

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lea HOŠNJAK

**DOKAZOVANJE OKUŽB S ČLOVEŠKIMI
PAPILOMAVIRUSI V ARHIVSKIH TKIVNIH
VZORCIH PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA
USTNE VOTLINE IN USTNEGA DELA ŽRELA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lea HOŠNJAK

**DOKAZOVANJE OKUŽB S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI V
ARHIVSKIH TKIVNIH VZORCIH PLOŠČATOCELIČNEGA
KARCINOMA USTNE VOTLINE IN USTNEGA DELA ŽRELA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN
ARCHIVAL TISSUE SPECIMENS OF ORAL AND
OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

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

Po sklepu študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije, z dne 23. 9. 2011, ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Mario Poljak, dr. med., za somentorja razisk. asist. dr. Boštjan Kocjan, univ. dipl. mikrobiol. in za recenzentko prof. dr. Katja Seme, dr. med.

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

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

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

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Lea Hošnjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7 : 616-006.5 : 577.2.083 (043) = 163.6
- KG virusi/človeški papilomavirusi/HPV16/karcinogeneza/ploščatocelični karcinom/
ustna votlina/ustni del žrela/diagnostične metode/molekularne tehnike/PCR/
sekveniranje
- AV HOŠNJAK, Lea
- SA POLJAK, Mario (mentor)/ KOCJAN, Boštjan (somentor)/ SEME, Katja
(recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2012
- IN DOKAZOVANJE OKUŽB S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI V ARHIVSKIH
TKIVNIH VZORCIH PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA USTNE
VOTLINE IN USTNEGA DELA ŽRELA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 80 str., 13 pregl., 6 sl., 1 pril., 126 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Okužba z visokorizičnimi genotipi človeških papilomavirusov (HR-HPV), predvsem HPV16 in HPV18, je tesno povezana z nastankom malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela v anogenitalnem predelu. HR-HPV se kot eden od možnih etioloških dejavnikov omenjajo tudi v povezavi z nastankom raka ustne votline in ustnega dela žrela. Prevalenca okužbe s HPV v teh novotvorbah se v doslej objavljenih raziskavah močno razlikuje. V naši raziskavi smo z različnimi metodami za dokazovanje in genotipizacijo HPV-DNA želeli določiti prevalenco okužbe s HPV v arhivskih (iz let 2005-2007) tkivnih vzorcih ploščatoceličnega karcinoma ustne votline in ustnega dela žrela (PCK-UV/-UŽ) ter z dokazovanjem izražanja mRNA HPV16 E7 in celične beljakovine p16 ugotoviti, katere HPV-DNA pozitivne tumorje dejansko povzročajo HPV. Z uporabo GP5+/6+/68 PCR v kombinaciji s sekveniranjem, Abbott RealTime High Risk HPV testa in HPV16 PCR v realnem času smo HPV-DNA (HPV16) dokazali v 5/47 (10,6 %) primerih raka. Na podlagi rezultatov dodatnih metod, določanja izražanja mRNA HPV16 E7 in p16 sklepamo, da ima okužba s HPV pomembno vlogo pri nastanku 3/47 (6,4 %) PCK-UV/-UŽ naših bolnikov. Naše rezultate smo primerjali z rezultati predhodno objavljene raziskave v Sloveniji in ugotovili, da incidenca HPV-pozitivnih PCK-UV/-UŽ pri nas ne narašča. Glede na zelo nizko prevalenco HPV-DNA v naših vzorcih PCK-UV/-UŽ menimo, da imata pri nas glavno vlogo pri razvoju PCK omenjenih predelov kajenje in uživanje alkohola.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7 : 616-006.5 : 577.2.083 (043) = 163.6
- CX viruses/human papillomaviruses/HPV16/carcinogenesis/squamous cell carcinoma/
oral cavity/oropharynx/diagnostics/molecular techniques/PCR/sequencing
- AU HOŠNJAK, Lea
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/ KOCJAN, Boštjan (co-advisor)/ SEME, Katja
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2012
- TI DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN ARCHIVAL
TISSUE SPECIMENS OF ORAL AND OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL
CARCINOMAS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 80 p., 13 tab., 10 fig., 1 ann., 91 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB There is a strong causal relationship between persistent infection with high-risk human papillomaviruses (HR-HPV), especially HPV16 and HPV18, and the development of squamous cell carcinomas (SCC) in the anogenital region. Moreover, HR-HPVs represent a possible risk factor in the etiology of oral and oropharyngeal SCC (OSCC/OPSCC). The reported prevalence of HPV-DNA in OSCC/OPSCC differs significantly. The aim of the present study was to investigate further the putative etiologic role of HPV in OSCC/OPSCC by determining the prevalence of HPV infections in archival (diagnosed between 2005-2007) formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of cancers. In addition, using methods for determination of expression of mRNA HPV16 E7 and cellular protein p16, to determine which HPV-positive carcinomas are actually caused by HPV. Using GP5+/6+/68 PCR in combination with sequencing, Abbott RealTime High Risk HPV test and HPV16 real-time PCR, HPV-DNA (HPV16) was demonstrated in 5/47 (10.6 %) cancer specimens. Considering the evaluation of mRNA HPV16 E7 and p16 expression, HPV had an important role in the development of 3/47 (6.4 %) cancers of our patients. Our results are cohesive with previously published data in Slovenia reporting 8.4 % prevalence of HPV in oral carcinomas – incidence of HPV-positive OSCC/OPSCC had not increased over the past decade. Low prevalence of HPV-DNA in our samples indicates that smoking and alcohol consumption are main risk factors for development of OSCC/OPSCC in our country.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI (HPV).....	3
2.1.1 Zgradba virusa.....	3
2.1.2 Struktura in organizacija genoma	3
2.1.3 Taksonomija PV, genotipi HPV in njihovo razvrščanje	7
2.1.4 Razmnoževanje virusa (Produktivna okužba).....	10
2.1.5 Patogeneza (Abortivna okužba)	12
2.2. DIAGNOSTIKA OKUŽB S HPV	15
2.2.1 Tradicionalne metode dokazovanja okužbe s HPV	15
2.2.2 Molekularne metode dokazovanja okužbe s HPV	16
2.2.2.1 Metode brez predhodnega pomnoževanja nk (hibridizacijske metode)	16
2.2.2.2 Metode s predhodnim pomnoževanjem delcev nk	19
2.2.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo.....	19
2.2.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)	24
2.2.2.2.3 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA	25
2.3 HPV V POVEZAVI S PCK-UV/-UŽ.....	25
2.3.1 Pogled v zgodovino	25
2.3.2 Epidemiologija PCK-UV/-UŽ.....	26
2.3.3 Etiologija PCK-UV/-UŽ.....	27
2.3.4 Klinična slika, napoved poteka bolezni in zdravljenje.....	27
2.3.5 Prevalenca HPV v PCK-UV/-UŽ	29

2.3.6 Tumorogena aktivnost virusa	33
3 MATERIALI IN METODE	35
3.1 MATERIAL.....	35
3.2 METODE.....	35
3.2.1 Postopek osamitve DNA	35
3.2.2 Postopek osamitve RNA	36
3.2.3 Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnosti zaviralcev PCR	38
3.2.4 Preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR	39
3.2.5 Dokazovanje HPV-DNA	41
3.2.5.1 Dokazovanje HPV-DNA z začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68.....	41
3.2.5.2 Dokazovanje in opredeljevanje PCR pridelkov.....	43
3.2.5.2.1 Gelska elektroforeza.....	43
3.2.5.2.2 Metoda neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja.....	44
3.2.5.3 Dokazovanje HPV-DNA z Abbott RealTime High Risk HPV testom.....	48
3.2.5.4 Dokazovanje HPV-DNA s HPV16 E7 genotipsko značilnim RT-PCR.....	49
3.2.6 Dokazovanje mRNA HPV16 E7	51
3.2.7 Opredeljevanje statusa celične beljakovine p16	52
4 REZULTATI	54
4.1 HPV-DNA V TKIVNIH VZORCIH BOLNIKOV S PCK-UV/-UŽ.....	54
4.2 mRNA HPV16 E7 V TKIVNIH VZORCIH BOLNIKOV S PCK-UV/-UŽ.....	56
4.3 OPREDELJEVANJE STATUSA CELIČNE BELJAKOVINE P16.....	57
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	58
5.1 RAZPRAVA.....	58
5.2 SKLEPI.....	61
6 POVZETEK	62
7 VIRI	64
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših raziskav, v katerih so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV uporabljali metodo PCR	30
Preglednica 2: Pregled najpomembnejših raziskav, v katerih so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UŽ uporabljali metodo PCR.....	32
Preglednica 3: Pregled najpomembnejših raziskav, pri katerih so raziskovalci za dokazovanje HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ uporabljali ISH	33
Preglednica 4: Pregled objav v katerih so dokazovali HPV status, mRNA E6 in/ali E7 in p16 in v vzorcih PCK-UV/-UŽ	34
Preglednica 5: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 268 bp velikega dela za človeški beta-globin	39
Preglednica 6: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za obratno transkripcijo RNA in pomnoževanje 85 bp velikega dela gena, ki nosi zapis za beljakovino S9	40
Preglednica 7: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 140-150 bp velikega dela gena L1 HPV	42
Preglednica 8: Vsebina posamezne reakcijske posodice za izvedbo posamezne sekvenčne reakcije	46
Preglednica 9: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 80 bp velikega dela gena E7 HPV16	50
Preglednica 10: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za obratno transkripcijo RNA in pomnoževanje 80 bp velikega dela gena E7 HPV16	52
Preglednica 11: Rezultati testiranj tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ s tremi različicami PCR, sub-lokalizacija karcinoma in dokazan genotip HPV	56
Preglednica 12: Rezultati dokazovanja mRNA HPV16 E7 v vzorcih PCK-UV/-UŽ, pozitivnih na HPV-DNA.....	56
Preglednica 13: Rezultati dokazovanja HPV-DNA, mRNA HPV16 E7 in celične beljakovine p16 ter sub-lokalizacija PCK	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz genoma HPV16 (Münger, 2002)	4
Slika 2: Življenjski cikel HPV v ploščatoceličnem epitelu (Kahn, 2009).....	11
Slika 3: Ustna votlina in ustni del žrela (SEEK Training Modules, 2011).....	28
Slika 4: Nukleotidno zaporedje HPV16, pridobljeno z avtomatskim sekveniranjem	47
Slika 5: Fotografija elektroforeznega gela PCR pridelkov GP5+/6+/68.....	54
Slika 6: Amplifikacijske krivulje, pridobljene z HPV16 RT-PCR.....	55

KAZALO PRILOG

Priloga A: Splošni podatki bolnikov, katerim so bili odvzeti vzorci PCK, in rezultati testiranj

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ak	aminokislina
bp	bazni par
Da	dalton – enota za merjenje atomske oz. molekulske mase
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FFPE	arhivski tkivni vzorci, ki so fiksirani s formalinom in vklopljeni v parafin (angl. <i>formalin fixed, paraffin embedded</i>)
HPV	človeški papilomavirusi
HR-HPV	visokorizični genotipi človeških papilomavirusov
IHK	imunohistokemijska metoda
LR-HPV	nizkorizični genotipi človeških papilomavirusov
μl	mikroliter – enota za merjenje količine
mM	milimolarno – enota za merjenje koncentracije
mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
ng	nanogram - enota za merjenje mase
nm	nanometer - enota za merjenje dolžine
nt	nukleotid
OZ	oligonukleotidni začetnik
PCK	ploščatocelični karcinom
PCK-UV	ploščatocelični karcinom ustne votline
PCK-UŽ	ploščatocelični karcinom ustnega dela žrela
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PV	papilomavirusi
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska RNA
rpm	število obratov na minuto (angl. <i>rotations per minute</i>)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time PCR</i>)
rt-RT-PCR	obratna transkripcija in PCR v realnem času
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *Human Papillomaviruses*; HPV) predstavljajo heterogeno skupino majhnih DNA virusov, ki jih taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae* oz. v 5 rodov: *Alpha-*, *Beta-*, *Gama-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus* (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2010).

