta 1986 je Lorincz s sodelavci odkril nov genotip HPV in ga na podlagi predhodnih kriterijev (Coggin in zur Hausen, 1979) opredelil kot nov genotip HPV-31 (Lorincz in sod., 1986). Z nadaljnimi študijami je bila ugotovljena tesna sorodnost s HPV-16.

Tako med poglavitne povzročitelje RMV, poleg HPV-16, uvrščamo tudi visokorizični genotip HPV-31, ki ga po pogostosti pri ženskah z RMV v svetovnem merilu uvrščamo na četrto mesto za genotipi HPV-16, HPV-18 in HPV-45 (Tornesello in sod., 2004).

Na osnovi raziskovanja genoma genotipa HPV-16 so ugotovili, da je za nastanek cervikalne intraepitelijske neoplazije pomembna dolgotrajna okužba s specifično gensko različico visokorizičnega genotipa HPV. Z določanjem in primerjavo nukleotidnih zaporedij genov L1, L2, E6, E7 in področja LCR genotipa HPV-16 so ugotovili, da sestoji iz različic, ki so jih na podlagi filogenetskih analiz razvrstili v evropske in ne-evropske različice.

V svojem poročilu so objavili, da okužba s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz ne-evropskih vej predstavlja povečano tveganje za nastanek RMV (Tornesello in sod., 2004).

V nedavnih raziskavah so ugotovili, da genotip HPV-31 prav tako sestoji iz podtipskih različic oziroma, da se posamezni izolati genotipa HPV-31 razlikujejo v nukleotidnem zaporedju področja LCR in virusnih onkogenov E6 in E7. Na podlagi filogenetskih analiz so različice genotipa HPV-31 razvrstili v prototipske in ne-prototipske. Kljub tesni sorodnosti genotipov HPV-31 in HPV-16 niso uspeli dokazati povezavo določenih, specifičnih E6 (E7, LCR) različic genotipa HPV-31 s povečanim tveganjem za razvoj RMV. Ugotovljena pa je bila pogostejša okužba z ne-prototipsko različico HPV-31 pri ženskah Afriškega izvora.

Ker je po dosegljivih podatkih iz literature objavljena le ena raziskava, kjer so bile molekularno opredeljene podtipske različice gena E7 genotipa HPV-31, smo v naši raziskavi želeli opredeliti podtipske različice gena E7 slovenskih izolatov HPV-31, in jih na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij uvrstiti v obstoječe filogenetske skupine.

Pričakovali smo, da bomo večino različic gena E7 slovenskih izolatov HPV-31 uvrstili med že predhodno opisane podtipske skupine tega genotipa in tudi ugotovili obstoj novih različic. Poleg tega smo pričakovali, da ugotovljenih različic gena E7 genotipa HPV-31 ne bomo mogli povezati s povečanim tveganjem za nastanek RMV, kot je bilo v predhodnih raziskavah tudi ugotovljeno.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA (HPV)

2.1.1 Zgradba HPV

Humani virusi papiloma (HPV) so zelo heterogena skupina virusov (zur Hausen, 1996). Taksonomsko jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ter rod *Papillomavirus* (zur Hausen, 1996; de Villiers in sod., 2004). Ime te skupine virusov izhaja iz latinske besede *papilla* (slov. bradavica) in grške besede *oma* (slov. tumor) (van Ranst in sod., 1993).

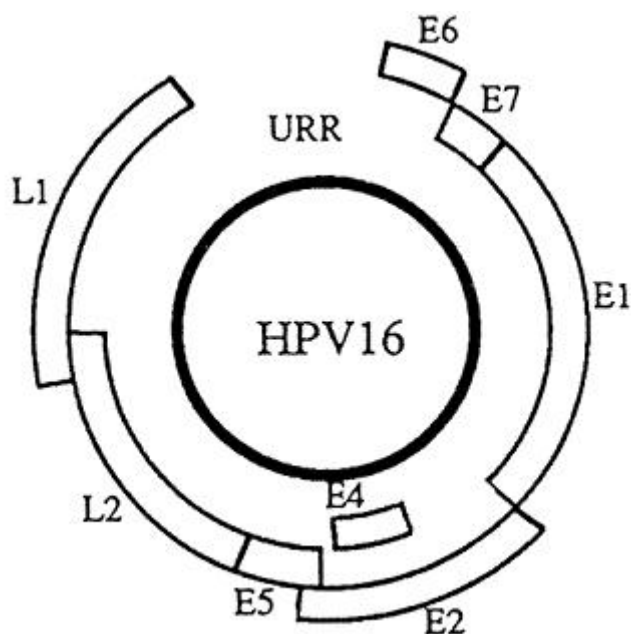
HPV so goli DNA virusi, ki v premeru merijo približno 55 nm. Virusni genom je obdan z dvoslojnim proteinskim plaščem, imenovanim kapsida. Elektronskomikroskopske študije so pokazale, da je kapsida sestavljena iz 72 morfoloških enot, kapsomer, med katerimi je 12 pentonov, ostali pa so heksoni.

Morfološke enote kapside predstavljajo dva tipa strukturnih beljakovin, t.i. malo in veliko plaščno beljakovino. Velika plaščna beljakovina (L1) ima povprečno molekulsko maso 55 kDa in predstavlja približno 80-90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Ostali del beljakovin plašča predstavlja mala plaščna beljakovina (L2) s povprečno molekulsko maso 76 kDa (Pfister in Fuchs, 1994).

2.1.2 Struktura in organizacija genoma HPV

Virusni genom je dvojnovijska, krožna, kovalentno zaprta DNA velikosti 7200-8000 baznih parov (bp) in molekulske mase $5,2 \times 10^6$ Da (zur Hausen, 1996).

Organizacijo genoma HPV 16 prikazuje slika 1.



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

Virusni genom sestavljajo kodirajoča in nekodirajoča področja. Kodirajoča področja delimo na področje L (angl. *late*, pozno) in področje E (angl. *early*, zgodnje) (zur Hausen, 1996).

Področje L nosi zapis za strukturne beljakovine virusnega plašča (L1, L2). Gen L1 vsebuje zapis za veliko plaščno beljakovino in je med najbolj ohranjenimi deli genoma med različnimi genotipi HPV. Medtem ko gen L2 nosi zapis za malo plaščno beljakovino virusnega plašča, ki je pri posameznih genotipih HPV različna (Pfister in Fuchs, 1994).

Področje E vsebuje zapis za beljakovine, ki so pomembne pri podvojevanju virusa, uravnavanjem prepisovanja virusnega genoma in transformacijo okuženih celic. Večina HPV ima najmanj 6 različnih genov E: E1, E2, E4, E5, E6 in E7 (Bosch in sod., 2001).

Med vsemi področji genoma sta najbolj raziskana gena E6 in E7. Večina raziskovalcev je mnenja, da sta omenjeni beljakovini najpomembnejši v onkogenezi novotvorb, ki nastanejo zaradi okužbe s HPV (Stoppler in sod., 1994; Vousden, 1993). Dokaz za to so pogosto najdeni prepisi genov E6 in E7 v različnih tumorjih in celičnih linijah (Summersgill in sod., 2000; Vousden, 1993). Virusna beljakovina E1 ima povprečno molekularno maso 68-76 kDa in predstavlja največji HPV protein (Chiang in sod., 1992; Kuo in sod., 1994). Pomembno vlogo ima pri virusnem razmnoževanju in vzdrževanju HPV v obliki

zunajkromosomskih delcev DNA, t.i. episomov. E1 se skupaj z E2 veže na *ori* (angl. *origin of replication*) mesto podvojevanja HPV genoma, ki se nahaja znotraj območja LCR (angl. *long control region*) in deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo (Poljak in sod., 2005). Gen E2 nosi zapis za beljakovino, ki se veže na virusno DNA in tako uravnava prepisovanje in podvojevanje virusnega genoma, ter zapis za beljakovini, ki zaviralno uravnava prepisovanje E6 in E7. Vloga virusne beljakovine E4 še ni znana. Dosedanje študije so pokazale, da se E4 veže na citokeratin in povzroči porušitev citoskeleta celice (zur Hausen, 1996). Beljakovina E5 izraža transformirajoče lastnosti, in sicer inducira celično transformacijo preko tirozin-kinaznih receptorjev nekaterih rastnih faktorjev (Poljak in sod., 2005).

Nekodirajoče področje LCR, imenovano tudi URR (angl. *upstream regulatory region*) ne vsebuje zapisa za beljakovine, ampak predstavlja zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje virusnega razmnoževanja ter prepisovanja virusnih in celičnih genov. Nahaja se med genom L1 in genom E6. Dolžina LCR anogenitalnih humanih papilomavirusov variira med 800 in 900 bp (zur Hausen, 1996). Funkcija drugega nekodirajočega področja, ki se nahaja med genom E5 in genom L2 še ni znana (McGlennen in sod., 2000).

2.1.3 Razvrščanje HPV

HPV predstavljajo izredno heterogeno skupino virusov, ki jih glede na skladnost nukleotidnega zaporedja razvrščamo v različne genotipske skupine. Do sedaj je popolnoma opredeljenih 96 različnih genotipov HPV (de Villiers in sod., 2004).

Leta 1978 so na konferenci v Mobilu (Alabama, ZDA) prvič sprejeli predlog o poimenovanju HPV. Sprejeli so sklep, ki pravi, da novo odkrit HPV virus opredelimo kot nov genotip, če je skladnost njegovega nukleotidnega zaporedja z že znanimi genotipi manj kot 50 %. Skladnost nukleotidnega zaporedja naj bi ugotavljali z merjenjem reasociacijske kinetike pri hibridizaciji pod strogimi pogoji (zur Hausen, 1996).

Kasneje (leta 1991) je Mednarodna komisija za nomenklaturo virusov na letnem sestanku v Seattlu (Washington, ZDA) določila nova merila za opredelitev genotipa oziroma podtipa HPV. Vsak novo odkrit virus, ki kaže več kot 10 % neskladnost nukleotidnega zaporedja z

že znanimi genotipi virusa v področjih E6, E7 in L1, opredelimo kot nov genotip. Če je neskladnost 2-10 %, je to virusni podtip, in kadar je neskladnost pod 2 %, novi virus opredelimo kot različico enakega genotipa (zur Hausen, 1996). Leta 1995 na letni konferenci v Quebec Cityju določijo, da je za opredelitev novega genotipa HPV potrebna le analiza nukleotidnega zaporedja v področju L1 (zur Hausen, 1996).

Genotipe HPV razvrščamo v določene skupine na dva načina: glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela in glede na skladnost nukleotidnih zaporedij.

2.1.3.1 Razvrščanje genotipov HPV glede na tkivni tropizem

Na podlagi epidemioloških raziskav in raziskav evlucijskih odnosov med genotipi HPV, ter glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela poznane genotipe HPV razvrščamo v štiri skupine (Poljak in sod., 2005), kot je prikazano v preglednici 1.

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

Sluznični (anogenitalni) genotipi HPV

Visokorizični genotipi HPV

HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Verjetno visokorizični genotipi HPV

HPV-26, 53, 66

Nizkorizični genotipi HPV

HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, candHPV-89

Genotipi z nejasnim onkogenim potencialom

HPV-34, 55 (podtip HPV-44), 57, candHPV-62, HPV-64 (podtip HPV-34), 67, 69, 71, 74, 83, 84, IS39 (podtip HPV-82)

Nesluznični (kožni) genotipi HPV

HPV-1, 3, 4, 10, 28, 29, 41, 48, 50, 60, 63, 65, 78, 88, 94, 95

Kožno-sluznični genotipi HPV

HPV-2, 7, 27, 40, 43, 57, candHPV-91

Genotipi EV-HPV, povezani z boleznijo *epidermodysplasia verruciformis*

HPV-5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 36, 37, 28, 47, 49, 75, 76, 80, candHPV-92, 93, 96

Sluznični (anogenitalni) genotipi HPV okužijo ploščatocelični epitelij sluznic anogenitalnega predela. Glede na zmožnost povzročanja benignih oziroma (pre)malignih sprememb ploščatoceličnega epitelija jih delimo na visokorizične, nizkorizične in genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom. (Muñoz in sod., 2003; Poljak in sod., 2005).