Danes je uradno priznanih več kot 150 različnih genotipov HPV (Kocjan in Poljak, 2011). Opredeljevanje genotipov HPV je klinično pomembno, saj so virusni genotipi značilno povezani z nastankom sprememb na kožnem ali sluzničnem epiteliju (Bernard, 2005). Klinično najpomembnejše so okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV (angl. *high-risk* HPV; HR-HPV) iz rodu *Alphapapillomavirus*, med katerimi sta najpomembnejša HPV16 in HPV18. Ta dva virusa etiološko povezujemo z nastankom malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela v anogenitalnem predelu, in sicer z več kot 99 % vseh primerov raka materničnega vratu, 70-90 % primerov raka zadnjika in nožnice ter 40-47 % primerov raka vulve in penisa (zur Hausen, 2009; Kocjan in Poljak, 2011).

HR-HPV se kot eden možnih etioloških dejavnikov omenjajo tudi v povezavi z nastankom malignih novotvorb ustne votline in ustnega dela žrela; prevalenca okužbe se v doslej objavljenih raziskavah giblje med 0 in 100 % (Kreimer in sod., 2005; Syrjänen in sod., 2011). V edini doslej objavljeni raziskavi v Sloveniji, je bila HPV-DNA dokazana v 8,4 % tkivnih vzorcev ploščatoceličnega karcinoma ustne votline in ustnega dela žrela (PCK-UV oz. PCK-UŽ) (Kansky in sod., 2003).

Velike razlike v prevalenci so lahko posledica enega ali večjega števila dejavnikov: uporabe različno občutljivih metod za dokazovanje in/ali genotipizacijo HPV-DNA, nekritičnega opredeljevanja rezultatov molekularnih metod, vrste oz. lokalizacije tumorjev, števila analiziranih vzorcev, ohranjenosti tkivnih vzorcev, posledica epidemioloških razlik, razlik v življenjskem slogu ljudi (uživanje alkohola in kajenje) ter posledica naraščanja števila HPV-DNA pozitivnih tumorjev ustne votline in ustnega dela žrela v zadnjih

desetletjih, predvsem v zahodnih državah, kot posledica sprememb v spolnih navadah (Kansky in sod., 2003; Kreimer in sod., 2005).

Najbolj razširjene metode dokazovanja okužb s HPV temeljijo na pomnoževanju virusne DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*; PCR), ki ji sledi opredeljevanje nastalih pridelkov z različnimi molekularnimi tehnikami (Kocjan in Poljak, 2011). V nasprotju z raziskavami malignih tumorjev anogenitalnega področja, samo dokazovanje HPV-DNA v tkivnih vzorcih karcinomov iz predela glave in vratu ne zadostuje za sklepanje o vzročni zvezi med HPV in novotvorbami, saj je možno, da je virus v teh vzorcih prisoten zgolj naključno, kot kontaminant ali v latentni neaktivni obliki (Wang-Johanning in sod., 2002; Kreimer in sod., 2005). V novotvorbah je zato potrebno ugotoviti tudi virusno aktivnost, kar najpogosteje poteka z dokazovanjem celične beljakovine p16, katere povečana raven nakazuje na nenormalno virusno aktivnost, dokazovanjem mRNA (angl. *messenger RNA*; informacijska RNA) E6 in E7 HR-HPV, ali s hibridizacijo *in situ*, s katero lahko HPV-DNA dokažemo v jedru rakavo spremenjenih celic (Kocjan in Poljak., 2011; Wang-Johanning in sod., 2002).

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V prvem delu raziskave smo, s tremi različnimi metodami za dokazovanje in genotipizacijo HPV-DNA, želeli določiti prevalenco okužb s HPV v 47 arhivskih tkivnih vzorcih PCK-UV in PCK-UŽ (PCK-UV/-UŽ), diagnosticiranih v letih 2005-2007. V drugem delu raziskave smo z dokazovanjem mRNA gena E7 HPV16 in dokazovanjem celične beljakovine p16 želeli ugotoviti, katere HPV-DNA pozitivne tumorje dejansko povzročajo HPV.

Pričakovali smo, da bomo HPV-DNA dokazali v 5-15 % analiziranih novotvorb. Predvidevali smo, da bo večina teh vzorcev vsebovala DNA HPV16. Pričakovali smo, da bomo z uporabo dodatnih metod lahko za večino HPV-DNA pozitivnih tumorjev ugotovili, ali jih dejansko povzročajo HPV ali ne.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI (HPV)

HPV povezujemo z nastankom benignih in malignih novotvorb epitela kože in sluznic (Poljak in Kocjan, 2010). Pred 30. leti je Prof. dr. Harald zur Hausen prvi postavil hipotezo o povezavi HPV in nastankom raka materničnega vratu. Danes je znano, da družina virusov HPV vključuje številne pomembne človeške karcinogene, ki poleg raka materničnega vratu povzročajo znaten delež ostalih rakov anogenitalnega področja, predela glave in vratu ter kože. HPV so povezani tudi z nastankom različnih benignih sprememb, od katerih so najpomembnejše genitalne bradavice in papilomi grla (zur Hausen, 2009).

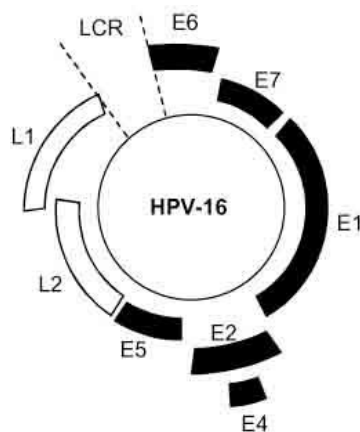
2.1.1 Zgradba virusa

Glede na morfološke značilnosti HPV prištevamo med majhne viruse brez ovojnice, ki v premeru merijo približno 55 nm. Njihov dedni material je obdan z dvoplastnim beljakovinskim plaščem, imenovanim kapsida, ki je pomemben za prenos, razširjanje in preživetje virusa v okolju (Poljak in sod., 2005; Graham, 2010). Kapsida ima ikozaedrično simetrijo in je sestavljena iz 72 morfoloških enot, imenovanih kapsomere. Le-te so sestavljene iz dveh tipov strukturnih beljakovin, t.i. velike (L1) z molekulsko maso 54 kDa in male (L2) plaščne beljakovine z molekulsko maso 74-80 kDa. Vsaka izmed 72 kapsomer je sestavljena iz petih, z S-S mostički, navzkrižno povezanih beljakovin L1, in ene beljakovine L2, ki je v strukturo vstavljena aksialno (Poljak in sod., 2005; Kocjan in Poljak, 2011).

2.1.2 Struktura in organizacija genoma

Genom HPV je krožna, kovalentno zaprta, dvojnovijačna molekula DNA z velikostjo približno 8000 baznih parov (bp) in molekulsko maso $5,2 \times 10^6$ Da (de Villiers in sod., 2004).

Kljub majhnosti genoma je molekularna biologija virusa zelo kompleksna (Slika 1). Genom je sestavljen iz treh glavnih območij: zgodnjega območja E (angl. *early*) ter poznega območja L (angl. *late*), ki sta kodirajoči, in iz nekodirajočega območja LCR (angl. *long control region*), imenovanega tudi nekodirajoče območje (angl. *non-coding region*; NCR) ali URR (angl. *upstream regulatory region*) (Zheng in Baker, 2006).



Slika 1: Shematski prikaz genoma HPV16 (Münger, 2002)

Zgodnje območje genoma zavzema več kot 50 % virusnega genoma od 5' proti 3' koncu in najpogosteje nosi zapis za 6 odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frames*; ORFs): E1, E2, E4, E5, E6 in E7 (Danos in sod., 1982; Zheng in Baker, 2006). Beljakovine zgodnjega območja so pomembne za uravnavanje podvojevanja virusne DNA, uravnavanje izražanja virusnih genov, interakcijo s celičnimi beljakovinami gostitelja in transformacijo gostiteljskih celic (Kocjan in Poljak, 2011).

Originalno sta bila k tej regiji priključena tudi ORF E3 in E8. Le za slednjega so dokazali, da kodira beljakovino, ki deluje kot negativni uravnalec virusnega prepisovanja in podvojevanja pri dveh genotipih: HPV31 in BPV1 (Bovine papillomavirus type 1). Za razliko od vloge, ki jo igra v HPV31 in BPV1, je beljakovina E8 v številnih zajčjih papilomavirusih opisana kot onkogen z lastnostmi podobnimi E5 (Zheng in Baker, 2006).

Pri nadzoru virusnega podvojevanja in prepisovanja virusnega genoma sta najpomembnejši virusni beljakovini E1 in E2 (Bosch in sod., 2001).

Gen, ki kodira zapis za beljakovino E1 predstavlja zelo ohranjeno območje virusnega genoma. Beljakovina E1 je pomembna za začetek podvojevanja virusnega genoma in vzdrževanje HPV v obliki zunajkromosomskih krožnih DNA-delcev, imenovanih episomi. Tekom podvajanja virusnega genoma deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo. Med naravno okužbo se E1 izraža v zelo nizkih koncentracijah in za učinkovito vezavo na vezavna mesta potrebuje beljakovino E2 (Doorbar, 2006). Tvorba kompleksa E1-E2 in njegova vezava v bližino mesta *ori*, na začetku podvojevanja, povzroči nastanek lokalnih motenj v virusni DNA; sledi priključevanje dodatnih molekul E1, ki sčasoma nadomestijo molekule E2 (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011).

Beljakovina E2 uravnava podvojevanje, segregacijo in izražanje virusnega genoma (Poljak in sod., 2005; Kocjan in Poljak, 2011). Gen, ki nosi zapis za beljakovino E2, je najpogostejše mesto preloma genoma HPV med vključitvijo v gostiteljev genom (Allen in sod., 2010). Nizka koncentracija E2 vzpodbuja izražanje genov z zapisom za beljakovine E6 in E7, medtem ko v visokih koncentracijah zavira izražanje istih genov z neposrednim oviranjem vezave celičnih dejavnikov prepisovanja na zgodnji virusni promotor (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011).

Vloga beljakovine E4 v pomnoževanju virusnega genoma še ni povsem opredeljena (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E4, z vezavo na citokeratine okuženih celic, najverjetneje povzroči propad celičnega citoskeleta. Obstaja velika verjetnost, da ta pojav omogoči lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okuženih celic (Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E4 lahko prepreči nadaljevanje celične delitve v fazi G2 in deluje kot antagonist celične proliferacije, posredovane z E7 (Doorbar, 2006).