Okužba z nizkorizičnimi genotipi HPV je povezana predvsem z razvojem benignih novotvorb ploščatoceličnega epitela, medtem ko je okužba z visokorizičnimi genotipi HPV etiološko povezana z nastankom intraepitelijskih neoplazij najvišje stopnje in malignimi ploščatoceličnimi tumorji (Poljak in sod., 1998). Med verjetno visokorizične genotipe uvrščamo HPV-26, 53 in 66, saj je zbranih premalo epidemioloških in bioloških dokazov, ki bi potrdile uvrstitev teh genotipov k visokorizičnim (Muñoz in sod., 2003).

Nesluznični oziroma kožni genotipi HPV so bili prvotno izolirani iz različnih benignih in malignih novotvorb kože. Okužijo predvsem poroženel večskladen ploščatocelični epitel in najpogosteje povzročajo benigne novotvorbe kože (navadne kožne bradavice) (Poljak in sod., 2005).

Kožno-sluznični genotipi HPV lahko okužijo poroženevajoč in neporoženevajoč večvrstni ploščatocelični epitel. V zadnjem času jih povezujejo z neoplastičnimi spremembami epitela sluznic (de Villiers in sod., 2004; Poljak in sod., 2005).

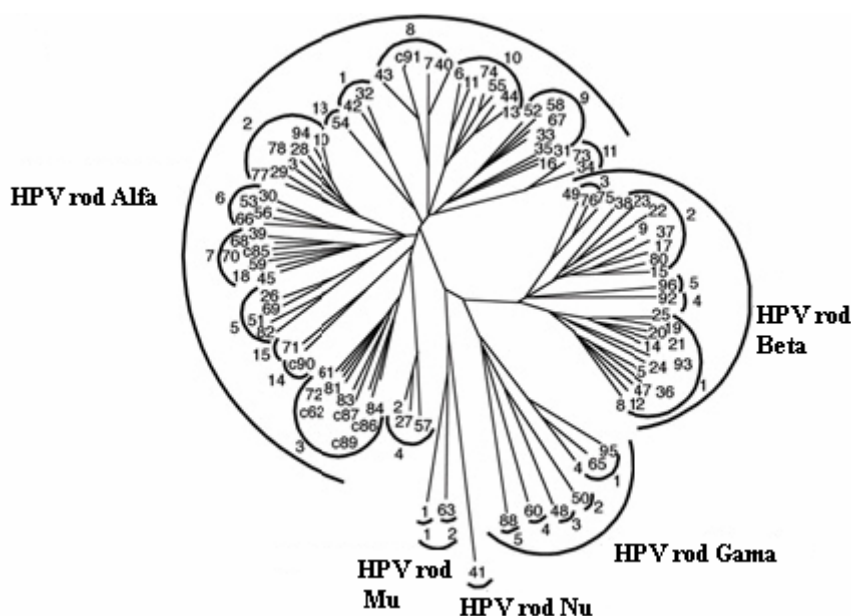
Genotipi EV-HPV so bili prvotno osamljeni iz resičastih novotvorb kože bolnikov z dedno boleznijo imenovano bradavičasta epidermodisplazija (*epidermodysplasia verruciformis*). Omenjene genotipe HPV pogosto odkrijemo v kožnih spremembah bolnikov z oslabljenim imunskim sistemom, in sicer najpogosteje pri bolnikih okuženih s HIV (Adams in sod., 1995).

2.1.3.2 Razvrščanje genotipov HPV glede na skladnost nukleotidnih zaporedij

Sledeči način razvrščanja temelji na medsebojni primerjavi nukleotidnega zaporedja ohranjenih delov genoma različnih genotipov HPV. Leta 2004 de Villiersova s sodelavci s primerjavo celotnega zaporedja L1 ORF uvrsti 96 genotipov HPV in 22 živalskih virusov papiloma v različne rodove-alfa, beta, gama, delta, epsilon, zeta, eta, teta, iota, kapa,

lambda, mu, nu, ksi, omikron in pi. V rod virusov papiloma alfa uvrščamo sluznične, kožno-sluznične in nekatere kožne genotipe HPV. V rod virusov beta uvrščamo genotipe HPV, ki so bili prvotno izolirani iz resičastih novotvorb kože bolnikov z *epidermodysplasia verruciformis* (EV-HPV), ter genotipe HPV, ki povzročajo kožne lezije pri osebah z imunsko pomanjkljivostjo. Rodove virusov papiloma gama, mu in nu sestavljajo preostali kožni genotipi HPV, medtem ko v preostale rodove uvrščamo različne živalske viruse papiloma (de Villiers in sod., 2004; Poljak in sod., 2005).

Sorodnost virusov papiloma prikazuje filogenetsko drevo na sliki 2.



Slika 2. Filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodnost virusov papiloma (Doorbar, 2006: 526)

2.1.4 Razmnoževanje virusa HPV in njegovi onkogeni učinki

Okužba s HPV se vedno začne v bazalnih epitelijskih celicah, kjer se verjetno nahajata primarni (heparan sulfat proteoglikan) in sekundarni ($\alpha 6$ integrin) specifični celični receptor za HPV. Počasnemu vstopu virusa v celico sledi prenos virusne DNA v celično jedro (Doorbar, 2006). Proces razmnoževanja HPV je natančno uravnan, saj je odvisen od prisotnosti določenih virusnih regulatornih beljakovin in stopnje diferenciacije epitelijskih celic gostitelja. Ker bazalne epitelijske celice še niso diferencirane, je razmnoževanje

virusne DNA, ki se nahaja v izvenkromosomskih delcih, episomih, močno omejeno. Z dozorevanjem okuženih celic se povečuje tudi sposobnost razmnoževanja virusa v celici, kompletni virioni pa se sprostijo le iz popolnoma dozorelih celic (de Villiers, 2001; Schneider, 1994). Z dozorevanjem bazalnih celic epitela v spinozne celice, postane njihovo znotrajcelično okolje bolj ugodno za podvojevanje episomske DNA in prepisovanje genov L1 in L2. Tako pride do sinteze velike in male plaščne beljakovine in nastanka popolnih oblik virusov, ki se sproščajo s celično lizo in so sposobni okužiti sosednje celice. Zaradi razmnoževanja HPV nastanejo v povrhnjih epitelijskih celicah za HPV značilne morfološke spremembe imenovane koilocitoza (zur Hausen, 1996; Schneider, 1994).

Številne raziskave kažejo, da je fizikalno stanje DNA HPV v malignih in benignih tumorjih različno (Bosch in sod., 2001). V benignih tumorjih in intraepitelijskih neoplazijah nižje stopnje (CIN I, CIN II) je virusna DNA prisotna v episomalni obliki, pri malignih tumorjih in intraepitelijskih neoplazijah najvišje stopnje (CIN III) pa je virusna DNA vključena v genom gostiteljske celice (Bosch in sod., 2001; Poljak in sod., 2005).

Do vključevanja DNA HPV v humani genom pride le v primeru dolgotrajne (perzistentne) okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV, medtem ko je pri prehodnih okužbah z mejno- in nizkorizičnimi genotipi ta dogodek izjemno redek (McGlennen, 2000). Pri vključevanju virusne DNA v genom gostiteljske celice pride do prekinitve virusnega genoma na področju E2, kar privede do neregulirane povečane ekspresije virusnih beljakovin E6 in E7, ki sta pomembna virusna onkogeni. Beljakovini E6 in E7 se vežeta na gostiteljske tumor zavirajoče beljakovine p53 in Rb in tako preprečita njuno normalno delovanje (Lazo, 1999; zur Hausen, 1996; Walboomers in sod., 1999). Beljakovina p53 deluje kot aktivator in represor prepisovanja (Vousden, 1993; Lazo, 1999). Ob poškodbi DNA količina p53 naraste in zaustavi celično delitev v G1 fazi. Tako lahko celični popravilni mehanizmi popravijo okvarjene odseke DNA, nivo p53 upade in celični ciklus napreduje v S fazo. Ob večji poškodbi DNA beljakovina p53 sproži proces apoptoze. Odsotnost ali nepravilno delovanje p53 omogoča neovirano delitev celic s poškodovano DNA, kar lahko vodi do kopičenja nadaljnjih mutacij in s tem do maligne transformacije celic (Vousden, 1993; Lazo, 1999, zur Hausen, 1996).

Sposobnost vezave z beljakovinama p53 in Rb imata tudi beljakovini E6 in E7 nizkorizičnih genotipov HPV, vendar je njuna moč vezave v primerjavi z E6 in E7 visokorizičnih genotipov HPV približno stokrat manjša (Summersgil in sod., 2000).

2.2 RAK MATERNIČNEGA VRATU

2.2.1 Epidemiologija raka materničnega vratu

Ploščatocelični karcinom materničnega vratu je predvsem v razvitih državah, za rakom dojk še vedno drugi najpogostejši rak pri ženskah. Zaradi pogosto dolgega premalignega stadija bolezni, učinkovitega odkrivanja in zdravljenja neinvazivne oblike predstavlja rak materničnega vratu eno od redkih onkoloških bolezni, pri katerih lahko z načrtnim iskanjem premalignih sprememb občutno zmanjšamo število novih bolnic z invazivnim rakom materničnega vratu (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995). Za preprečevanje bolezni je bistveno zgodnje odkrivanje in v razvitem svetu sta se v zadnjih dveh desetletjih obolevnost in smrtnost zaradi raka materničnega vratu zmanjševali zaradi dobro zasnovanega in skrbno izpeljanega načrtnega zgodnjega odkrivanja te bolezni (Vizcaino in sod., 2000). Kljub temu se incidenca raka materničnega vratu v nekaterih deželah z dobro organiziranim aktivnim iskanjem in odkrivanjem ne zmanjšuje več, temveč celo narašča. Podobno velja tudi za Slovenijo, kjer se je v letih od 1961 do 1982 incidenca raka materničnega vratu zmanjševala, vendar po letu 1982 se obolevnost ne zmanjšuje več, temveč se pri ženskah mlajših od 54 let celo povečuje (Poljak in sod., 2005).

Številne raziskave v zadnjih dvajsetih letih so nedvomno pokazale, da so HPV glavni etiološki dejavnik za razvoj raka materničnega vratu (Stoler, 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). Poleg okužbe pa so pogosti spremljevalci pri vzniku raka materničnega vratu še številni drugi dejavniki: pogosto menjavanje spolnih partnerjev, nižja starost pri prvem spolnem odnosu, številnejši porodi in splavi, pogostejše okužbe s spolno prenosljivimi mikroorganizmi, kajenje, dolgotrajno

jemanje hormonskih kontracepcijskih sredstev, dejavniki okolja, nižja izobrazba, nepravilna prehrana, genetski dejavniki in zmanjšana odpornost organizma (Syrjänen K. in Syrjänen S., 2000; Grce in sod., 2001).

Rezultati dveh multicentričnih raziskav kažejo, da je prevalenca okužbe s HPV pri ženskah z invazivno obliko raka materničnega vratu vsaj 99,7 % (Bosch in sod., 1995; Walboomers in sod., 1999). Dokazano je bilo tudi, da se rak materničnega vratu ne more razviti pri ženski, ki ni predhodno nekaj časa okužena z visokorizičnimi genotipi HPV. Kljub temu pa je večina okužb s HPV le prehodnih in ne vodijo v nastanek cervikalne intraepitelijske neoplazije (CIN) in raka materničnega vratu (zur Hausen, 1996).