ORF E5 visokorizičnih genotipov HPV kodirajo majhno, iz približno 83 ak sestavljeno, hidrofobno beljakovino z transformirajočimi lastnostmi, medtem ko zapis za to beljakovino, pri večini genotipov iz rodu beta in gama, manjka (Moody in Laimins, 2010; Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E5 v tkivnih kulturah lahko deluje kot ojačevalec transformirajoče aktivnosti beljakovin E6 in E7 in najverjetneje sodeluje v maligni pretvorbi celic, vendar le v začetni stopnji, saj gen E5 v tumorjih materničnega vratu ni izražen (Münger in sod., 1989; Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E5 tvori dimere,

povezane z disulfidnimi mostički in se povezuje z receptorji tirozin-kinaznega rastnega faktorja, kot sta receptor EGF (angl. *epidermal growth factor*) in/ali receptor PDGF (angl. *platelet derived growth factor*), kar vodi v njihovo konstantno aktivnost oz. celično proliferacijo (DiMaio in sod., 2000). E5 zmanjšuje površinski nivo molekul PHK razreda I in tako omogoča izmikanje imunskemu odgovoru gostitelja (Moody in Laimins, 2010; Kocjan in Poljak, 2011). Beljakovina E5 sodeluje tudi pri vzpodbujanju angiogeneze in pri antiapoptotskem delovanju z inhibicijo zakisanja endosoma (Moody in Laimins, 2010; Kocjan in Poljak, 2011).

Med vsemi območji genoma HPV sta najbolj raziskana gena, ki nosita zapis za beljakovini E6 in E7. Omenjeni beljakovini imata najpomembnejšo vlogo v onkogenezi novotvorb, katerih nastanek povezujejo s HPV, saj so prepisi genov E6 in E7 pogosto najdeni v različnih tumorjih in celičnih linijah (Summersgill in sod., 2000; Poljak in sod., 2005). Najpomembnejši procesi maligne preobrazbe, na katere vplivata E6 in E7, so spodbujanje oz. vzdrževanje celične proliferacije, zaviranje zaščitnega delovanja celičnih tumor-zavirajočih beljakovin ter indukcija celične nesmrtnosti (Kocjan in Poljak, 2011). Skupno izražanje genov z zapisom za E6 in E7 HR-HPV je nujno in zadostuje za učinkovito nesmrtnost primarnih celic ploščatoceličnega epitela. HR-HPV so razvili kompleksne mehanizme, ki z vezavo približno 160 aminokislin (ak) dolge beljakovine E6 inaktivirajo celično tumor zavirajočo beljakovino p53, katere naloga je preprečiti podvojevanje ali sprožiti uničenje celic z nenormalnimi genetskimi lastnostmi. Beljakovine E7 HR-HPV so majhni polipeptidi, ki so dolgi približno 100 ak, imajo kratek razpolovni čas in so hitro razgradljivi s proteosomsko degradacijo (Münger in sod., 1989; Reinstein in sod., 2000). Omenjena beljakovina se veže na celično retinoblastomsko beljakovino (pRB) in tako negativno vpliva na uravnava celičnega cikla na prehodu iz celične faze G1 v fazo S oz. sproži nenadzorovano proliferacijo gostiteljskih celic (Stanley in sod., 2007). Mehanizem delovanja beljakovin E6 in E7 HR-HPV je podrobneje opisan v poglavju 2.1.5. Patogeneza (Abortivna okužba).

Pozno območje zavzema skoraj 40 % virusnega genoma in leži navzdol od zgodnjega območja. Kodira dva ORF, ki sta odgovorna za prepisovanje velike plaščne beljakovine L1 in majhne plaščne beljakovine L2 (Zheng in Baker, 2006).

Strukturni beljakovini L1 in L2 se začeta kopičiti po začetku pomnoževanja virusnega genoma in se še posebej izrazita v granularnem sloju epitela, ki v sluzničnem epitelu predstavlja zunanji sloj (Graham, 2010). Najprej se začnejo izražati geni, ki nosijo zapis za variabilno majhno plaščno beljakovino L2, šele nato geni z zapisom za ohranjeno veliko plaščno beljakovino L1 (zur Hausen, 1996; Doorbar, 2006). Območji L1 in E1 predstavljata najbolj ohranjeni del genoma med različnimi genotipi HPV, zato sta ključni za klasifikacijo in raziskave na področju evolucijske sorodnosti (H)PV. L1 predstavlja tudi najbolj imunogeno virusno beljakovino, saj se gostiteljev imunski sistem na njeno prisotnost odzove s tvorbo genotipsko značilnih nevtralizacijskih protiteles (Kocjan in Poljak, 2011).

Imunski odgovor gostitelja na beljakovino L2 se kaže s tvorbo genotipsko neznanih protiteles, ki predstavljajo zaščito proti večjemu številu genotipov HPV (Kocjan in Poljak, 2011).

Nekodirajoče območje LCR je veliko približno 850 bp (10 % genoma HPV) in se nahaja med genoma L1 in E6. LCR ne nosi zapisov za virusne beljakovine, ampak zaporedja DNA, ki so pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepisovanja virusnega genoma: mesto začetka podvojevanja virusnega genoma (angl. *origin of replication; ori*), zgodnje virusne promotorje, vezavna mesta za dejavnike prepisovanja, ojačevalce in represorske uravnavalne beljakovine (Zheng in Baker, 2006; Kocjan in Poljak, 2011).

Med genoma E5 in L2 je še eno nekodirajoče zaporedje, katerega funkcija še ni opredeljena (Kocjan in Poljak, 2011).

2.1.3 Taksonomija PV, genotipi HPV in njihovo razvrščanje

Papilomaviruse (PV) hierarhično uvrščamo v naslednje kategorije: družina (*Papillomaviridae*), rodove (*Alpha-*, *Beta-*, *Gama-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus*), vrste in genotipe, ki predstavljajo tudi osnovno taksonomsko enoto (Bernard in sod., 2010).

Klasifikacija PV temelji na skladnosti nukleotidnih (nt) zaporedij gena, ki nosi zapis za veliko plaščno beljakovino L1. Skladnost nt zaporedij gena L1 med posameznimi rodovi PV je manjša od 60 %, skladnost nt zaporedij L1 med virusnimi vrstami znotraj rodu je 60-70 %, skladnost nt zaporedij gena L1 med različnimi genotipi v posamezni vrsti je 71-89 % (Kocjan in Poljak, 2011). Trenutno je popolnoma opredeljenih več kot 200 PV, od katerih jih približno 150 povezujemo z okužbami pri človeku in jih tako imenujemo človeški papilomavirusi (Bernard in sod., 2010; Kocjan in Poljak, 2011). Kot nov genotip opredelimo vsak izolat PV, katerega nukleotidno zaporedje gena L1, se za vsaj 10 % razlikuje od nukleotidnih zaporedij gena L1 vseh predhodno opredeljenih genotipov PV. Za virusne podtipse je značilna 2-10 % neskladnost med nukleotidnimi zaporedji gena L1. V primeru, da je neskladnost nukleotidnih zaporedij gena L1 novega virusa manjša od 2 %, govorimo o podtipski različici predhodno opredeljenega genotipa HPV (de Villiers in sod., 2004; Kocjan in Poljak, 2011).

Za priznanje novega genotipa HPV moramo določiti celotno nukleotidno zaporedje njegovega genoma in klonse novega genotipa poslati v Referenčni center za HPV v Heidelberg v Nemčiji, kjer spremljajo odkrivanje novih genotipov in jim, glede na vrstni red osamitve, določajo zaporedne številke (de Villiers in sod., 2004). Leta 2010 so predstavili nove smernice, ki so se nekoliko oddaljile od strogih pravil identifikacije novih virusov, saj so za vodilno merilo predlagale upoštevanje filogenetskih razmerij (Bernard in sod., 2010). Tradicionalno so genomska zaporedja PV pridobivali iz epitelnih novotvorb s pomočjo klasičnih tehnik kloniranja, ki so v glavnem primerne za opredeljevanje genotipov HPV, ki so v kliničnem vzorcu prisotni v zelo visokih koncentracijah (de Villiers in sod., 2004). Z napredovanjem molekularne biologije in razvojem tehnik kot so PCR, podvojevanje celotnega genoma s pomočjo tehnike kotalečega se kroga (angl. *rolling circle amplification*) in *shotgun* sekveniranje so za identifikacijo novih PV postale veljavne tudi te metode (Rector in sod., 2004; Li in sod., 2009). Uporaba novejših metod je pripeljala do identifikacije in karakterizacije številnih novih PV, ki so v kliničnih vzorcih praviloma prisotni v zelo nizkih koncentracijah (Kovanda in sod., 2011).

Vsi doslej znani oz. opredeljeni genotipi PV so razvrščeni v 68 virusnih vrst ter 29 virusnih rodov. Triindvajset rodov je označenih z grškimi črkami alfa-omega, šest rodov pa z

grškimi črkami delta-iota z predpono dyo (de Villiers in sod., 2004). Glede na trenutno veljavno klasifikacijo PV, HPV uvrščamo v pet rodov: *Alpha-*, *Beta-*, *Gama-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus* (Bernard in sod., 2010). Posamezni rodovi lahko vključujejo več vrst HPV; v posamezno vrsto so načeloma združeni genotipi, ki jih poleg skladnosti nukleotidnih zaporedij povezujejo tudi podobne biološke lastnosti, saj imajo isti tropizem za tkiva in/ali organe ter podoben karcinogeni potencial (Kocjan in Poljak, 2011).

Klinično najbolj pomembne genotipe HPV, ki so povezani z nastankom številnih benignih in malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela, uvrščamo v rod *Alphapapillomavirus*. Glede na tumorogeni potencial, sluznične genotipe znotraj rodu *Alphapapillomavirus*, razdelimo v 3 skupine. V skupino HR-HPV spadajo genotipi, ki jih najpogosteje povezujemo z nastankom raka materničnega vratu, rakom zadnjika, penisa, nožnice, vulve in ustnega dela žrela; najpomembnejša genotipa iz te skupine sta HPV16 in 18; ostali genotipi, ki spadajo v to skupino so: HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 in 59. V skupini LR-HPV sta najpomembnejša genotipa HPV6 in 11; vanjo pa spadajo še naslednji genotipi: HPV40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 in 89, ki so povezani z nastankom anogenitalnih bradavic in papilomov grla. Tretjo skupino predstavljajo genotipi z nejasnim tumorogenim potencialom, v katero najpogosteje spadajo genotipi HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 in 82. Rod *Alphapapillomavirus* vključuje tudi genotipe s tropizmom za celice kože, ki jih povezujemo z nastankom navadnih in ploščatih kožnih bradavic ter anogenitalnih bradavic pri otrocih. Genotipi rodu *Betapapillomavirus* imajo tropizem za celice kože in jih povezujemo z nastankom benignih in malignih novotvorb pri imunsko oslabljenih osebah in bolnikih z bradavičasto epidermodisplazijo. Genotipi iz rodov *Gama-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus* povzročajo nastanek različnih benignih novotvorb (Kocjan in Poljak, 2011).

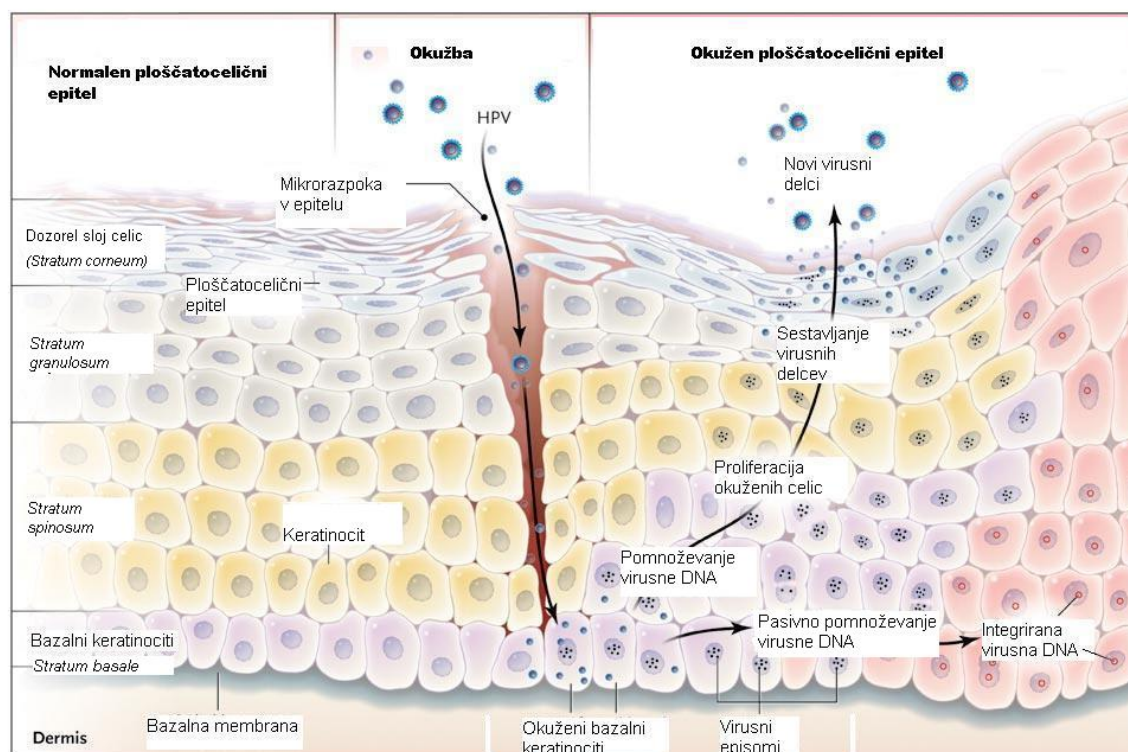
V ustni votlini najdemo širok spekter genotipov HPV. Dosedanje raziskave so bile v glavnem osredotočene na dokazovanje okužb z genotipi HPV, ki spadajo v rod *Alphapapillomavirus*. Bottalico in sodelavci (2011), v nedavno objavljeni raziskavi o HPV v ustni votlini, poročajo o prisotnosti širokega spektra potencialno novih in že opredeljenih genotipov iz rodov *Beta-* in *Gamapapillomavirus*, ki smo jih doslej povezovali izključno z

okužbami kože. Potrebne so nadaljnje molekularno-epidemiološke raziskave o potencialni povezavi teh HPV z nastankom novotvorb ustne votline.

2.1.4 Razmnoževanje virusa (Produktivna okužba)

Genotipi iz rodu *Alphapapillomavirus* se najpogosteje prenašajo z intimnimi stiki sluznic in kože, predvsem s spolnimi odnosi; možen je tudi prenos z avtoinokulacijo, z okužene matere na otroka med prehodom skozi porodni kanal ter, redkeje, posredno preko kontaminiranih površin ali predmetov (spodnje perilo, igrače, kirurški pripomočki). Genotipi iz rodov *Beta-*, *Gama-*, *Mu-* in *Nupapillomavirus* se najpogosteje prenašajo z neposrednim stikom kože s kožo oseb s klinično izraženimi spremembami, ki so povezane s HPV (npr. navadne kožne bradavice), ali s subklinično asimptomatsko okužbo; do prenosa lahko pride tudi posredno, preko kontaminiranih površin ali predmetov (tuši, kopališča, savne) (Kocjan in Poljak, 2011).

Začetno stopnjo okužbe predstavlja vstop virusa skozi poškodovani epitel kože ali sluznic skozi mikro-poškodbe in dostop infektivnih virionov do celic bazalnega sloja večskladnega ploščatoceličnega epitela oz. bazalnih keratinocitov, ki predstavljajo mesto začetka okužbe. Primarne receptorje za vezavo virusni delcev na bazalno membrano in površino epitelnih celic predstavljajo heparan-sulfatni proteoglikani (HSPG). Z omenjenih proteoglikanov se virusna kapsida prenese na še nepoznane sekundarne receptorje, ki z mehanizmom endocitoze omogočajo relativno počasen vstop virusa v celico. Sledi razgradnja virusnih delcev in vstop virusnega genoma v jedro bazalnih celic (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011). Okužba s HPV v nadaljevanju lahko poteka kot produktivna okužba ali kot nepopolna- abortivna okužba (Slika 2).



Slika 2: Življenjski cikel HPV v ploščatoceličnem epitelu (Kahn, 2009)

V primeru produktivne okužbe pride do razmnoževanja virusa in sproščanja novonastalih virusov iz epitelnih celic. Sproščeni virusi so potencialni povzročitelji novih okužb, ki nastanejo zaradi neposrednega ali posrednega stika z infektivnim agensom (Campisi in sod., 2007; Kocjan in Poljak, 2011).

Proces sinteze virusne DNA in izražanja virusnih genov je natančno uravnan in je odvisen tako od prisotnih virusnih beljakovin, kot tudi od stopnje diferenciacije okuženih celic. Popolni virusni delci se sproščajo le iz popolnoma dozorelih celic, medtem ko je pomnoževanje HPV v bazalnih keratinocitih močno omejeno. Med začetno fazo virusnega pomnoževanja v jedrih bazalnih in parabazalnih celic, se virusni genom nahaja izključno v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev (episomov), v 50-100 kopijah/celico. Celice, ki vsebujejo episome, predstavljajo rezervoar okuženih celic in so odgovorne za latenten status okužbe; te celice se morfološko ne razlikujejo od neokuženih celic (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011). Podvojevanje virusnega genoma v bazalnem sloju poteka v skladu s celičnim ciklom gostiteljske celice; pri eni celični delitvi se virusni genom podvoji le

enkrat. Z začetkom zaporednega izražanja virusnih genov, od zgodnjih do poznih, v skladu z diferenciacijo ploščatoceličnega epitela, okužba preide v produktivno obliko. V bazalnih in parabazalnih celicah je izražanje virusnih genov minimalno, izražajo se le zgodnji geni virusnega genoma (predvsem E6, E7). Z napredovanjem virusa v višje sloje epitela se aktivirajo še ostali virusni geni (E1, E2), ki so pomembni za podvojevanje virusa po načinu kotalečega se kroga, pri katerem v gostiteljskih celicah nastaja na tisoče kopij virusnega genoma. Ko okuženi keratinociti pridejo v zgornje sloje epitela, podvojevanju virusnega genoma sledi sinteza virusnih beljakovin, ki so pomembne za sestavljanje virusnih delcev (L1 in L2) in njihovo sproščanje iz gostiteljskih celic (E4). Končen rezultat produktivne okužbe je nastanek novih popolnih infektivnih virusnih delcev. Posledice produktivne okužbe lahko preučujemo z opazovanjem klasičnih virusnih citopatskih učinkov, kot so koilocitoza, akantoza (odebelitev sloja *Stratum spinosum*), diskeratoza (nenormalna keratinizacija v slojih nižjih od *Stratum corneum*) in pojavljanje večjedrnih keratinocitov (Campisi in sod., 2007; Sterlinko in sod., 2009; Kocjan in Poljak, 2011). Koilocitoza je najbolj značilen citopatski učinek, ki ga patologi najpogosteje izkoriščajo za histopatološko oceno prisotnosti okužbe s HPV. Celice okužene s HPV, koilociti, so povečane sferične celice, obdane s svetlim pasom, za katere je značilna prisotnost hiperkromnih in polimorfnih jeder (Fornatora in sod., 1996).

2.1.5 Patogeneza (Abortivna okužba)

Številne epidemiološke raziskave so pokazale, da je več kot 90 % okužb s HPV prehodnih; praviloma izvenijo v roku 1 leta in ne vodijo do nastanka predrakavih sprememb (Kocjan in Poljak, 2011). Na verjetnost napredovanja okužbe v smeri maligne preobrazbe celic (to se zgodi le pri 6-10 % okuženih oseb) vpliva genotip prisotnega virusa (karcinogeneza je značilna za HR-HPV), njegova sposobnost perzistence in sinergističnega delovanja z različnimi fizičnimi, kemičnimi in biološkimi dejavniki ter dedna zasnova in imunski odgovor gostitelja (Kumaraswamy in Vidhya, 2011).

Predvidevajo, da se maligne novotvorbe, ki so najhujša posledica okužbe s HPV, razvijejo preko več zaporednih stopenj. Tri-stopenjski model karcinogeneze, posredovane s HR-HPV, so opisali na podlagi poteka maligne preobrazbe celic raka materničnega vratu.

Temelj modela karcinogeneze je interakcija virusnih beljakovin z močno kontroliranim spletom celičnih onkogenov in tumorje zavirajočih beljakovin (predvsem p53 in pRB), ki uravnavajo rast in delitev celic (Kocjan in Poljak, 2011).

V prvi stopnji HPV okuži bazalne celice ploščatoceličnega epitela. Beljakovini E6 in E7 HR-HPV s številnimi mehanizmi povzročata genetsko nestabilnost celičnega genoma, kar predstavlja zgodnji dogodek karcinogeneze. Sledi druga stopnja, ki je ključna pri nastanku raka, v kateri pride do vključevanja HPV-DNA v genom gostiteljske celice; vendar le v primeru dolgotrajne okužbe s HR-HPV. Med procesom integracije, se krožna oblika virusnega genoma razklene v genu E2. Integriran del virusnega genoma navadno vključuje gene E1, E6 in E7, medtem ko se gena E2 in E5 izgubita in se v tumorsko preobraženih celic ne izražata. Posledica izgube beljakovine E2 je izguba nadzora nad izražanjem genov E6 in E7 oz. povečana in nekontrolirana proliferacija epitelnih celic. Sledi tretja stopnja modela karcinogeneze, pri kateri imajo poleg HPV pomembno vlogo tudi dodatne karcinogene snovi (cigaretni dim, UV-žarki, obsevanje)- vsi ti dejavniki povzročajo spremembe genoma, ki vodijo v nesmrtnost oz. maligno preobrazbo gostiteljskih celic. Po integraciji virusnega genoma se beljakovini E6 in E7 začneta prekomerno kopičiti in se neposredno vključita v celični cikel ter s svojo vezavo preprečujeta normalno delovanje celičnih tumor-zavirajočih beljakovin p53 in pRB. Beljakovina p53 je dejavnik prepisovanja, ki uravnava prepisovanje celičnih beljakovin, ki sodelujejo v nadzoru celičnega cikla na prehodu iz G1 v S fazo. V HPV-negativnih celicah, p53 v primeru poškodbe DNA prepreči nadaljevanje celičnega podvojevanja in zagotovi čas, potreben za popravilo poškodovane DNA. Če popravilo DNA ni mogoče, omenjena beljakovina vzpodbudi proces celične smrti in tako prepreči prenos poškodovane DNA v hčerinske celice, zato jo imenujemo tudi varuh človeškega genoma. V primeru okužbe s HR-HPV se E6, p53 in celična ubikvitinska ligaza E6AP (angl. *cellular E6AP ubiquitin ligase*) povežejo v tridelni kompleks, kar povzroči hitro proteosomsko razgradnjo p53. Preprečeno normalno delovanje beljakovine p53 omogoča neovirano delitev celic s poškodovano DNA, kar lahko privede do njihove nesmrtnosti in maligne preobrazbe (Kocjan in Poljak, 2011).