2.2.2 Predrakave spremembe ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu

Rak materničnega vratu se razvije s prehodom preko več stopenj predrakavih sprememb ploščatoceličnega epitelija (Walboomers in sod., 1999). Z epidemiološkimi študijami so dokazali, da so za njihov nastanek potrebni isti rizični dejavniki kot za razvoj invazivnega karcinoma in da predrakave spremembe lahko ugotovimo vsaj 10 let pred pojavom invazivnega karcinoma. Ženske s predrakavimi spremembami bistveno pogosteje zbolevajo za rakom materničnega vratu, kot ženske brez takšnih sprememb (Morrison, 1994).

2.2.2.1 Razvrščanje predrakavih sprememb materničnega vratu

Prvi, ki je opisal predrakave morfološke spremembe celic materničnega vratu je bil Papanicolaou (Papanicolaou, 1948). Leta 1966 je Patten predrakave spremembe razdelil v dva tipa: displazija in intraepitelijski karcinom *in situ* (angl. *carcinoma in situ*, CIS) (Patten, 1966). Displazijo je opredelil kot mejno rakavo spremembo, ki lahko napreduje v invazivni karcinom, ostane nespremenjena skozi daljše časovno obdobje, ali pa jo nadomesti normalni epitelij. Intraepitelijski karcinom pa predstavlja tisto predrakavo spremembo, ki pogosto napreduje v invazivni karcinom.

Kasneje so displazijo razdelili v tri stopnje: blago, zmerno in hudo. Napredovanje displazije v invazivni karcinom je odvisno od njene stopnje (Koss, 1987).

Leta 1973 je Richart predložil novo klasifikacijo, imenovano intraepitelijska neoplazija materničnega vratu (angl. *cervical intraepithelila neoplasia*, CIN). Morfološke spremembe opisane pri blagi displaziji je opredelil kot CIN I, morfološke spremembe pri zmerni displaziji kot CIN II in morfološke spremembe pri hudi displaziji kot CIN III (Richart, 1973).

2.2.2.2 Odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu

Rak materničnega vratu je ena izmed redkih oblik raka, ki ga je mogoče preprečiti s presejalnim programom. Učinkovitost presejanja, ki se pokaže kot zmanjšana incidenca raka materničnega vratu, je po svetu različna. Odvisna pa je od deleža redno presejanih žensk, odvzema brisa, shranitve odvzetih celic in interpretacije rezultata (Nanda in sod., 2000; Stoler, 2000).

Klasičen način za uspešno in množično odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu in neinvazivnega raka je enostaven in periodičen odvzem brisa sluznice materničnega vratu pri rednem ginekološkem pregledu (Nanda in sod., 2000; Stoler, 2000).

Papanicolaou in Traut sta leta 1941 prvič opozorila na možnost zgodnjega odkrivanja premalignih sprememb materničnega vratu. Vpeljala sta mikroskopski pregled epitelijskih celic sluznice materničnega vratu, ki ga imenujemo test po Papanicolaou ali test PAP in se kot najenostavnejša in splošno priznana metoda uporablja še danes. K izboljšanju zanesljivosti metode je pripomoglo barvanje brisov materničnega vratu za razpoznavanje morfoloških lastnosti jeder odluščenih celic in izboljšan način jemanja brisov z lesenim loparčkom po Ayreju (Stoler, 2000; Nanda in sod., 2000; Marin, 2001).

Kljub temu, da je PAP test enostaven, hiter in poceni, se pojavljajo pomanjkljivosti, ki se kažejo v slabi oceni morebitnega napredovanja benignih sprememb v invazivno obliko raka (Crum, 1994).

S potrditvijo etiološke povezanosti raka materničnega vratu z okužbo HPV je dokaz prisotnosti določenih tipov HPV v citoloških in tkivnih vzorcih s pomočjo občutljivejših, standardiziranih molekularnih metod pomembna dodatna raziskava v zgodnjem odkrivanju

rizične skupine bolnic s prekancerogenimi spremembami in karcinomi (Uršič-Vrščaj in Poljak, 1995).

2.3 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV

HPV se razmnožujejo le v terminalno diferenciranih epiteljskih celicah, zato virusov ni moč izolirati iz kliničnih vzorcev z metodo gojenja v celičnih kulturah (Poljak in sod., 1998). Zaradi povezave nekaterih tipov HPV z vznikom raka materničnega vratu so v zadnjih 30 letih razvili številne metode za dokazovanje HPV, ki jih delimo na tradicionalne in molekularne. Poleg citološkega testa (PAP) so se danes uveljavile številne metode, ki temeljijo na odkrivanju povzročitelja in dokazovanju prisotnosti DNA HPV v kliničnih vzorcih. Tako lahko odkrijemo tudi subklinično in latentno okužbo s HPV ter preprečimo napredovanje bolezni.

2.3.1 Tradicionalne diagnostične metode

K tradicionalnim diagnostičnim metodam prištevamo uporabo elektronskega mikroskopa pri opazovanju virusnih delcev v odvzetem materialu, imunohistokemične metode za odkrivanje strukturnih beljakovin virusa z uporabo mono- in poliklonskih protiteles ter uporabo svetlobnega mikroskopa pri opazovanju citopatogenih sprememb v okuženih celicah ali koilocitih, ki so značilno povečane sferične celice s hiperkromnimi in polimorfnimi jedri, obdanimi s svetlim pasom (Crum, 1994; Poljak in sod., 1993; Reid in Lorincz, 1995; Trofatter, 1997). Navedene spremembe sta leta 1956 prvič opisala Koss in Durfee in jih imenujemo koilocitoza.

Tradicionalne metode niso dovolj občutljive in ne omogočajo genotipizacije HPV, zato so se v diagnostiki okužb s HPV uveljavile le molekularne metode (Poljak in sod., 1998).

2.3.2 Molekularne diagnostične metode

Molekularne metode temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusne DNA. Uporabljajo se 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), v katerih pomnožujemo značilna kratka zaporedja virusnega genoma, pridelek reakcije pa naknadno dokazujemo z različnimi tehnikami (elektroforeza v gelu, encimska razgradnja, dot blot, encimski oligonukleotidni test).

2.3.2.1 Hibridizacijske metode

Osnovni princip hibridizacijskih metod temelji na hibridizaciji med komplementarnimi predeli majhnih, označenih delcev nukleinskih kislin ali lovke s tarčno DNA. Lovke so lahko označene z različnimi radioaktivnimi (^3H , ^{32}P , ^{35}S) ali neradioaktivnimi označevalci (biotin, digoksinin). Trdnost povezave med lovko in tarčno DNA je odvisna od skladnosti nukleotidnega zaporedja obeh verig in od pogojev, pri katerih poteka hibridizacija. Lovke so lahko značilne za določen genotip (genotipsko-značilne lovke) ali za več genotipov HPV (skupinsko-značilne lovke). Z uporabo genotipsko-značilnih lovke je mogoče opredeliti genotip HPV (Manos in Gravitt, 1993).

2.3.2.1.1 Hibridizacija po Southernu

Metode hibridizacije po Southernu je bila dolga leta temeljna metoda molekularne virologije za dokazovanje in genotipizacijo HPV (zur Hausen in sod., 1974). Pri tej metodi iz tkivnih vzorcev ali brisov sluznice najprej osamimo DNA, ki jo nato razrežemo z ustreznimi restrikcijskimi encimi. Nastale odseke DNA nato ločimo po velikosti z elektroforezo v gelu in prenesemo s kapilarnim ali vakuumskim prenosom na nitrocelulozno ali najlonsko membrano. Nato izvedemo hibridizacijo z radioaktivno ali neradioaktivno označenimi lovkami. Te se vežejo samo na komplementarna področja DNA HPV. Nevezane lovke po hibridizaciji odstranimo. Položaj delcev DNA, ki so hibridizirali z lovkami ugotovimo z avtoradiografijo ali ustrezno encimsko reakcijo (Southern, 1975).

Metode hibridizacije po Southernu je edina metoda s katero je mogoče ugotoviti fizikalno stanje DNA HPV v celici oziroma ali je DNA HPV v obliki krožnih zunajkromosomskih delcev (episomov) ali je vključena v genom celice. Ker pa je metoda časovno zamudna,

draga in za izvedbo zahteva relativno velike količine DNA (5-10 μ l), za rutinsko diagnostiko ni primerna (Brandsma in sod., 1989).

2.3.2.1.2 Hibridizacija dot-blot

Hibridizacija dot-blot je tehnično enostavnejša različica prej opisane metode. Pri tej metodi ekstrahirano DNA brez predhodne encimske razgradnje prenesemo na najlonsko membrano. Sledi hibridizacija z radioaktivno ali neradioaktivno označenimi lovskami. Pri pozitivnem rezultatu je na filmu (radioaktivna različica) ali na najlonski membrani (neradioaktivna različica) viden madež. Prav zaradi specifične oblike pozitivnega rezultata so metodo poimenovali dot-blot (angl. *dot-madež*) (Poljak, 1998).

Metoda je v primerjavi s hibridizacijo po Southernu hitrejša, cenejša in primernejša za analizo večjega števila vzorcev, vendar manj občutljiva in manj specifična (Manos in Gravitt, 1993).

2.3.2.1.3 Hibridizacija *in situ* na filtru

Hibridizacija *in situ* na filtru (FISH, angl. filter *in situ* hybridization) je poenostavljena različica hibridizacije dot-blot, pri kateri se izognemo osamitvi DNA, zato je metoda hitrejša, cenejša, enostavnejša in omogoča analizo večjega števila vzorcev. Pri tej metodi celice za kratek čas izpostavimo delovanju močnih detergentov in encimov, ki celice razkrojijo. Razkrojene celice prenesemo na najlonsko membrano in izvedemo hibridizacijski postopek (Poljak, 1998).

2.3.2.1.4 Hibridizacija *in situ*

Hibridizacija *in situ* (ISH, angl. *in situ* hybridization) je metoda, pri kateri potekata denaturacija in hibridizacija v okuženih celicah (*in situ*) in ne na najlonskih ali nitroceluloznih membranah. ISH lahko izvedemo na citoloških vzorcih ali na tkivnih rezinah. Tkiva primerna za pripravo tkivnih rezin so lahko sveže zamrznjena ali fiksirana v formalinu oziroma kakšnem drugem fiksativu. Pri razgradnji z različnimi proteazami celice

postanejo prepustne in tako omogočajo radioaktivno ali neradioaktivno označenim lovkam vstop v celico, kjer pride do hibridizacije z znotrajceličnimi 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. Po vezavi lovke na komplementarni del tarčne virusne DNA biotin prikažemo z visokoznačilnim avidinom ali antibiotinskimi protitelesi, označenimi z alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo. Po dodatku encimskega substrata se del celice, kjer se nahajajo iskana nukleotidna zaporedja pri pozitivni reakciji obarva, kar opazujemo s svetlobnim mikroskopom (Poljak, 1998; Autillo-Touati in sod., 1998).

Glavne prednosti metode ISH so preprostost, hitrost, ponovljivost, razmeroma nizka cena, možnost hkratnega testiranja več vzorcev, možnost natančne lokalizacije virusne DNA v celici in možnost primerjave morfoloških sprememb v tkivih, okuženih z določenim genotipom HPV. V primerjavi z metodami, pri katerih poteka hibridizacija s predhodno osamljeno DNA, ima ISH nekoliko nižjo občutljivost, kar je njena glavna pomanjkljivost. Druga pomanjkljivost je, da so komercialno dostopne le lovke, ki so značilne za sedem genotipov HPV (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 in HPV-51) (Nuovo in Richart, 1989).

2.3.2.1.5 Tekočinska hibridizacija

Test Hybrid Capture (Digene laboratories, Silver Spring, ZDA) je trenutno edini test za diagnostiko okužbe s HPV, ki ima dovoljenje ameriške FDA za uporabo v humani medicini. Metoda temelji na tekočinski hibridizaciji, pri kateri pride do hibridizacije tarčne DNA HPV z značilnimi enovijačnimi lovkami RNA prosto v tekočini. Mešanica lovk je sestavljena iz dveh kompletov enovijačnih RNA: ene lovke so usmerjene proti nizkorizičnim genotipom, druge proti mejno- in visokorizičnim genotipom HPV. Nastali hibridizacijski kompleksi se vežejo na poliklonska protitelesa, vezana na netopni nosilec (notranjost reakcijske posodice, vdolbinice mikrotitracijske ploščice, stena epruvete). Nevezane lovke s spiranjem odstranimo in nato dodamo protitelesa proti DNA:RNA hibridom, označena z alkalno fosfatazo in kemiluminiscentni substrat. Intenziteto svetlobe,

ki jo oddaja kemiluminiscentni substrat, merimo z luminometrom in jo izražamo v relativnih svetlobnih enotah (RLU, angl. *relative light units*). Intenziteta sproščene svetlobe je sorazmerna količini vezanih hibridov oziroma količini DNA HPV v kliničnem vzorcu (Poljak in sod., 1999). Obstajata dve generaciji testa Hybrid Capture. S testom prve generacije (HC I) je mogoče prepoznati okužbo s 5 nizkorizičnimi genotipi (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43 in HPV-44) in 9 visokorizičnimi genotipi (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-51, HPV-52 in HPV-56). Kljub praktičnosti in zanesljivosti HC I se zaradi premajhne občutljivosti trenutno v svetu uporablja novejša, druga generacija testa Digene Hybrid Capture (HC II). HC II je leta 1998 dobil licenco ameriške FDA, da se lahko uporablja kot diagnostični test za rutinsko dokazovanje HPV. S spremembo sestave nekaterih reagentov in z vključitvijo lovk za prepoznavanje štirih dodatnih visokorizičnih genotipov HPV (HPV-39, HPV-58, HPV-59 in HPV-68) so občutljivost testa povečali. S to različico testa je tako možno zaznati že 10 do 50-krat manjšo količino virusa kot s HC I. S temi izboljšavami se je povečala tudi klinična občutljivost v odkrivanju CIN II/CIN III in raka materničnega vratu. Test je hitrejši in lažje izvedljiv ter zato bolj praktičen za rutinsko uporabo v diagnostičnih laboratorijih, saj poteka hibridizacija v mikrotitrskih ploščicah (Poljak in sod., 1999; Clavel in sod., 2000). Pomanjkljivost testa HC II je občasno lažno pozitiven rezultat zaradi navzkrižne reaktivnosti visokorizičnega kompleta DNA lovk z nekaterimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test (Poljak in sod., 2002).

2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) je trenutno najbolj občutljiva metoda za dokazovanje okužb s HPV in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 1994). Dokazovanje virusov s PCR Dokazovanje virusov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za virus značilnega majhnega odseka 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).

Najbolj pomemben korak optimizacije PCR je izbira začetnih oligonukleotidov, ki določajo del genoma HPV, ki bo v reakciji pomnožen (Poljak in sod., 1996; Manos in sod., 1989). Za pomnoževanje virusnega genoma HPV izbiramo med dvema različnima vrstama začetnih oligonukleotidov, med genotipsko-značilnimi in skupinsko-značilnimi oligonukleotidi.

Zaradi raznolikosti nukleotidnih zaporedij posameznih genotipov HPV ni mogoč razvoj preprostih, univerzalnih začetnih oligonukleotidov in protokola PCR za dokazovanje vseh genotipov HPV (Poljak in sod., 2005). Zato je za določitev genotipa HPV potrebna izvedba večjega števila reakcij PCR z uporabo različnih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov. Kljub učinkovitosti in visoki specifičnosti nekaterih genotipsko-značilnih začetnih oligonukleotidov genotipizacija z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi ni primerna za opredeljevanje genotipov v velikem številu vzorcev.

Pomnoževanje širokega spektra genotipov HPV v eni sami reakciji PCR pa je možno z uporabo skupinsko-značilnih začetnih oligonukleotidov (Bernard in sod., 1994; Trofatter, 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 se največkrat uporabljajo skupinsko-značilni začetni oligonukleotidi PGMY09/PGMY11, GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450, 150 oziroma 65 bp dolg odsek močno ohranjenega virusnega gena L1 (Poljak in sod., 2005).

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

- Pomnožene dele DNA ločimo v elektroforezi v gelu in njihove velikosti primerjamo z velikostjo standardnih delov DNA, ločenih v enakih razmerah elektroforeze. Specifičnost in občutljivost tovrstnega dokazovanja pridelka PCR je majhna (Poljak, 1995).
- 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. Pri metodi lahko uporabimo različno število in različne vrste restrikcijskih encimov. Metoda je hitra in enostavna. Njena zanesljivost narašča s številom uporabljenih restrikcijskih encimov. Najzanesljivejša je metoda RFLP z uporabo 7 restrikcijskih encimov, a katero lahko opredelimo 44 različnih anogenitalnih genotipov HPV (Poljak, 1995; 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).
- 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., 1990). Temu sledi hibridizacija z genotipsko-značilnimi lovkami, ki morajo biti izbrane tako, da se v procesu hibridizacije vežejo na komplementarno zaporedje pomnoženega dela genoma, ki je značilno samo za posamezne genotipe HPV.
- Reverzni line-blot je metoda, ki omogoča hibridizacijo produktov PCR z velikim številom genotipsko značilnih lovk hkrati, ki so vezane na nitrocelulozno

membrano v obliki jasno omejenih trakov (Kleter in sod., 1999). Metoda je zato primerna za analizo velikega števila vzorcev. Tako je mogoče opredeliti širok spekter genotipov HPV, med njimi tudi okužbe z več različnimi genotipi HPV (mešane okužbe). V literaturi je opisanih več različic metode reverzni line-blot. Tako so pri družbi Innogenetics (Ghent, Belgija) razvili komercialno dostopen test INNO-LiPA, s katerim je mogoče opredeliti 25 različnih anogenitalnih genotipov HPV. Test temelji na pomnoževanju 65 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi SPF10 (Kleter in sod., 1999; Kleter in sod., 1998). Družba Roche Molecular Systems (Branchburg, NJ) pa je nedavno razvila metodo reverzni line-blot, s katero je mogoče opredeliti 27 različnih genotipov HPV. Metoda temelji na pomnoževanju 450 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi MY9, MY11 in HMB01 (Gravitt in sod., 1998; Coutlée in sod., 1999). Oba testa imata številne prednosti, vendar se zaradi komercialnih problemov (prepoved komercialnega trženja zaradi patenta družbe Digene) v diagnostiki še nista uveljavila.

Nedavno pa je bil razvit komercialni test druge generacije, Linear Array HPV Genotyping Test, s katerim je mogoče opredeliti 37 genotipov HPV (Poljak in sod., 2005).

- Metoda določanja nukleotidnega zaporedja je edina metoda s katero dokončno opredelimo genotip HPV (Feoli-Fonesca in sod., 1999; Rady in sod., 1993; Rady in sod., 1995). V primerjavi z ostalimi molekularnimi metodami za genotipizacijo HPV je določanje nukleotidnega zaporedja metoda, ki omogoča bolj natančno opredelitev že znanih genotipov HPV, odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic HPV in opredeljevanje novih genotipov HPV (Rady in sod., 1993). Ker je metoda časovno zamudna, draga in tehnično zahtevna, se danes večinoma uporablja le v raziskovalne namene.

PCR je trenutno najbolj občutljiva metoda za dokazovanje DNA HPV, saj zazna že 10 do 100 kopij DNA v preiskovani količini vzorca. V raziskovanju in v epidemioloških študijah okužb s HPV je nepogrešljiva, vendar pa so zanjo značilne tudi nekatere pomanjkljivosti: visoka cena, dolgotrajnost, zapletenost in pogost pojav lažno pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije in lažno negativnih rezultatov (Poljak in sod., 1998).

2.4. MOLEKULARNA OPREDELITEV IN POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-16 IN HPV-31

2.4.1 Odkritje in razvrščanje HPV-31

Leta 1986 je Lorincz s sodelavci na podlagi pregleda preko 100 anogenitalnih vzorcev odvzetih z biopsijo odkril nov genotip HPV. V svojem poročilu je z metodo hibridizacije dokazal 35-40 % homolognost s HPV-16 in ga na podlagi predhodnih kriterijev (Coggin in zur Hausen, 1979) opredelil kot nov genotip HPV-31 (Lorincz in sod., 1986).

Goldsborough s sodelavci je tri leta kasneje določil celotno nukleotidno zaporedje DNA (7912 bp) HPV-31. Medsebojno ga je primerjal z dotedaj že znanimi zaporedji genotipov HPV in ugotovil tesno sorodnost s HPV-16 (Goldsborough in sod., 1989).

Na podlagi filogenetskih in epidemioloških študij, in glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela uvrščamo HPV-31 med visokorizične, alfa HPV (Calleja-Macias in sod., 2005). Glede na skladnost nukleotidnega zaporedja uvrščamo genotip HPV-31 v rod alfa in v vrsto 9 skupaj z nekaj ostalimi visokorizičnimi genotipi (HPV-16, 33, 35, 52, 58 in 67), ki povzročajo maligne lezije na sluznici (Bernard, 2005).

Dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV in izražanje virusnih onkogenov E6 in E7 sta poglobitna etiološka dejavnika za nastanek raka materničnega vratu (RMV). Med poglobitne povzročitelje RMV, poleg HPV-16, uvrščamo tudi visokorizični genotip HPV-31, ki ga po pogostosti pri ženskah z RMV v svetovnem merilu uvrščamo na četrto mesto za genotipi HPV-16, HPV-18 in HPV-45 (Tornesello in sod., 2004).

2.4.2 Podtipske različice HPV-16 in njihov pomen

Na osnovi raziskovanja genoma genotipa HPV-16 številni raziskovalci poročajo, da je za nastanek cervikalne intraepitelijske neoplazije pomembna dolgotrajna okužba s specifično gensko različico visokorizičnega genotipa HPV. Franco s sodelavci je določil kot pomembno orodje epidemioloških študij opredelitev nukleotidnega zaporedja nekodirajočega področja LCR in s tem določitev različic posameznega genotipa (Franco in sod., 1994). Leta 1996 je Londesborough s sodelavci prvi dokazal povezavo specifične podtipske različice HPV-16 s perzistentno okužbo (Londesborough in sod., 1996). Leto kasneje je Xi s sodelavci dokazal, da okužba z ne-evropsko različico HPV-16 pomeni večje tveganje za perzistentno okužbo in s tem razvoj RMV (Xi in sod., 1997).

Spremembe nukleotidnega zaporedja v nekodirajočem področju LCR vplivajo na povečano izražanje virusnih onkogenov E6 in E7, kar bi posledično lahko bil vzrok sprememb bioloških in patoloških lastnosti genotipa HPV-16 (Veress in sod., 1999; Kammer in sod., 2000; Kurvinen in sod., 2000; Tornesello in sod., 2000). Te spremembe lahko vodijo v perzistentno okužbo in nadaljni razvoj premaligne spremembe v RMV (Dalstein in sod., 2003; Ferenczy in Franco, 2003).

Z določanjem in primerjavo nukleotidnih zaporedij genov L1, L2, E6, E7 in področja LCR genotipa HPV-16 so ugotovili, da sestoji iz različic, ki so jih na podlagi filogenetskih analiz razdelili v šest samostojnih filogenetskih vej: Evropsko (E), Azijsko (As), Azijsko-ameriško (AA), Afriško-1 (Af1), Afriško-2 (Af2) in Severno ameriško (NA1). Številne epidemiološke študije so skušale povezati okužbo s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz evropskih (Zehbe in sod., 1998; Nindl in sod., 1999; Bible in sod., 2000; van Duin in sod., 2000) in ne-evropskih vej (Xi in sod., 1997; Matsumoto in sod., 2000; Villa in sod., 2000; Berumen in sod., 2001; Hildesheim in sod., 2001) s povečanim tveganjem za nastanek RMV. Okužba s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz ne-evropskih vej naj bi predstavljala povečano tveganje za nastanek RMV (Tornesello in sod., 2004).