Beljakovina E7 se v gostiteljskih celicah poveže s pRB, ki je ključni nadzorni dejavnik celičnega cikla, in povzroči njegovo razgradnjo po ubikvitinski poti. Povezava povzroči sprostitvev transkripcijskega dejavnika E2F in njegovo prosto delovanje pri spodbujanju celične delitve z aktivacijo genov, potrebnih za sintezo DNA. pRB je negativni regulator izražanja celične beljakovine p16. Ker vezava virusne beljakovine E7 na pRB povzroči njegovo razgradnjo, se izražanje celične beljakovine p16 poveča (Cantley in sod., 2011). p16 je uravnalna beljakovina (inhibitor od ciklina odvisnih kinaz), ki preprečuje ustavitev celičnega cikla. Ugotavljanje povišanega izražanja celične beljakovine p16 v citoloških in histoloških vzorcih z imunohistokemično metodo se v zadnjih letih uporablja v diagnostične namene za dokazovanje s HPV okuženih celic, ki imajo povišano raven izražanja E7 oz. za dokazovanje cervikalne intraepitelijske neoplazije (CIN) višjih stopenj in raka materničnega vratu (Kocjan in Poljak, 2011). Uporaba p16 kot nadomestnega markerja za okužbo s HPV je podrobneje opisana v poglavju 2.2.1 Tradicionalne metode dokazovanja okužbe s HPV.

E7 se lahko poveže tudi z inhibitorji od ciklina odvisnih kinaz p21 in p27, in ju inaktivira, ter s številnimi drugimi beljakovinami, ki so posredno ali neposredno odgovorne za uravnavanje celične proliferacije. Beljakovini E6 in E7 lahko sodelujeta tudi s celičnimi karcinogenimi beljakovinami ras in myc, kar virusu omogoča delovanje na nivoju rastnih faktorjev ter celičnega in jedrnega metabolizma in posledično proizvodnjo rakavo spremenjenih celic. Omenjeni beljakovini lahko, npr. z vplivanjem na popravilne mehanizme DNA, direktno sprožita nastanek mutacij DNA gostiteljske celice (Kocjan in Poljak, 2011).

Beljakovine E6 LR-HPV ne tvorijo kompleksa s p53 in ne vodijo do njegove razgradnje (Werness in sod., 1990). Sposobnost vezave E7 s pRB imajo tudi LR-HPV, vendar je njihova moč vezave v primerjavi z beljakovinami E7 HR-HPV približno stokrat manjša. Beljakovini E6 in E7 LR-HPV prav tako ne povzročata genetske nestabilnosti celičnega genoma (Kocjan in Poljak, 2011).

Natančna vloga imunskega odgovora proti HPV še ni povsem opredeljena. V primerjavi z večino ostalih virusov je za HPV značilen nenavadno slab in počasen imunski odgovor, kar

nakazuje na to, da so HPV evolucijsko razvili mehanizme, s katerimi se le-temu uspešno izmikajo. Mehanizem imunskega izmikavanja HPV temelji predvsem na oviranju učinkovite predstavitve virusnih antigenov. HPV so obvezni znotrajcelični patogeni, ki se razmnožujejo le v površinskem sloju sluznic in kože in ne povzročajo pomembnejše celične lize/ nekroze tkiv in viremije. Najverjetneje se pri večini okuženih v prvih treh mesecih najprej pojavi celični imunski odgovor proti E2 in E6, ki povzroči uspešno regresijo večine novonastalih genitalnih bradavic in CIN I. Protitelesni imunski odgovor se pojavi nekaj mesecev pozneje - zanj je značilen zelo nizek nivo protivirusnih protiteles (anti L1); ocenjujejo, da je povprečen čas pojava serokonverzije 12 mesecev po okužbi. Protitelesa anti-HPV, ki nastanejo po naravni okužbi so, za razliko od protiteles anti-HPV spodbujenih s cepljenjem proti HPV, značilna za določen genotip in ne ščitijo pred okužbo z drugimi genotipi in ponovno okužbo z istim genotipom HPV (Kocjan in Poljak, 2011).

2.2. DIAGNOSTIKA OKUŽB S HPV

2.2.1 Tradicionalne metode dokazovanja okužbe s HPV

Človeški papilomavirusi se razmnožujejo le v terminalno dozorelih epitelnih celicah, zato osamitev virusa v celični kulturi zaenkrat ni možna (Poljak in sod., 2005).

Med tradicionalne virološke metode, ki jih lahko uporabimo za dokazovanje HPV prištevamo:

- svetlobno mikroskopijo, ki temelji na opazovanju značilnih citopatskih sprememb (predvsem koilocitoze) epitelnih celic
- elektronsko mikroskopijo s katero lahko opazujemo virusne delce, ki nastanejo pri produktivni okužbi (Chang in sod., 1991)
- imunohistokemične metode (IHK), ki temeljijo na dokazovanju virusnih in celičnih beljakovin z uporabo označenih monoklonskih/poliklonskih protiteles in encimskih substratov. Netopen, obarvan precipitat, ki nastane ob prisotnosti virusnih ali celičnih beljakovin, lahko zaznamo s svetlobnim mikroskopom.

Dokazovanje izražanja celične beljakovine p16 z IHK uporabljamo kot nadomestni marker za dokazovanje okužbe s HPV v predrakavih spremembah materničnega vratu višjih

stopenj in v vzorcih raka materničnega vratu, vulve, penisa, anorektalnega področja in ustne votline ter ustnega dela žrela, saj je njeno izražanje v okuženih celicah povečano. Kljub temu, da je na tržišču dostopen širok spekter protiteles proti p16, večina raziskovalcev uporablja klon E6H4 (Roche mtm Laboratories, Heidelberg, Nemčija) oz. komercialno dostopen komplet kemikalij CINtec Histology Kit (Roche mtm Laboratories) (Brunner in sod., 2011; Helliwell, 2011). Prednost IHK je enostavna izvedba na tkivnih vzorcih, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin ter komercialna dostopnost monoklonskih protiteles proti p16. Pomanjkljivost te metode je nizka specifičnost, saj je beljakovina p16 lahko prekomerno izražena tudi v tumorjih, ki niso povezani s HPV (Cantley in sod., 2011).

Zaradi pomanjkljivosti tradicionalnih metod, kot sta njihova nizka občutljivost in specifičnost ter nezmožnost genotipizacije HPV, se v diagnostiki pretežno uporabljajo le molekularne metode, ki temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedjih dednega zapisa virusa (Poljak in sod., 2005; Poljak in Kocjan, 2010).

2.2.2 Molekularne metode dokazovanja okužbe s HPV

Molekularne metode dokazovanja okužbe s HPV temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusnih nukleinskih kislin (nk). Delimo jih na metode brez predhodnega pomnoževanja nk (hibridizacijske metode) in na metode s predhodnim pomnoževanjem nk (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.1 Metode brez predhodnega pomnoževanja nk (hibridizacijske metode)

K molekularnim metodam brez predhodnega pomnoževanja nk prištevamo hibridizacijo po Southernu, hibridizacijo *dot-blot*, hibridizacijo *in-situ* na filtru in hibridizacijo *in-situ* (Poljak in sod., 2005; Kumaraswamy in Vidhya, 2011).

Hibridizacija po Southernu ali *Southern blot* je tehnika, ki predstavlja zlati standard za odkrivanje in genotipizacijo HPV in so jo uporabljali že v začetnih raziskavah HPV (Hubbard, 2003). Prvi korak pri metodi *Southern blot* je osamitev celokupne DNA iz vzorca in encimska razgradnja DNA. Pridelke razgradnje nato nanese na gel in

izvedemo postopek gelske elektroforeze, s katerim posamezne dele DNA ločimo na podlagi njihove velikosti. Ločene dele DNA, s kapilarnim ali vakuumskim postopkom, prenesemo na nitrocelulozno membrano, kjer izvedemo postopek hibridizacije s komplementarnimi lovkami, največkrat označenimi z radioaktivnimi izotopi. V primeru zaznave označenih DNA hibridov potrdimo, da vzorec vsebuje DNA HPV oz. določen genotip HPV (Hubbard, 2003). Pomanjkljivosti te metode so dolgotrajnost postopka, zahtevna izvedba in uporaba radioaktivno označenih lovk (Kumaraswamy in Vidhya, 2011).

Hibridizacija *dot-blot* je metoda, katere postopek je podoben hibridizaciji po Southernu, le da ne vključuje koraka restrikcije in ločevanja fragmentov virusne DNA z gelsko elektroforezo. Pozitiven rezultat na nosilcu (membrani) zaznamo kot madež. Metoda je v primerjavi z metodo *Southern blot* enostavnejša za izvedbo, vendar se zaradi nizke občutljivosti redko uporablja v rutinski diagnostiki (Kumaraswamy in Vidhya, 2011).

Hibridizacija *in situ* na filtru je poenostavljena različica metode *dot-blot*, pri kateri celokupne DNA predhodno ne osamimo. Postopek izvedemo tako da, s pomočjo močnih detergentov in encimov, razgradimo celice v vzorcu. Sledi prenos razgrajenih celic na nosilec in izvedba hibridizacije (Poljak, 2007).

Hibridizacija *in situ* (angl. *In situ hybridization*; ISH) je edina molekularna metoda, ki omogoča zanesljivo zaznavanje in identifikacijo HPV v topografski povezavi s patološkimi spremembami, ki jih povzročajo. Za razliko od ostalih molekularnih metod, pri ISH celoten proces identifikacije HPV poteče znotraj jedra okuženih celic citoloških brisov ali tkivnih rezin, in ne na trdni podlagi ali v raztopini (Poljak in Kocjan, 2010). Za izvedbo metode najpogosteje uporabimo z biotinom označene lovke, ki so komplementarne tarčnemu delu virusne DNA ali RNA. Zaznavanje izvedemo s pomočjo z encimom označenih antibiotinskih protiteles, ki se vežejo na lovke, in dodatkom substrata (Hubbard, 2003). Rezultate ISH ovrednotimo z mikroskopom. Prisotnost HPV v testiranem vzorcu potrdimo, kadar znotraj jedra epitelnih celic opazimo značilne precipitate. Z ISH lahko ovrednotimo tudi fizično stanje virusa oz. ali se virus v celici nahaja v integrirani ali episomalni obliki (Poljak in Kocjan, 2010). Ponudba tehnično preverjenih komercialno

dostopnih testov je velika; za večino je značilna uporaba mešanice večjega števila HPV lovk in možnost zaznave večjega števila genotipov HPV (Cantley in sod., 2011). Pomanjkljivosti te metode so tehnično zahtevna izvedba in manjša občutljivost v primerjavi s PCR, zato metodo redko uporabljamo v rutinski diagnostiki (Poljak in Kocjan, 2010).