2.4.3 Podtipske različice HPV-31 in njihov pomen

Za razliko od HPV-16 je po podatkih iz literature znana le peščica raziskav o podtipskih različicah genotipa HPV-31. Le Gagnon s sodelavci pa je tudi molekularno opredelil

podtipske različice gena E7 genotipa HPV-31. V raziskavi Gagnona in sodelavcev so ugotovili, da genotip HPV-31 prav tako sestoji iz podtipskih različic oziroma, da se posamezni izolati genotipa HPV-31 razlikujejo v nukleotidnem zaporedju področja LCR in virusnih onkogenov E6 in E7 (Gagnon in sod., 2005). Z analizo področja LCR so ugotovili etnografsko specifičnost posameznih podtipskih različic genotipa HPV-31. Kljub tesni sorodnosti genotipov HPV-31 in HPV-16 niso uspeli dokazati povezavo določenih, specifičnih E6 (E7, LCR) različic genotipa HPV-31 s povečanim tveganjem za razvoj RMV. Posamezne različice genotipa HPV-31 namreč niso uspeli povezati s povečanim tveganjem za perzistentno okužbo, ki je pomemben dejavnik pri razvoju RMV.

2.5 NAMEN DELA

Ploščatocelični karcinom materničnega vratu je predvsem v razvitih državah, za rakom dojke še vedno drugi najpogostejši rak pri ženskah. Dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV in izražanje virusnih onkogenov E6 in E7 sta poglavitna etiološka dejavnika za nastanek RMV. Med poglavitne povzročitelje RMV, poleg HPV-16, uvrščamo tudi visokorizični genotip HPV-31, ki ga po pogostosti pri ženskah z RMV uvrščamo na četrto mesto.

Z določanjem in primerjavo nukleotidnih zaporedij genov L1, L2, E6, E7 in področja LCR genotipa HPV-16 so v številnih raziskavah ugotovili, da sestoji iz različic, ki so jih na podlagi filogenetskih analiz razdelili v šest samostojnih filogenetskih vej: Evropsko (E), Azijsko (As), Azijsko-ameriško (AA), Afriško-1 (Af1), Afriško-2 (Af2) in Severno ameriško (NA1). Okužba s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz ne-evropskih vej naj bi predstavljala povečano tveganje za nastanek RMV. Možno je, da so, podobno kot pri genotipu HPV-16 z nastankom RMV povezane samo določene, specifične E6 (E7, LCR) različice genotipa HPV-31.

Za razliko od HPV-16 je po podatkih iz literature znana le peščica raziskav o podtipskih različicah genotipa HPV-31. Objavljena pa je samo ena raziskava, kjer so bile molekularno opredeljene podtipske različice gena E7 genotipa HPV-31.

V ta namen smo v diplomski nalogi želeli opredeliti podtipske različice gena E7 slovenskih izolatov HPV-31, in jih na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij uvrstiti v obstoječe filogenetske skupine.

Za opredeljevanje podtipske različnosti gena E7 slovenskih izolatov HPV-31 smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja celotnega gena E7 in primerjali dobljena zaporedja z nukleotidnimi zaporedji ORF E7 referenčnega izolata J04353 HPV-31 v genski banki EMBL.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V nalogo smo vključili 17 izolatov predhodno opredeljenega genotipa HPV-31 iz arhivske zbirke Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, osamljenih pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij (CIN I - CIN III) in rakom materničnega vratu.

3.2 METODE

3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje gena E7 DNA HPV-31

Za pomnoževanje gena E7 DNA genotipa HPV-31 smo uporabili za genotip HPV-31 značilna začetna oligonukleotida, ki pomnožujeta 542 bp velik del gena E7. Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov za področje gena E7 genotipa HPV-31 in velikosti pričakovanih pridelkov PCR so podani v preglednici št. 2.

Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za področje gena E7 genotipa HPV-31 in velikosti pričakovanih pridelkov PCR

Začetna oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5' → 3')	Pomnoževani gen	Velikost pridelka PCR	Vir
E731S	CgT TgC ATA gCA TgT Tgg Ag	E7	542 bp	Gagnon in sod., 2005
E731R	CTg CTT CTg CCT gAT TgT Tg			

3.2.1.1 Sestava reakcijske mešanice za reakcijo PCR

Za natančno pomnoževanje (angl. *high fidelity*) gena E7 genotipa HPV-31 z začetnimi oligonukleotidi E731S in E731R smo uporabili komercialno dostopen komplet kemikalij, in sicer High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija).

Pripravili smo reakcijsko mešanico in določeno količino izolirane DNA HPV-31 odpipetirali v sterilne reakcijske posodice in jih vstavili v aparaturo za izvedbo PCR. Za pomnoževanje gena E7 HPV-31 smo uporabili računalniško vodeni GeneAmp® PCR System tip 2400 (Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Reakcijo smo izvedli pod točno določenimi pogoji.

3.2.1.2 Pogoji pomnoževanja s PCR

V sterilno posodico za pomnoževanje s PCR z začetnima oligonukleotidoma E731S/E731R smo odpipetirali 19,4 µl deionizirane vode, 0,3 µl vsakega začetnega oligonukleotida (50 µM) in 5 µl osamljene DNA HPV-31. Nastali mešanici smo dodali 25 µl mešanice High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics), ki vsebuje vse reagente potrebne za izvedbo reakcije PCR.

Pomnoževanje celotnega gena E7 HPV-31 z začetnima oligonukleotidoma E731S/E731R smo izvedli z 10-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 94 °C, 30 s pri 63 °C in 45 s pri 72 °C. Sledilo je 35-kratno ponavljanje temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 15 s pri 94 °C, 30 s pri 63 °C in 45 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 2 minuti inkubirali pri 94 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo mešanice termostabilnih encimov Taq DNA Polymerase in Tgo DNA Polymerase. Zadnjemu ciklu PCR je sledila 7 minutna inkubacija pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C.

3.2.2 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-butanediol 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 nanesemo od 5 do 8 µl mešanice pridelka PCR in pufru 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 µl pridelka PCR in 1,6 µl ustrezne tamponske raztopine Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 15 minut, s samodejno vključitvijo črpalke za kroženje pufru 1,5 minute po začetku elektroforeze in napetosti med elektrodama 120 V.

Po končani elektroforezi smo gel z nanešenimi vzorci pregledali pod UV svetlobo v UV transiluminatoriju in ga fotografirali s polaroidno kamero. Specifičnost namnoženega pridelka PCR je določala njegova velikost glede na velikost pozitivne kontrole in elektroforezne dolžinske lestvice 100 bp.

3.2.3 Avtomatsko sekveniranje in določanje podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31

Za opredeljevanje podtipske različnosti gena E7 izolatov HPV-31 smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja celotnega gena E7 in primerjali dobljena zaporedja z nukleotidnimi zaporedji ORF E7 referenčnega izolata J04353 HPV-31 v genski banki EMBL.

3.2.3.1 Čiščenje pridelkov PCR in določanje koncentracije

Pridelke PCR, ki so ustrezali pričakovanim velikostim, 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 pufra 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). Raztopino agaroze smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Raztopini 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 (Hofer, 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 6 x MassRulerTM Loading Dye Solution (Fermentas).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 30 minut in napetosti med elektrodama 120V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV svetlobo. 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.

3.2.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Pridelkom PCR smo določili nukleotidno zaporedje s komercialno dostopnim kompletom BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Reakcijska mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja izbranega pridelka PCR je vsebovala 2 μ l 5x sekvenčnega pufra (5x Sequencing Buffer), 4 μ l BigDye® Terminator v1.1, 1,3 μ l levega oziroma desnega začetnega oligonukleotida (2,46 pmol/ μ l), 10 ng očiščenega pridelka PCR in deonizirano vodo do 20 μ l 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) 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 μ l na sobno temperaturo ogrete denaturacijske raztopine Template Supresion Reagent (TSR) ali Hi-DiTM Formamide

(Applied BioSystems) 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 BioSystems). Po končanem delu računalniški program Sequencing Analysis, ki je povezan z aparaturo ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, avtomatsko obdela zbrane podatke v obliko elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

3.2.3.3 Analiza nukleotidnih zaporedij in določanje podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31

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-31 sestavili smiselno (angl. *sense*) E7 nukleotidno zaporedje in ga uporabili za določitev podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31.

Kot novo različico gena E7 genotipa HPV-31 smo opredelili vsak izolat HPV-31, ki se je od referenčnega izolata HPV-31 (J04353) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v celotnem E7 ORF. Poravnavo pridobljenih nukleotidnih zaporedij gena E7 izolata HPV-31 z zaporedjem E7 ORF referenčnega izolata in določanje značilnih mutacij smo izvedli z uporabo računalniških programov Clustal X (ver. 1.83) in BioEdit Sequence Alignment Editor.

3.2.4 Filogenetska analiza podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31

S pomočjo Phylip programskega paketa (ver. 3.66) smo izrisali filogenetsko drevo z metodo UPGMA (angl. *unweighted pair-group method with arithmetic mean*), kjer smo vključili vse dotedaj znane različice gena E7 genotipa HPV-31 in z metodo najbližjega soseda (angl. *neighbour-joining*), kjer smo vključili samo izolate, ki so med seboj različni. Pri risanju filogenetskega drevesa smo vedno vključili tudi referenčni izolat HPV-31

(J04353). S programom Treeview (ver. 1.6.6) (Glasgow University, ZDA) smo pridobili slike filogenetskih dreves.

4 REZULTATI

4.1 RAZPOREDITEV IZOLATOV HPV-31 GLEDE NA RAZLIČNE STOPNJE INTRAEPITELIJSKIH NEOPLAZIJ IN RAKA MATERNIČNEGA VRATU

V nalogo smo vključili 17 izolatov predhodno opredeljenega genotipa HPV-31 osamljenih pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij (CIN I - CIN III) in rakom materničnega vratu.

Izolate HPV-31 slovenskih žensk smo razvrstili v posamezne skupine glede na opredelitev sprememb ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu.

6 izolatov HPV-31 je bilo izoliranih pri ženskah s spremembami ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu opredeljenih po klasifikaciji po Papanicolaou. 1 izolat HPV-31 je bil opredeljen pri ženski s PAP 1, 4 izolati HPV-31 so bili opredeljeni pri ženskah s PAP 2 in 1 izolat HPV-31 pri ženski s PAP 2-3.

11 izolatov HPV-31 je bilo izoliranih pri slovenskih ženskah s spremembami ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu opredeljenih po klasifikaciji po CIN. Pri tem sta bila 2 izolata HPV-31 opredeljena pri ženskah s CIN I, 2 izolata HPV-31 pri ženskah s CIN III in 7 izolatov HPV-31 pri ženskah s karcinomom materničnega vratu.

Preglednica 3 prikazuje razvrstitev izolatov HPV-31 glede na opredelitev sprememb ploščatoceličnega epitelija po klasifikaciji po Papanicolaou in po klasifikaciji po CIN pri slovenskih ženskah.

Preglednica 3: Razvrstitev 17 izolatov HPV-31 glede na opredelitev sprememb ploščatoceličnega epitelija po klasifikaciji po Papanicolaou in po klasifikaciji po CIN osamljenih pri slovenskih ženskah

Diagnoza	Število izolatov
PAP 1	1
PAP 2	4
PAP2-3	1
CIN I	2
CIN III	2
karcinom	7
Skupaj	17

4.2. DOLOČANJE PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31

Za pomnoževanje gena E7 DNA genotipa HPV-31 smo uporabili za genotip HPV-31 značilna začetna oligonukleotida E731S in E731R, ki pomnožujeta 542 bp velik del gena E7. Sledila je sekvenčna analiza oziroma določanje nukleotidnega zaporedja ter določanje značilnih mutacij. Kot novo različico gena E7 genotipa HPV-31 smo opredelili vsak izolat HPV-31, ki se je od referenčnega izolata HPV-31 (J04353) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v celotnem E7 ORF.