Tekočinska hibridizacija

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) so leta 1997 razvili v podjetju Digene Corporation (Gaithersburg, MD, ZDA), trenutno pa ga proizvaja podjetje Qiagen (Hilden, Nemčija). Leta 2003 je FDA (angl. Food and Drug Agency) odobrila uporabo hc2 za rutinsko diagnostiko okužb s HR-HPV. Omenjeni test je najpomembnejši in najpogosteje uporabljen diagnostični test za dokazovanje HPV zadnjega desetletja (Poljak in Kocjan, 2010). Najpogosteje se izvaja v naslednjih kliničnih primerih: kot dopolnilni test v triazi bolnic z nejasno citološko diagnozo, za redno spremljanje žensk, pri katerih kljub pozitivni citologiji rezultat kolposkopije pokaže negativen rezultat, za kontrolo uspešnosti operacije predrakavih sprememb na materničnem vratu ter kot presejalni test skupaj s citologijo pri ženskah, starejših od 30-35 let (Kocjan in Poljak, 2011). Prvi korak pri izvedbi testa je denaturacija dvojnovijačne (angl. *double stranded*; ds) DNA in njena pretvorba v enovijačno (angl. *single stranded*; ss) DNA z uporabo močnega bazičnega denaturacijskega reagenta (Chaudhary in sod., 2009; Poljak in Kocjan, 2010). Sledi ločena tekočinska hibridizacija ssDNA z dvema mešanicama neoznačenih enovijačnih RNA lovk, ki poteka v strogo nadzorovanih pogojih. Ena mešanica vsebuje lovke, ki so specifične za 13 HR-HPV genotipov, druga mešanica pa lovke, specifične za 5 LR-HPV genotipov; test ne omogoča ločevanja genotipov HPV. Naslednji korak v izvedbi testa je vezava hibridizacijskih kompleksov na površino luknjic mikrotitrne ploščice z vezanimi monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za RNA-DNA hibride. Sledi zaznavanje vezanih hibridov z dodatkom z alkalno fosfatazo konjugiranih protiteles, ki so specifična za RNA-DNA hibride in dodatkom kemiluminiscentnega substrata. Semikvantitativno merjenje sproščene svetlobe poteka v luminometru, ki nam rezultate poda v relativnih svetlobnih enotah (angl. *relative light units*; RLU) (Poljak in Kocjan, 2010). Intenziteta sproščene svetlobe je proporcionalna količini tarčne DNA v vzorcu (Chaudhary in sod., 2009). Glavne pomanjkljivosti testa hc2 so navzkrižna reaktivnost med mešanico lovk in

nekaterimi HPV-genotipi ter pomanjkanje interne kontrole za nadzor ustreznosti vzorca in prisotnosti inhibitornih substanc (Poljak in Kocjan, 2010; Cantley in sod., 2011).

2.2.2.2 Metode s predhodnim pomnoževanjem delcev nk

2.2.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

PCR je dragoceno orodje, ki omogoča *in vitro* pomnoževanje edinstvenih regij DNA in omogoča njihovo zaznavanje v prisotnosti številnih dejavnikov okolja, kar je značilno za večino virusnih okužb (Hubbard, 2003). Postopek omenjene metode vključuje pomnoževanje tarčnih zaporedij DNA ali mRNA za več velikostnih razredov, skozi številne cikle denaturacije na visoki temperaturi (približno 95 °C), prileganja komplementarnih oligonukleotidnih začetnikov (OZ) na nižji temperaturi (približno 55 °C) in podvojevanja DNA s termostabilno DNA polimerazo na temperaturi približno 72 °C (Cantley in sod., 2011). Vsaka novonastala kopija tarčnega zaporedja služi kot matrica v naslednji ponovitvi temperaturnih ciklov (Poljak in sod., 1994).

Za dokazovanje HPV-DNA s PCR sta v uporabi dva glavna pristopa: en temelji na uporabi skupinsko-značilnih OZ, drugi pa na uporabi genotipsko značilnih OZ. Skupinsko-značilni OZ omogočajo pomnoževanje DNA in identifikacijo širokega spektra HPV genotipov v eni sami reakciji. Najpogosteje uporabljeni širokospektralni OZ za pomnoževanje DNA α -HPV so PGMY09/11, GP5+/6+ in SPF10, ki nalegajo na 450, 150 in 65 bp dolga zaporedja znotraj ohranjene regije L1 genoma HPV (Spence in sod., 2006). Med integracijo virusnega genoma v gostiteljev genom lahko pride do delecije regije L1, zato so pogosto v uporabi tudi skupinsko-značilni OZ CPI/IIg, ki pomnožujejo 188 bp dolgo zaporedje znotraj gena E1 (Tieben in sod., 1993). Na podlagi rezultatov PCR s skupinsko-značilnimi OZ ni mogoče sklepati o prisotnosti določenega genotipa HPV, saj je omenjena metoda uporabna le za dokaz prisotnosti oz. odsotnosti HPV-DNA.

Genotipsko značilni OZ nalegajo na specifična zaporedja virusnih genov in omogočajo pomnoževanje posameznih HPV genotipov. Za dokazovanje prisotnosti večih genotipov HPV v vzorcu je potrebno izvesti več reakcij PCR (Chin-Hong in Klausner, 2008).

Pomnoževanju HPV-DNA zato sledi dokazovanje specifičnosti pridelkov PCR z različnimi metodami: z elektroforezo v gelu, z RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), z metodo ELOSA (angl. *enzyme linked oligonukleotide sorbent assay*; PCR-encimsko oligonukleotidni test), s hibridizacijskimi metodami (kot so: reverzni *dot-blot* (RDB), reverzni *line-blot* (RLB) in mikromreže), tehnologijo Luminex in avtomatskim določanjem nt zaporedja (Chin-Hong in Klausner, 2008; Poljak in Kocjan, 2010). S temi metodami lahko določimo skupine genotipov HPV (HR-HPV, LR-HPV, genotipi z nejasnim tumorogenim potencialom) ali posamezne genotipe HPV.

Elektroforeza v agaroznih gelih je ena izmed najpogosteje uporabljenih in najenostavnejših metod za ločevanje odsekov DNA ali RNA na podlagi velikosti. Določevanje velikosti neznanih delcev poteka s primerjavo z velikostmi standardnih delcev DNA, ločenih v enakih pogojih. Pomanjkljivost te metode je njena nizka specifičnost, zato se praviloma uporablja le za potrditev uspešno izvedene reakcije PCR pred uporabo drugih genotipizacijskih metod (Wu in sod., 2008).

Metoda RFLP se uporablja za analizo pridelkov PCR, nastalih s širokospektralnimi OZ. Združuje razgradnjo pridelkov PCR z restrikcijскими encimi in standardno gelsko elektroforezo. Nastali vzorec razgradnje primerjamo s teoretično določenim vzorcem razgradnje pričakovanega dela DNA. Opisanih je več različic metode RFLP, ki se uporabljajo za opredeljevanje genotipov HPV; najpogosteje uporabljena je metoda, ki temelji na razgradnji skupinsko-značilnih pridelkov MY09/11 (PGMY09/11), s katero lahko opredelimo 44 različnih genotipov HPV. Zaradi pomanjkljivosti metode RFLP kot so: zaznavanje le tistih polimorfizmov, ki vplivajo na vezavna mesta restrikcijских encimov, uporabnost le za relativno visoke koncentracije pridelkov PCR, zahtevna standardizacija, dolgotrajnost in zahtevnost postopka ter zastarelost baze podatkov o standardih za posamezen genotip HPV se ta metoda danes le redko uporablja za opredeljevanje genotipov HPV (Wu in sod., 2008).

Metoda ELOSA omogoča kvalitativno ali kvantitativno dokazovanje pridelkov PCR, ki so označeni z biotinom. Pridelke PCR, nastale s skupinsko-značilnimi OZ, prenesemo v vdolbinico mikrotitrne ploščice, prekrito z značilnimi lovkami. Dodamo avidin ali

antibiotinska protitelesa označena z encimom (alkalna fosfataza ali hrenova peroksidaza). Po dodatku substrata rezultat hibridizacije odčitamo spektrofotometrično. Amplicor HPV Test (Roche Molecular Systems, Branchburg, ZDA) je komercialno dostopen test, s katerim lahko dokažemo 13 HR-HPV genotipov, vendar ne omogoča neposredne genotipizacije HPV (Poljak in Kocjan, 2010)

Postopka RDB in RLB sta podobna standardnim hibridizacijskim metodam za opredeljevanje pridelkov PCR oz. DNA. RDB temelji na prenosu pridelkov PCR na najlonsko membrano s pomočjo vakuuma, čemur sledi hibridizacija z genotipsko značilnimi lovki. Pri metodi RLB so lovke za posamezne genotipe HPV v obliki paralelnih linij pritrjene na nitrocelulozno membrano. Hibride zaznamo po vezavi pridelka PCR s tarčno lovko. Komercialno dostopna testa, ki temeljita na metodi RLB sta test INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* (Innogenetics NV, Gent, Belgija), ki omogoča identifikacijo 28 različnih genotipov HPV in Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics), ki opredeli 37 različnih genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus* (Chin-Hong in Klausner, 2008; Wu in sod., 2008). Test INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* (Innogenetics) omogoča pomnoževanje oz. opredeljevanje zelo majhnega dela genoma HPV (65 bp) in je zato primeren za dokazovanje HPV v arhivskih vzorcih (Kocjan in sod., 2011).

Osnovni princip genotipizacijskih testov HPV, ki temeljijo na uporabi mikromrež, je reverzna hibridizacija. Pomnoževanju tarčnih zaporedij s skupinsko-značilnimi OZ sledi denaturacija in hibridizacija pridelkov PCR s HPV-značilnimi oligonukleotidnimi lovki, ki so vezane na površino netopnega nosilca oz. DNA čipa (imenovanega tudi mikročip, biočip ali genski čip). DNA čipi so lahko sestavljeni iz ene ali več DNA mikromrež, kar omogoča hkratno analizo večjega števila vzorcev v enem eksperimentu. Hibride ponavadi zaznamo s pomočjo fluorescentnih označevalcev s pomočjo posebnih laserskih čitalcev. Nekatere različice testa za zaznavanje hibridov, namesto zaznavanja fluorescence, uporabljajo kromogeno precipitacijo (Poljak in Kocjan, 2010). Za genotipizacijo HPV na osnovi DNA mikromrež je dostopnih več komercialnih testov; najpogosteje je v uporabi PapilloCheck HPV-Screening Test (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Nemčija), s katerim lahko dokažemo 24 genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus*. S kompletom

kemikalij PlexBio HPV Genotyping Kit (PlexBio, Taipei City, Taiwan) lahko opredelimo kar 50 različnih genotipov HPV v enem vzorcu.

Testi, ki temeljijo na tehnologiji Luminex oz. xMAP, uporabljajo polistirenske kroglice, ki so obarvane z različnimi deleži dveh različnih fluoroforov (rdečega in infrardečega). Za hkratno analizo različnih analitov pripravimo mešanico kroglic z različnim absorpcijskim spektrom; kroglice, ki jih uporabimo za genotipizacijo HPV, so povezane z oligonukleotidnimi lovkami, značilnimi za 1 genotip HPV. Genotipizacija poteka na podlagi reverzne hibridizacije. Denaturaciji in hibridizaciji pridelkov PCR (označeni z biotinom) na posamezne lovke sledi njihova vezava s streptavidinom, ki je označen s fluoroforom fikoeritrin. Instrument za analizo omogoča zaznavanje značilnih PCR pridelkov na podlagi fluorescence fikoeritrina in genotipizacijo HPV na podlagi zaznavanja značilnih lovk. Različice te metode so trenutno najbolj občutljive za dokazovanje HPV (Poljak in Kocjan, 2010).