Med 17 izolati HPV-31 slovenskih žensk smo našli le dve različici gena E7. Različica 31-E7-1-SI je bila 1 (5,9 %), medtem ko smo našli 16 različic 31-E7-2-SI (94,1 %). Referenčnega izolata (31-E7ref) med 17 izolati slovenskih žensk nismo našli.

Obe različici sta vsebovali po 4 točkaste mutacije v primerjavi z referenčnim izolatom HPV-31 (0,7 % E7 ORF). Pri različici 31-E7-1-SI so nukleotidne mutacije povzročile spremembo v 3 aminokislinah (1,7 % E7 proteina), medtem ko pri različici 31-E7-2-SI v 2 aminokislinah (1,1 % E7 proteina). Polimorfizem gena E7 slovenskih izolatov HPV-31 prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Različice gena E7 17 slovenskih izolatov HPV-31 s spremembami v aminokislinskem zaporedju v primerjavi z referenčnim izolatom: ak kratica označuje aminokislino. Mesto, kjer ni prisotna mutacija v primerjavi z referenčnim izolatom je osenčeno, medtem ko črka predstavlja mutirano bazo. Frekvenca označuje število izolatov za posamezno različico

E7 lege na mestu genoma:						
E7 različice	5	6	6	6	7	Frekvenca
	8	2	7	9	4	
	0	6	0	5	3	
referenca	g	c	c	g	a	
mutacija	a	t	t	a	g	
31-E7ref	G	C	C	G	A	0
31-E7-1-SI		T	T	A	G	1
31-E7-2-SI	A		T	A	G	16
Mesto kodona	7	23	37	46	62	
Prototipska AK	T	H	V	E	K	
Mutirana AK	T	Y	V	K	E	

4.3 RAZPOREDITEV RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31 GLEDE NA RAZLIČNE STOPNJE INTRAEPITELIJSKIH NEOPLAZIJ IN RAKA MATERNIČNEGA VRATU

Preglednica 5 prikazuje različici gena E7 genotipa HPV-31 slovenskih žensk v povezavi z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij (CIN I-CIN III) in rakom materničnega vratu. Različica 31-E7-1-SI izolata HPV-31 je bila določena pri slovenski ženski s CIN I, medtem ko različica 31-E7-2-SI izolata HPV-31 pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij in rakom materničnega vratu.

Preglednica 5: Različice gena E7 genotipa HPV-31 pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij in rakom materničnega vratu

Diagnoza	Različice gena E7 genotipa HPV-31	
	31-E7-1-SI (n)	31-E7-2-SI (n)
PAP 1	1	0
PAP 2	4	0
PAP 2-3	1	0
CIN I	1	1
CIN III	2	0
Karcinom	7	0
Skupaj	16	1

4.4 FILOGENETSKA ANALIZA PODTIPSKIH RAZLIČIC GENA E7 GENOTIPA HPV-31

Z metodo UPGMA smo izrisali filogenetsko drevo, kjer smo vključili 17 slovenskih in 41 kanadskih (Gagnon in sod., 2005) različic genov E7 genotipa HPV-31 (slika 3). Kot je razvidno iz slike so različice gena E7 genotipa HPV-31 slovenskega in kanadskega izvora razvrščene v tri genetske družine (genetske družine A, B in C).

V prvo genetsko družino (družina A) uvrščamo prototipske različice (31-E7ref-1 do 31-E7ref-9) (genetska poddružina A1) in njim sorodne različice (31-E7-4) (genetska poddružina A2).

V drugo genetsko družino (družina B, genetska poddružina B1) je uvrščenih 16 slovenskih različic 31-E7-2-SI (94,1 %) ki so identične 18 kanadskim različicam 31-E7-2. V družino B uvrščamo tudi kanadske različice 31-E7-3 (genetska poddružina B2), 31-E7-5 (genetska poddružina B3) in 31-E7-7 (genetska poddružina B4). Celotna genetska družina B naj bi predstavljala različice Afriškega izvora.

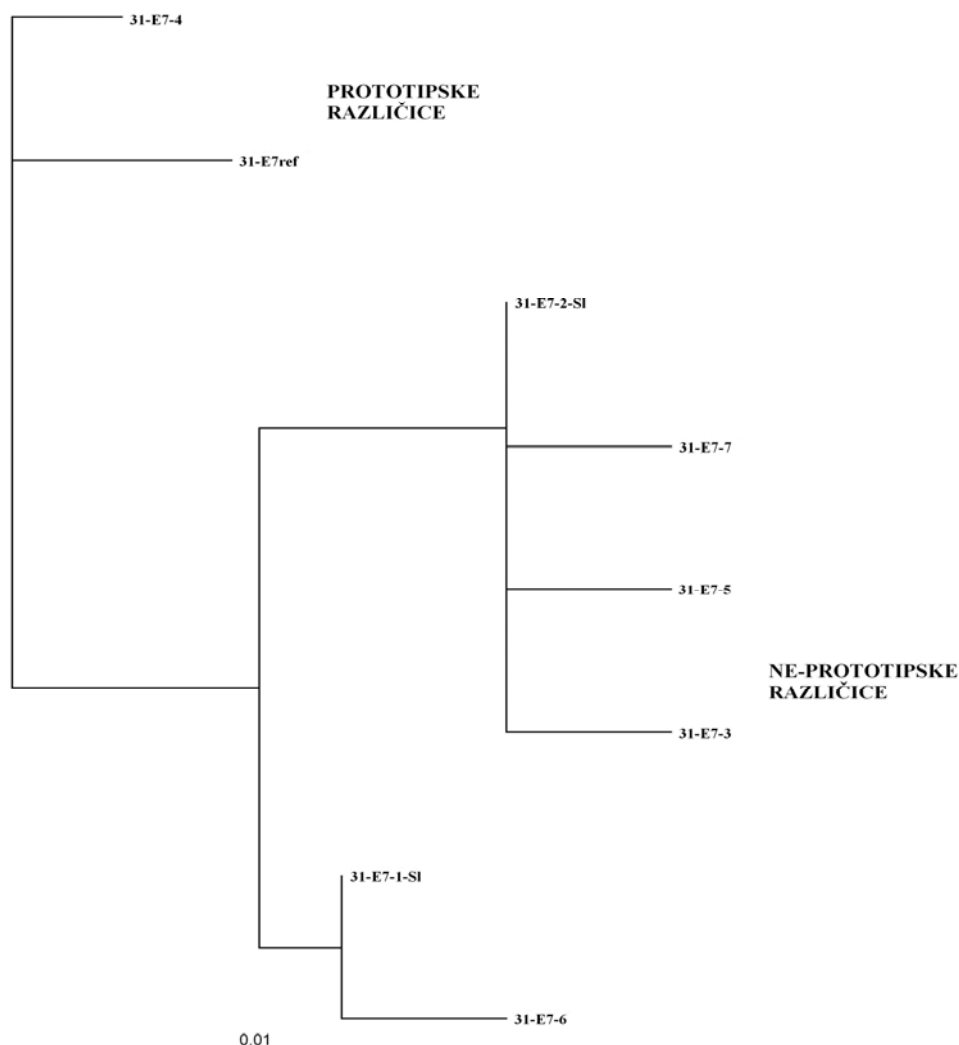
V tretjo genetsko družino (družina C) je uvrščenih 9 kanadskih različic 31-E7-1 skupaj z identično slovensko različico 31-E7-1-SI (5,9 %) (genetska poddružina C1). V genetsko poddružino C2 iste družine spada tudi ena kanadska različica 31-E7-6.

Genetski družini B in C predstavljata ne-prototipske različice gena E7 genotipa HPV-31.

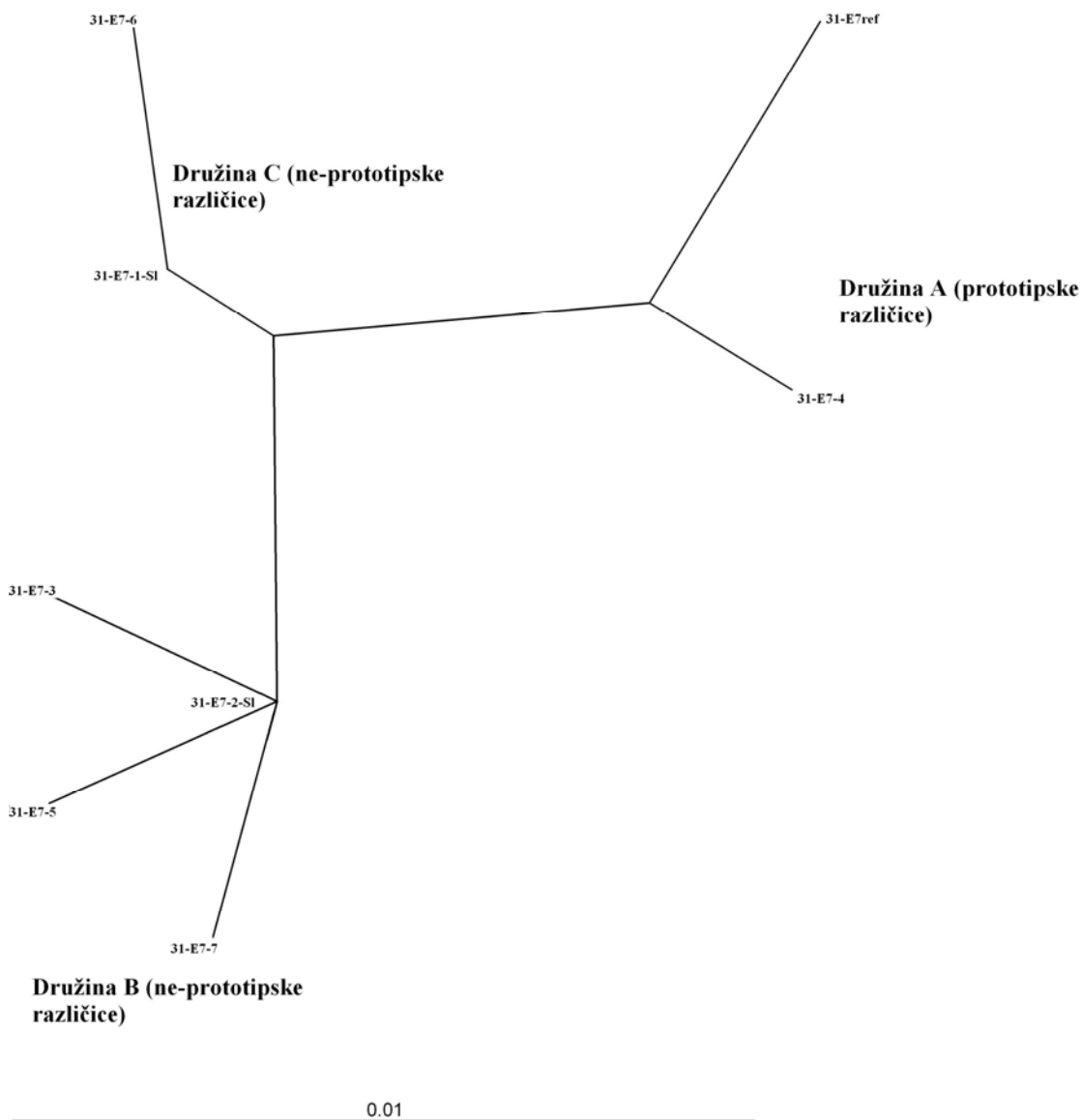


Slika 3. Z UPGMA metodo izrisano filogenetsko drevo 17 slovenskih različic gena E7 genotipa HPV-31 (31-E7-1-SI in 31-E7-2-SI-1 do 31-E7-2-SI-16) in 41 kanadskih različic gena E7 genotipa HPV-31 (31-E7ref-1 do 31-E7ref-9; 31-E7-1-1 do 31-E7-1-9; 31-E7-2-1 do 31-E7-2-18; 31-E7-3 do 31-E7-7)

Filogenetsko drevo smo izrisali tudi z metodo najbližjega soseda (sliki 4 in 5), kjer smo vključili le izolate HPV-31, ki so med seboj različni. Iz slik je razvidna razvrstitev različic gena E7 genotipa HPV-31 v tri genetske družine. V družino A so bile razvrščene prototipske različice (31-E7-4 in 31-E7ref), v družino B (31-E7-2-SI, 31-E7-3, 31-E7-5 in 31-E7-7) in družino C (31-E7-1-SI in 31-E7-6) so bile razvrščene ne-prototipske različice. Kanadskih različic 31-E7-1 in 31-E7-2 zaradi enakosti s slovenskimi različicami 31-E7-1-SI in 31-E7-2-SI v izris filogenetskega drevesa nismo vključili.



Slika 4. Z metodo najbližjega soseda izrisan filogram 8 različic gena E7 genotipa HPV-31 slovenskih (31-E7-1-SI in 31-E7-2-SI) in kanadskih žensk (31-E7ref, 31-E7-3, 31-E7-4, 31-E7-5, 31-E7-6 in 31-E7-7)



Slika 5. Z metodo najbližjega soseda izrisano zvezdasto filogenetsko drevo 8 različic gena E7 genotipa HPV-31 slovenskih (31-E7-1-SI in 31-E7-2-SI) in kanadskih žensk (31-E7ref, 31-E7-3, 31-E7-4, 31-E7-5, 31-E7-6 in 31-E7-7)

Preglednica 6 prikazuje vse po podatkih iz literature znane različice gena E7 genotipa HPV-31 in različice gena E7 17 slovenskih izolatov HPV-31, ki so razvrščene v prototipske različice (genetska družina A) in ne-prototipske različice (genetski družini B in C).

Preglednica 6: Filogenetska razvrstitev različic gena E7 17 slovenskih in 41 kanadskih izolatov HPV-31

Genetska družina	Genetska poddružina	E7 različica	Frekvenca
(A) prototipskim podobne različice	A1	31-E7ref	9
	A2	31-E7-4	1
(B) ne-prototipske različice	B1	31-E7-2	34
	B2	31-E7-3	1
	B3	31-E7-5	1
	B4	31-E7-7	1
(C) ne-prototipske različice	C1	31-E7-6	1
	C2	31-E7-1	10

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvod

HPV so izjemno heterogena skupina majhnih DNA virusov, ki jih razvrščamo v različne virusne genotipe na osnovi skladnosti nukleotidnih zaporedij. Do danes je popolnoma opredeljenih že več kot 45 anogenitalnih genotipov HPV, ki jih glede na zmožnost povzročanja benignih oziroma (pre)malignih sprememb ploščatoceličnega epitela delimo na nizkorizične (HPV-6, 11, 40, 42, 43 in 44) in visokorizične (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 in 83) genotipe HPV (Muñoz in sod., 2003). Dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV in izražanje virusnih onkogenov E6 in E7 sta poglavitna etiološka dejavnika za nastanek RMV.

Med poglavitne povzročitelje RMV, poleg HPV-16, uvrščamo tudi visokorizični genotip HPV-31, ki ga po pogostosti pri ženskah z RMV v svetovnem merilu uvrščamo na četrto mesto za genotipi HPV-16, 18 in 45 (Tornesello in sod., 2004).

Z določanjem in primerjavo nukleotidnih zaporedij genov L1, L2, E6, E7 in področja LCR genotipa HPV-16 so ugotovili, da sestoji iz različic, ki so jih na podlagi filogenetskih analiz razdelili v evropske in ne-evropske različice. Okužba s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz ne-evropskih vej naj bi predstavljala povečano tveganje za nastanek RMV.

V raziskavi Gagnona in sodelavcev so ugotovili, da genotip HPV-31 prav tako sestoji iz podtipskih različic oziroma, da se posamezni izolati genotipa HPV-31 razlikujejo v nukleotidnem zaporedju virusnih onkogenov E6 in E7 (Gagnon in sod., 2005).

5.1.2 Analiza rezultatov

V raziskavi, ki je po podatkih iz literature druga raziskava genetskih različic gena E7 genotipa HPV-31 smo za molekularno opredelitev podtipskih različic gena E7 slovenskih izolatov pomnožili 542 bp velik del gena E7 HPV-31.

Pridelkom PCR smo določili nukleotidno zaporedje in tako določili podtipske različice gena E7 genotipa HPV-31.

Kot novo različico gena E7 genotipa HPV-31 smo opredelili vsak izolat HPV-31, ki se je od referenčnega izolata HPV-31 (J04353) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v celotnem E7 ORF.

Pričakovali smo, da bomo večino različic gena E7 slovenskih izolatov HPV-31 uvrstili med že predhodno opisane podtipske skupine tega genotipa.

Z analizo gena E7 slovenskih izolatov HPV-31 smo domnevo tudi potrdili. Prisotno je bilo majhno število točkastih mutacij, saj je za gen E7 HPV značilna manjša variabilnost kot za področje LCR. Insercij ali delecij v genu E7 genotipa HPV-31 nismo našli.

Obstoj novih, še ne opisanih podtipskih različic genotipa HPV-31 med slovenskimi izolati nismo uspeli dokazati. Verjetno bi bila potrebna še analiza gena E6 in področja LCR oziroma analiza večjega števila izolatov HPV-31.

Ugotovili smo, da so naši rezultati glede prisotnosti določenih podtipskih različic gena E7 HPV-31 primerljivi z rezultati do sedaj edine raziskave, kjer so bile molekularno opredeljene podtipske različice gena E7 genotipa HPV-31.

Prisotnih je bilo namreč največ različic 31-E7-2, in najmanj 31-E7-1 gena E7 slovenskih izolatov HPV-31, kar je primerljivo s študijo Gagnona in sodelavcev. V omenjeni raziskavi pa je bilo najdeno tudi večje število prototipskih različic gena E7, medtem ko pri slovenskih izolatih HPV-31 nismo uspeli dokazati obstoj prototipskih različic. Ženske bele rase naj bi bile namreč pogosteje okužene s prototipskimi različicami HPV-31. Sklepamo, da je do razlik lahko prišlo zaradi manjšega raziskanega števila slovenskih izolatov HPV-31.

Prav tako ne moremo povezati posamezne različice s povečanim tveganjem za nastanek RMV, kot je bilo v predhodnih raziskavah tudi ugotovljeno.

Pri slovenski različici 31-E7-1 so nukleotidne mutacije povzročile spremembo v 3 aminokislinah (1,7% E7 proteina). Sprememba aminokislina na nukleotidnem mestu 626 bi

lahko povzročila tudi spremembo v funkciji proteina, saj se to mesto nahaja na domnevni vezavni regiji z retinoblastoma proteinom (Gagnon in sod., 2005).

Pri slovenski različici 31-E7-2 so nukleotidne mutacije povzročile spremembo v 2 aminokislinah (1,1 % E7 proteina).

Gagnon s sodelavci je v svoji študiji skušal dokazati etnografsko specifičnost posameznih podtipskih različic gena E7 genotipa HPV-31. Tako je ne-prototipsko različico 31-E7-2 uvrstil k različicam afriškega izvora. Ob tem je poudaril, da bi bilo potrebnih več študij, ki bi raziskale podtypeske različice HPV-31 pri ženskah afriškega izvora, da bi njegovo domnevo potrdile.

Pri slovenskih izolatih najpogosteje najdene različice 31-E7-2 zaradi geografske lege najverjetneje ne moremo uvrstiti k različicam afriškega izvora. Z nadaljnjimi raziskavami, ki bi zajele večje število izolatov HPV-31 bi to domnevo lahko potrdili.

Z izrisom filogenetskih dreves, kjer smo vključili 17 slovenskih in 41 kanadskih (Gagnon in sod., 2005) različic genov E7 genotipa HPV-31 je dobro vidna razvrstitev različic gena E7 genotipa HPV-31 v tri genetske družine.

V genetsko družino A so bile razvrščene prototipske različice. V genetski družini B in C pa ne-prototipske različice, kamor uvrščamo tudi slovenske izolate HPV-31.

5.2 SKLEPI

- V naši raziskavi, ki je zajela 17 slovenskih izolatov predhodno opredeljenega genotipa HPV-31 iz arhivske zbirke, smo uspešno dokazali prisotnost dveh različic gena E7 genotipa HPV-31.
- Pri slovenskih izolatih je bila pogosteje najdena različica 31-E7-2 gena E7 genotipa HPV-31 v primerjavi z različico 31-E7-1, kar je primerljivo s podatki iz literature. Različice 31-E7-2 zaradi geografske lege najverjetneje ne moremo uvrstiti k različicam afriškega izvora. Z nadaljnjimi raziskavami, ki bi zajele večje število izolatov HPV-31 bi to domnevo lahko potrdili.
- V naši raziskavi smo potrdili polimorfizem E7 gena genotipa HPV-31. Da bomo bolje razumeli molekularno epidemiologijo HPV okužbe in molekularni pomen napredovanja intraepitelijskih neoplazij v RMV bodo potrebne nadaljnje raziskave polimorfizma ostalih genotipov HPV poleg HPV-16 in HPV-18.

6 POVZETEK

Rak materničnega vratu je predvsem v razvitih državah, za rakom dojk še vedno drugi najpogostejši rak pri ženskah. Poglavitni etiološki dejavnik za razvoj RMV je dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV in izražanje virusnih onkogenov E6 in E7. Na osnovi raziskovanja genoma genotipa HPV-16 številni raziskovalci poročajo, da je za nastanek cervikalne intraepitelijske neoplazije pomembna dolgotrajna okužba s specifično gensko različico visokorizičnega genotipa HPV. Z določanjem in primerjavo nukleotidnih zaporedij genov L1, L2, E6, E7 in področja LCR genotipa HPV-16 so ugotovili, da sestoji iz različic, ki so jih na podlagi filogenetskih analiz razdelili na evropske in ne-evropske različice. Okužba s podtipskimi različicami genotipa HPV-16 iz ne-evropskih vej naj bi predstavljala povečano tveganje za nastanek RMV.

Med poglavitne povzročitelje RMV, poleg HPV-16, uvrščamo tudi visokorizični genotip HPV-31, ki ga po pogostosti pri ženskah z RMV v svetovnem merilu uvrščamo na četrto mesto za genotipi HPV-16, HPV-18 in HPV-45.

V raziskavi Gagnona in sodelavcev so ugotovili, da genotip HPV-31 prav tako sestoji iz podtipskih različic.

V ta namen smo v diplomski nalogi želeli opredeliti podtipske različice gena E7 slovenskih izolatov HPV-31, in jih na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij uvrstiti v obstoječe filogenetske skupine. V nalogi smo vključili 17 izolatov predhodno opredeljenega genotipa HPV-31 iz arhivske zbirke laboratorija, osamljenih pri slovenskih ženskah z različnimi stopnjami intraepitelijskih neoplazij (CIN I - CIN III) in rakom materničnega vratu. Za molekularno opredelitev podtipskih različic gena E7 slovenskih izolatov smo pomnožili 542 bp velik del gena E7 HPV-31. Pridelke PCR smo očistili s komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) in jim določili nukleotidno zaporedje s komercialno dostopnim kompletom BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekvenčna analiza oziroma določanje nukleotidnega zaporedja je bila izvedena na aparaturi za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystems). Pridobljeno nukleotidno zaporedje iz elektroferograma smo analizirali in obdelali z uporabo računalniškega programa BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State

University, ZDA). Kot novo različico gena E7 genotipa HPV-31 smo opredelili vsak izolat HPV-31, ki se je od referenčnega izolata HPV-31 (J04353) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v celotnem E7 ORF. Med 17 izolati HPV-31 slovenskih žensk smo našli le dve različici gena E7. Različica 31-E7-1-S1 je bila 1 (5,9 %), medtem ko smo našli 16 različic 31-E7-2-S1 (94,1 %). Obe različici sta vsebovali po 4 točkaste mutacije v primerjavi z referenčnim izolatom HPV-31 (0,7 % E7 ORF). Pri različici 31-E7-1-S1, so nukleotidne mutacije povzročile spremembo v 3 aminokislinah (1,7 % E7 proteina), medtem ko pri različici 31-E7-2-S1 v 2 aminokislinah (1,1 % E7 proteina).