Znanih je več različic metode neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja (sekveniranja) tarčnega odseka DNA. Trenutno so v uporabi različice, ki temeljijo na metodi prekinitve verige DNA, ki jo je razvil Frederick Sanger. Za metodo Dye Terminator Sequencing, ki se trenutno uporablja najpogosteje, je značilno označevanje terminatorjev verige s fluorescentnimi barvili. Glavna prednost tega pristopa, v primerjavi s klasično metodo z radioaktivno označenimi terminatorji, je možnost izvedbe celotne sekvenčne reakcije v eni reakcijski posodici, saj je vsak dideoksinukleotidni terminator verige označen z drugim fluorescentnim barvilom. Zaporedje nukleotidov v tarčni verigi se po končanem sekveniranju poda v obliki kromatograma oz. elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem. Splošne omejitve metode sekveniranja so omejena sposobnost branja nukleotidnih zaporedij, ki so daljša od 700 nukleotidov (daljša zaporedja je potrebno razrezati v krajše odseke), visoka cena, hkrati je možno obdelati relativno nizko število vzorcev, možnost nespecifične vezave DNA polimeraze (priporočljivo je sekveniranje tarčne verige iz obeh koncev) ter pojavljanje neznačilnih signalov (Wu in sod., 2008).

Z izrazom globoko sekveniranje (angl. *deep sequencing*) označujemo sodobne metode neposrednega določanja nt zaporedja, ki omogočajo vzporedno sekveniranje istega dela DNA v zelo kratkem času. Najpogosteje uporabljeni instrumenti za identifikacijo in analiziranje patogenov so: 454 Pyrosequencing System (Roche), Genetic Analyzer (Illumina) in SOLiD (Applied Biosystems) (Chiu in Miller, 2011). Pri pirosekveniranju s tehnologijo 454/GS FLX (Roche) daljše delce ssDNA najprej razrežemo v naključno dolge delce (300-800 bp) ter na oba konca dodamo adaptorje. S pomočjo adaptorjev se posamezni delci povežejo na ustrezne kroglice in se paralelno, več milijonkrat, pomnožijo s pomočjo emPCR (angl. *emulsion PCR*). Pomnoževanju sledi prenos kroglic s pomnoženimi delci DNA v pikotitrsko ploščico. Vsaka vdolbinica pikotitrne ploščice vsebuje 1 delec DNA povezan s kroglico in manjše kroglice, ki nosijo encime, ki so potrebni za izvedbo sekvenčne reakcije. Sekveniranje poteče z encimsko sintezo verige, ki je komplementarna delcu DNA, vezanemu na kroglico. Nukleotidne baze se med reakcijo spirajo preko vdolbinic ploščice, vsaka vezava nove baze pa je povezana s sprostitvijo anorganskega pirofosfata (PPi), ki začne kemijsko reakcijo. Adenozin 5'-fosfosulfat in ATP sulfurilaza pretvorita PPi v ATP (adenozin trifosfat). Encim luciferaza uporabi energijo (ATP) v metabolni reakciji luciferina, katere končni produkt je oddana svetloba, ki jo zaznamo s CCD-kamero in novim vrhom v pirogramu (Margulies in sod., 2005). Glavne prednosti globokega sekveniranja so hitra izvedba, visoka občutljivost in natančnost pridobljenih podatkov. Kljub temu, da se te metode trenutno še ne uporabljajo v rutinski diagnostiki, so z njihovo pomočjo identificirali številne nove viruse (Merkel cell Polyomavirus, Lujo virus, Dandenong virus), uporabne so za zaznavanje redkih rezistenčnih determinant HIV-1, za odkrivanje kontaminantov v cepivih ter za zaznavanje profilov organizmov v kliničnih vzorcih (metagenomika). Pomanjkljivosti omenjenih metod so kratka zaporedja, visoka cena posameznih reakcij ter zahtevna interpretacija klinično pomembnih podatkov (Chiu in Miller, 2011).

Z imenom RNA-seq označujemo različice sodobnejših metod sekveniranja, ki omogočajo neposredno analizo transkriptoma (določanje zaporedij mRNA, nekodirajočih in majhnih RNA). Omenjene metode lahko uporabimo tudi za sekveniranje organizmov, za katere celotni genomi še niso opisani (Wang in sod., 2009; Malone in Oliver, 2011).

2.2.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real-time* PCR; RT-PCR) je nadgrajena različica PCR, ki temelji na zaznavanju oz. kvantifikaciji fluorescentnega signala, ki med samo reakcijo narašča v skladu s količino nastalih pridelkov PCR. Merjenje fluorescence v vsakem temperaturnem ciklu omogoča zaznavanje in kvantifikacijo pridelkov PCR že med samo reakcijo, zato po koncu reakcije navadno ni potrebno izvesti dodatnih analiz. S tem se zmanjša čas trajanja postopka in možnost kontaminacije, saj pomnoževanje in zaznavanje potekata znotraj zaprtega sistema. Rezultati so ovrednoteni na podlagi vrednosti Ct (angl. *threshold cycle*), ki je definirana kot zaporedna številka cikla pri katerem sproščena fluorescenčna svetloba prekorači predhodno določeno mejno vrednost. Ct vrednost je obratno-sorazmerna začetni količini virusne DNA v vzorcu (Wu in sod., 2008).

Za izvajanje RT-PCR sta na razpolago dva tipa fluorescentnih označevalcev: barvila, ki se nespecifično vežejo v DNA (na primer SYBR Green in EvaGreen) in pogosteje specifične lovke kot so: hidrolizne lovke (angl. *TaqMan*), hibridizacijske lovke FRET in molekularna svetila (angl. *Molecular Beacons*, *Scorpion probes*) (Wu in sod., 2008).

PCR v realnem času omogoča razvoj različic hkratne RT-PCR (angl. *multiplex* PCR), za katere je značilno hkratno pomnoževanje in zaznavanje interne kontrole in tarčnih zaporedij v eni reakcijski posodici s pomočjo do 4 različnih fluorescentnih barvil. Za dokazovanje HPV se ponavadi uporabljajo širokospektralni OZ (npr. GP5+/6+) v kombinaciji z OZ za pomnoževanje človeške DNA. S sodobnimi RT-PCR testi lahko hkrati dokažemo več HR-HPV oz. v nekaterih testih HPV16 in 18 ločeno od ostalih HR-HPV. Real Time PCR HPV Detection Kit (HybriBio, Hong Kong) je uporaben za dokazovanje okužbe s skupino 13 HR-HPV genotipov HPV v eni sami reakciji. Z Abbott RealTime High Risk HPV testom lahko podobno dokažemo 14 HR-HPV genotipov (ločeno dokažemo HPV16 in 18 ter združeno še 12 drugih genotipov HPV). Na voljo so tudi testi oz. različice RT-PCR s katerimi lahko v eni reakciji dokazujemo do 4 različne genotipe HPV (npr. 6/11/16/18) (Seaman in sod., 2010).

Kljub široki dostopnosti in ugodnemu razmerju med stroški in učinkovitostjo ima standardna metoda PCR tudi nekatere pomanjkljivosti. Metoda ima v primerjavi z ISH nižjo specifičnost, saj ne omogoča ločevanja med HPV, ki so prisotni v tumorsko spremenjenih celicah in HPV, ki so prisotni v normalnem epitelu, delecija gena L1 pa lahko vodi tudi v znižanje občutljivosti testov, ki temeljijo na dokazovanju tega gena (Cantley in sod., 2011). Pomanjkljivosti RT-PCR (PCR) so uporaba posebnih (dragih) instrumentov, pojavljanje lažno pozitivnih rezultatov, ki so posledica kontaminacije vzorca s pozitivnimi pridelki iz prejšnjih reakcij, izbira nespecifičnih OZ ali neustreznih PCR pogojev. Lažno negativni rezultati so lahko posledica prisotnosti inhibitorjev DNA polimeraze ali encimov, ki razgrajujejo DNA/RNA (Wu in sod., 2008).

2.2.2.2.3 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA

Številne študije so pokazale klinično uporabnost testov s katerimi, namesto DNA, dokazujemo prisotnost mRNA HPV. Najpogosteje dokazujemo prisotnost prepisov genov za virusni beljakovini E6 in E7. Zaznavanje virusne mRNA lahko izvedemo z obratno transkripcijo in PCR v realnem času (rt-RT-PCR) ali s pomnoževanjem, posredovanim s prepisovanjem RNA (angl. *nucleic acid sequence-based amplification*; NASBA). Trenutno na metodi NASBA temelji več komercialno dostopnih testov (npr. APTIMA HPV test; Gen-Probe, San Diego, ZDA) s katerimi lahko dokažemo do 14 različnih genotipov HPV, brez možnosti genotipizacije. V primerjavi s testi, ki temeljijo na zaznavanju HPV-DNA, naj bi imeli ti testi višjo klinično specifičnost za odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu višjih stopenj (Poljak in Kocjan, 2010).

2.3 HPV V POVEZAVI S PCK-UV/-UŽ

2.3.1 Pogled v zgodovino

Zgodovinska poročila, v katerih so strokovnjaki poročali o maligni preobrazbi ponavljajočega papiloma grla v ploščatocelični karcinom (PCK) delno segajo v štirideseta in petdeseta leta 20. stoletja. Zanimivo je, da že zgodnja poročila opisujejo tudi do 5-6x

večje tveganje žensk z rakom materničnega vratu za razvoj raka v ustni votlini (zur Hausen, 2009).

Syrjänen in sodelavci so že leta 1983 z IHK dokazali HPV antigene v tkivnih vzorcih fokalne epitelne hiperplazije in ploščatoceličnih papilomov ustne votline. Nadaljni dokaz antigenov HPV v predrakavih spremembah ustnega dela žrela je vzpodbudil prva namigovanja o možni vlogi HPV v nastanku PCK-UV/-UŽ (Syrjänen in sod., 1983; zur Hausen, 2009).

Prva poročila o prisotnosti določenih genotipov HPV v vzorcih PCK-UŽ izhajajo iz leta 1985. Takrat so testirali 13 vzorcev karcinomov, od katerih so trije vsebovali DNA HPV16, en vzorec je bil pozitiven na HPV11, medtem ko je en vseboval DNA HPV27 (Löning in sod., 1985; de Villiers in sod., 1985).

V nadaljnjih letih je veliko število raziskav potrdilo te podatke. Med testiranimi karcinomi je odstotek HPV-pozitivnih vzorcev variiral med 25 in 60 % (zur Hausen, 2009). Weinberger in sodelavci so leta 2006 naredili bolj podrobno analizo vzorcev PCK-UŽ. DNA HPV16 so dokazali v 61 % testiranih vzorcev, od teh so v 23 % dokazali izražanje celične beljakovine p16. To odkritje je vzpodbudilo razmišljanja ali je mogoče, da so nekateri HPV-DNA pozitivni tumorji kontaminirani s HPV16 (zur Hausen, 2009).

2.3.2 Epidemiologija PCK-UV/-UŽ

PCK v predelu glave in vratu se pojavlja v zgornjem delu dihalnega trakta: v ustni votlini, ustnem delu žrela, spodnjem delu žrela in v grlu. Leta 2002 so diagnosticirali približno 405 tisoč novih primerov raka glave in vratu; istega leta je po vsem svetu za posledicami te bolezni umrlo 211 tisoč ljudi (Parkin in Bray, 2006; Giuliano in sod., 2008). Kot skupina, različne vrste raka glave in vratu, predstavljajo peto najpogostejšo obliko raka, ki je še posebej pogosta v državah južne in osrednje Azije (St Guily in sod., 2011).