S pomočjo Phylip programskega paketa (ver. 3.66) smo izrisali filogenetsko drevo z metodo UPGMA, kjer smo vključili vse dotodaj znane različice gena E7 genotipa HPV-31 in z metodo najbližjega soseda, kjer smo vključili samo izolate, ki so med seboj različni. Različice gena E7 genotipa HPV-31 slovenskega in kanadskega izvora so bile razvrščene v tri genetske družine (genetske družine A, B in C). V družino A so bile razvrščene prototipske različice, v družini B in C so bile razvrščene ne-prototipske različice.

Ugotovili smo, da so naši rezultati glede prisotnosti določenih podtipskih različic gena E7 HPV-31 primerljivi z rezultati do sedaj edine raziskave, kjer so bile molekularno opredeljene prototipske različice gena E7 genotipa HPV-31.

V študiji Gagnona in sodelavcev je bilo najdeno tudi večje število prototipskih različic gena E7, medtem ko pri slovenskih izolatih HPV-31 nismo uspeli dokazati obstoj prototipskih različic. Ženske bele rase naj bi bile namreč pogosteje okužene s prototipskimi različicami HPV-31. Sklepamo, da je do razlik lahko prišlo zaradi manjšega raziskanega števila slovenskih izolatov HPV-31.

Obstoj novih, še ne opisanih podtipskih različic genotipa HPV-31 med slovenskimi izolati nismo uspeli dokazati. Prav tako ne moremo povezati posamezne različice s povečanim tveganjem za nastanek RMV, kot je bilo v predhodnih raziskavah tudi ugotovljeno.

Pri slovenskih izolatih najpogosteje najdene različice 31-E7-2, ki naj bi bila uvrščena k afriškim različicam zaradi geografske lege najverjetneje ne moremo uvrstiti k različicam afriškega izvora. Z nadaljnjimi raziskavami, ki bi zajele večje število izolatov HPV-31 bi to domnevo lahko potrdili.

7 VIRI

- Adams V., Kempf W., Hassam 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: 189-193
- Autillo-Toutai A., Joannes M., d'Ercole C., Robaglia-Schlupp A., Lambert A., Mazzella 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., Kodstaal J., Hollema H., Duk J.M., Burger M.P., 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
- Berkhout R.J., Tieben L.M., Smits H.L., Bavnic 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
- Bernard H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32S: S1-S6
- 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 polymorphism, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170: 1077-1085

- Berumen J., Ordonez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galvan S.C., Estrada R.A., Yunes E., Garcia-Carranca A., Gonzales-Lira G., Madrigal-de la Campa A. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk of cervical cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1325-1330
- Bible J.M., Mant C., Best J.M., Kell B., Starkey W.G., Shanti Raju K., Seed P., Biswas C., Muir P., Banatvala J.E., Cason J. 2000. Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. *Journal of General Virology*, 81: 1517-1527
- 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., Rohan T., Schneider A., Fraizer I., Pfister H. ET AL. 2001. Papilloma research update: highlights of the barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 163-175
- 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
- Calleja-Macias I.E., Villa L.L., Prado J.C., Kalantari M., Allan B., Williamson A.L., Chung L.P., Collins R.J., Zuna R.E., Dunn S.T., Chu T.Y., Cubie H.A., Cushieri K., von Knebel-Doeberitz M., Martins C.R., Sanchez G.I., Bosch F.X., Munoz N., Bernard H.U. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 79, 21: 13630-13640

Chiang C.M., Dong G., Broker T.R., Chow L.T. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *Journal of Virology*, 66: 5224-5231

Coggin J.R. Jr., zur Hausen H. 1979. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Research*, 39: 545-546

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., Voyer H., Canadian Womens HIV study group. 1999. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1852-1857

Clavel C., Masure M., Levert M., Putaud I., Mangeonjean C., Lorenzato M., Nazeyrollas P., Gabriel R., Quereux C., Birembaut P. 2000. Human papillomavirus detection by Hybrid Capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagnostic Molecular Pathology*, 9,3: 145-150

Crum C.P. 1994. Genital papillomaviruses and related neoplasms: causation, diagnosis and classification (Bethesda). *Modern Pathology*, 7, 1: 138-145

Dalstein V., Riethmuller D., Pretet J.L., Le Bail Carval K., Sautiere J.L., Carbillet J.P., Kantelip B., Schaal J.P., Mougin C. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *International Journal of Cancer*, 106: 396-403

- 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. 2001. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 12: 57-64
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541
- 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
- Ferenczy A., Franco E. 2003. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology*, 3: 11-16
- Franco E.L., Villa L.L., Rahal P., Ruiz A. 1994. Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 86: 1558-1559
- 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

- Gagnon S., Hankins C., Tremblay C., Pourreaux K., Forest P., Rouah F., Coutlee F. 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *Journal of Medical Virology*, 75, 213-221
- Goldsborough M.D., DiSilvestre D., Temple G.F., Lorincz A.T. 1989. Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus. *Virology*, 171,1: 306-311
- Gravitt P.E., Peyton C.L., Apple R.J., Wheeler C.M. 1998. Genotyping of 27 human papillomatypes by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3020-3027
- Gree M., Husnjak K., Božikov J., Magdić L., Zlački M., Lukač J., Fistončić I., Šikanić-Dugic N., Pavelić K. 2001. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Research*, 21: 579-584
- 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
- Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., Rodriguez A., Bratti M.C., Sherman M.E., Scarpidis U., Lin Q.Q., Terai M., Bromley R.L., Buetow K., Apple R.J., Burk R.D. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 315-318
- Kammer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C.M., Pfister H. 2000. sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *Journal of General Virology*, 81: 1975-1981

- Kleter B., van Doorn L.J., Schrauwen L., Molijn A., Sastrowijoto S., ter Schegget J., Lindeman J., ter Harmsel B., Quint W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2508-2517
- Kleter B., van Doorn L.J., ter Schegget J., van Krimpen C., Burger M.P., ter Harmsel B., Quint W.G.V. 1998. A novel short fragment PCR assay for highly sensitive broadspectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *American Journal of Pathology*, 153: 1731-1739
- Koss L.G. 1987. Current concepts of intraepithelial neoplasia in the eutrine cervix. *Applied Pathology*, 5: 7-18
- Kuo S.R., Liu J.S., Broker T.R., Chow L.T. 1994. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 24058-24065
- Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjänen K., Syrjänen S. 2000. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *European Journal of Cancer*, 36: 1402-1410
- Lazo P.A. 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *British Journal of Cancer*, 80: 2008-2018
- Londesborough P., Ho L., Terry G., Cuzick J., Wheeler C., Singer A. 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *International Journal of Cancer*, 69: 364-368

- Lorincz A.T., Lancaster W.D., Temple G.F. 1986. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *Journal of Virology*, 58, 1: 225-229
- 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
- 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., Gravitt P.E. 1993. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Laboratory Animal Science*, 43, 1: 5-10
- 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
- Marin I. 2001. Razporeditev genotipov humanih virusov papiloma pri ženskah v Sloveniji. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 105 str.
- Matsumoto K., Yoshikawa H., Nakagawa S., Tang X., Kawana K., Sekiya S., Hirai Y., Kukimoto I., Kanda T., Taketani Y. 2000. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Letters*, 156: 159-165
- McGlennen. 2000. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 20: 383-405

- Morrison E.A.B. 1994. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clinical Infectious Diseases*, 18: 172-180
- Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellasagué 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
- Nanda K., McCrory D.C., Myers E.R., Bastian L.A., Hasselblad V., Hickey J.D., Matchar D.B. 2000. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 132, 10: 810-819
- Nindl I., Rindfleisch K., Lotz B., Schneider A., Durst M. 1999. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patient with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 82: 203-207
- 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
- Papanicolaou G.N. 1948. A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Annals of Medicine*, 30:661-674
- Patten S.F. 1996. Dysplasia of the uterine cervix. V: New concepts in gynecological oncology. Lewis G.C. Jr, Wentz E.B., Jaffe R.M. (eds.). Philadelphia, F.A. Davis: 33-44

- Pfister H., Fuchs P.G. 1994. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*, 37: 143-149
- Poljak M. 1998. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- 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., Brenčič A., Seme K., Vince A., Marin I.J. 1999. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 796-797
- Poljak M., Ferluga D., Gale N., Petrovec M. 1993. Molekularna diagnostika okužbe s humanim virusom papiloma (HPV) v patologiji. *Zdravniški vestnik*, 62: 105-109
- Poljak M., Kocjan B.J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 2: 60-72
- Poljak M., 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 cocatil. *Journal of Clinical Virology*, 25: S89-S97
- Poljak M., Seme K. 1996. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 56: 231-238
- Poljak M., Seme K., Gale N. 1998. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 5: 216-234

Poljak M., 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

Rady P.L., Arany I., Hughes T.K., Tying 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

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

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

Richart R.M. 1973. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology Annual*, 8: 301-328

Rodu B., Christian C., Synder R.C., Ray R., Miller D.M. 1991. Simplified PCR-based detection and typing strategy for huma papillomaviruses utilizing a single oligonucleotide primer set. *Biotechniques*, 10: 632-637

Schneider A. 1994. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirolgy*, 37: 201-214

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

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

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. Advances in cervical screening technology. *Modern Pathology*, 13, 3: 275-284

Stoler M.H. 2000. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology*, 19, 1: 16-28

Stoppler H., Stoppler M.C., Schlegel R. 1994. Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirolgy*, 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, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 90: 335-339

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
- Tornesello M.L., Buonaguro F.M., Buonaguro L., Salatiello I., Beth-Giraldo E., Giraldo G. 2000. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *Journal of General Virology*, 81: 2969-2982
- Tornesello M.L., Duraturo M.L., Salatiello I., Buonaguro L., Losito S., Botti G., Stellato G. 2004. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 74: 117-126
- 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., Gordijan 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 Duin M., Snijders P.J., Vossen M.T., Klaassen E., Voorhorst F., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J., Walboomers J.M. 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology*, 81: 317-325

- van Ranst M.A., Tachezy R., Delius H., Burk R.D. 1993. Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Research*, 4: 61-65
- Veress G., Szarka K., Dong X.P., Gergely L., Pfister H. 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology*, 80: 1035-1043
- Villa L.L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T., Franco E.L. 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervicla neoplasia. *Journal of General Virology*, 81: 2959-2968
- Vizcaino A.P., Moreno V., Bosch F.X., Muñoz N., Barros-Dios X.M., Borrás J., Parkin D.M. 2000. International trends in incidence of cervical cancer: II Squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 86, 3: 429-435
- Vousden K. 1993. Infections 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

Xi L.F., Koutsky L.A., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Wheeler C.M., Holmes K.K., Kiviat N.B. 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 796-802

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

Zehbe I., Voglino G., Delius H., Wilander E., Tommasino M. 1998. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 352: 1441-1442

zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288: F55-F78

zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human warts virus. *International Journal of Cancer*, 13, 5: 650-656

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.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Robiju, Kristini, Dunji in Tini, predvsem pa Boštjanu, za mnoge nasvete, pomoč in dragocene urice prostega časa, ki jih je žrtvoval zame.

Hvala Martinu za vso pomoč, podporo, potrpežljivost, razumevanje in vzpodbudne besede.

Predvsem pa se zahvaljujem staršem. Hvala, ker ste bili potrpežljivi, me razumeli, vzpodbujali in mi stali ob strani takrat ko sem to rabila.