Večino primerov PCK-UV/-UŽ povezujejo z uživanjem alkohola in kajenjem tobačnih izdelkov; bolezen se najpogosteje razvije v starosti 60-80 let. Pri 15-20 % obolelih

izključujejo povezavo s predhodno omenjenima dejavnikoma tveganja in predvidevajo, da so za razvoj raka v teh primerih odgovorni drugi etiološki dejavniki (Hoffman in sod., 1998). V zadnjih letih so v ZDA zabeležili naraščanje deleža raka ustnega dela žrela pri mlajših odraslih osebah in osebah, ki nikoli niso kadile, medtem ko incidenca raka v predelu ustne votline, spodnjega dela žrela in grla pada premosorazmerno s padanjem deleža kadilcev. Predvidevajo, da je povišanje incidence raka ustnega dela žrela povezano s spremembami v spolnih navadah in posledičnim povišanjem deleža HPV-DNA pozitivnih tumorjev (Sturgis in Cinciripini, 2007).

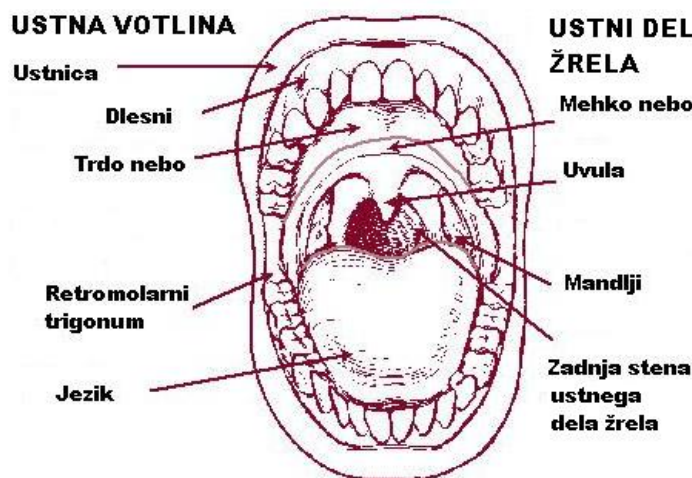
V zadnjih desetletjih so do 60 % raka ustnega dela žrela povezali z onkogenimi genotipi HPV, medtem ko je seroprevalenca in/ali prevalenca HPV-DNA v primerih PCK ostalih predelov glave in vratu veliko nižja, najpogosteje manj kot 20 %. Podobno kot pri vseh ostalih novotvorbah, povezanih s HPV, je tudi pri raku glave in vratu najpogosteje identificiran genotip HPV16, ki mu sledi genotip HPV18 (Giuliano in sod., 2008).

2.3.3 Etiologija PCK-UV/-UŽ

Etiologija malignih novotvorb ustne votline in ustnega dela žrela še ni povsem pojasnjena. Kot možne etiološke dejavnike za nastanek PCK v teh predelih omenjajo kajenje in z njim povezano kemično ter toplotno draženje, prekomerno uživanje alkohola, sevanje, nizek ekonomski status, slabo ustno higieno, mehanske poškodbe epitela, pomanjkanje vitaminov A, B in C, imunsko oslABLjenost, oralne spolne odnose ter prisotnost HR-HPV. V primeru izpostavljenosti večjemu številu dejavnikov tveganja hkrati, se verjetnost maligne pretvorbe celic ploščatoceličnega epitela poveča (Kansky in sod., 2003; Kreimer in sod., 2005; Syrjänen in sod., 2011).

2.3.4 Klinična slika, napoved poteka bolezni in zdravljenje

Najpogostejše sub-lokalizacije HPV-pozitivnega PCK ustne votline so jezik, ustno dno in retromolarni trigonum. Najpogostejše prizadeti deli ustnega dela žrela so: mandlji, koren jezika in mehko nebo (Slika 3) (Galvao Castro in Bussoloti, 2006).



Slika 3: Ustna votlina in ustni del žrela (SEEK Training Modules, 2011)

HPV-pozitivni in HPV-negativni tumorji se pojavljajo v enakih, s sluznico prekritih, predelih glave in vratu, vendar se razlikujejo v molekularni biologiji, epidemiologiji, klinični sliki in napovedi poteka bolezni (prognozi). Za HPV-pozitivne tumorje je značilna slabša diferenciranost, povečane bezgavke v predelu vratu in možnost prenosa okužbe med spolnimi odnosi. Bolniki s HPV-pozitivnimi malignimi spremembami so mlajši od 50 let, opredeljujejo se kot nekadilci ali le občasni kadilci in uživajo manjše količine alkohola. Kljub temu, da pri tej skupini bolnikov diagnozo ponavadi postavijo relativno pozno, je za to obliko raka značilna boljša prognoza, s 60-80 % nižjim tveganjem smrtnega izida, v primerjavi s tveganjem smrtnega izida pri bolnikih s HPV-negativnimi karcinomi. Bolniki s HPV-pozitivnimi tumorji se bolje odzivajo na kemoterapijo in terapijo z radioaktivnim sevanjem, redkeje pride do razvoja zasevkov raka v drugih predelih telesa in ponovitve bolezni na istem mestu. Dodatno podporo teoriji obstoja dveh različnih poti karcinogeneze raka v predelu glave in vratu (razlikovanje med rakom, ki je posledica kajenja/uživanja alkohola in HPV-pozitivnimi karcinomi) nudijo razlike v izražanju molekularnih markerjev (npr. p16, EGFR, nm23, Ki-67, p53). Celična beljakovina p16 je v HR-HPV pozitivnih celicah prekomerno izražena kot posledica delovanja virusne beljakovine E7, ki inaktivira pRB (Snietura in sod., 2011). Možnih je več razlag za boljšo prognozo HPV-pozitivnega raka ustne votline in ustnega dela žrela: celice, okužene s HPV, so slabše preskrbljene s kisikom in izpostavljene apoptozi, prizadeto je relativno majhno področje,

zdravljenje izboljša lokalni imunski odziv, ki omogoča izkoreninjenje okužbe s HPV in posledično regresijo tumorja (Syrjänen, 2010).

2.3.5 Prevalenca HPV v PCK-UV/-UŽ

Prevalenca je mera s katero določamo breme določenega dejavnika tveganja v izbranih vzorcih in jo izražamo v odstotkih (%). Izračunamo jo tako, da število vzorcev, pri katerih smo ugotovili prisotnost določenega dejavnika tveganja, delimo s skupnim številom vzorcev, ki smo jih vključili v raziskavo (Gordis, 2004).

Prevalenca okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV v vzorcih PCK-UV in PCK-UŽ, se v doslej objavljenih raziskavah močno razlikuje (Syrjänen in sod., 2011). Razlike v prevalenci najverjetneje izhajajo iz razlik v vrsti oz. mestu nastanka tumorja ter odvzemu reprezentativnega vzorca, saj je prevalenca HPV v PCK-UV relativno nizka, medtem ko je v PCK-UŽ, predvsem v predelu mandljev, višja. Možni vzroki za višjo prevalenco HPV v predelu mandljev so dostopnost mesta za okužbo, metaplastični procesi v ploščatoeličnem epitelu, kripte epitela, ki virusu olajšajo dostop do bazalnih celic in citokini, ki vplivajo na prepisovanje HPV in transformacijo celic (Szentirmay in sod., 2005). Za epitel v predelu mandljev je značilna visoka vsebnost limfocitov, in s tem večja prepustnost in olajšan prehod virusnih delcev skozi epitel do bazalnih celic. Razhajanja med poročili različnih raziskovalcev so prav tako lahko posledica testiranja različno ohranjenih tkivnih vzorcev, različnega števila analiziranih vzorcev, naraščanja števila HPV-pozitivnih tumorjev ustne votline in ustnega dela žrela v zadnjih desetletjih, predvsem v zahodnih državah, kot posledica sprememb spolnih navad. Nenazadnje so razlike v HPV-prevalenci prav tako lahko posledica epidemioloških razlik, razlik v življenjskem slogu ljudi (uživanje alkohola, kajenje) ter uporabe različno občutljivih metod za dokazovanje in genotipizacijo HPV-DNA in nenazadnje nekritičnega opredeljevanja rezultatov molekularnih metod. Najbolj razširjene metode dokazovanja in genotipizacije HPV-DNA temeljijo na pomnoževanju virusne DNA z različicami PCR. Za te metode je značilna visoka občutljivost, saj lahko z njimi zaznamo tudi zelo majhno število kopij virusne DNA v vzorcu, kar pa lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov (Kansky in sod., 2003; Kreimer in sod., 2005; Smeets in sod., 2007).

V preglednicah 1 in 2 sta prikazana pregleda najpomembnejših raziskav, kjer so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ uporabljali metodo PCR. V pregled objav smo, zaradi boljše primerljivosti z rezultati naše raziskave, vključili le raziskave, v katerih so bili uporabljeni tkivni vzorci, fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin (angl. *formalin fixed, paraffin embedded*; FFPE). Občutljivost PCR pri uporabi sveže zamrznjenih tkivnih vzorcev je veliko višja kot pri uporabi vzorcev FFPE (Nuovo, 2011).

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših raziskav, v katerih so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV uporabljali metodo PCR

Raziskovalna skupina	Leto objave	Izvor vzorca	Uporabljeni OZ	HPV-DNA pozitivni/ št. PCK-UV	Prevalenca HPV (%)	Dokazani genotipi HPV
Holladay in Gerald	1993	FFPE	MY09/11	7/39	17,9	16,18
Noble-Topham in sod.	1993	FFPE	TS-PCR	12/25	48,0	16, 18
Ostwald in sod.	1994	FF+ FFPE	MY09/11, GP5+/6+	16/26	61,5	16,18
Balaram in sod..	1995	FF+ FFPE	MY09/11, GP5/6, TS-PCR	67/91	73,6	6, 11, 16, 18
Shindoh in sod.	1995	FFPE	TS-PCR	24/77	31,2	16, 18
Snijders in sod.	1996	FF+ FFPE	GP5/6	5/20	20,0	16
Fouret in sod.	1997	FFPE	WD72/76+, WD66/67/154	3/12	25,0	16, 31
Wen in sod.	1997	FFPE	TS-PCR	14/45	31,1	16,18
Schwartz in sod.	1998	FFPE	MY09/11	41/139	21,2	6, 11, 16, 18
Tsuhako in sod.	2000	FFPE	TS-PCR	48/83	57,8	6, 11, 16, 18
Cao in sod.	2000	FFPE	TS-PCR	29/40	72,5	16, 18
Mork in sod.	2001	FFPE	GP5+/6+, CpI/CpIIIG	10/59	16,9	6, 11, 16, 33
Premoli-De-Percoco in Ramirez	2001	FFPE	TS-PCR	30/50	60,0	16, 18
Nagpal in sod.	2002	FF+ FFPE	MY09/11	37/110	33,6	16, 18
Kansky in sod.	2003	FFPE	PGMY09/11, GP5+/6+, WD72/76+, WD66/67/154	5/59	8,4	16, 33, 58
Sugiyama in sod.	2003	FFPE	TS-PCR	30/86	34,9	16, 18
Chang in sod.	2003	FFPE	MY09/GP6+	51/103	49,5	6, 11, 16, 18, 33
Smith in sod.	2004	FFPE	MY09/11	10/106	9,4	16, 33
Nemes in sod.	2006	FFPE	MY09/11	33/79	41,4	16

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših raziskav, v katerih so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV uporabljali metodo PCR

Raziskovalna skupina	Leto objave	Izvor vzorca	Uporabljeni OZ	HPV-DNA pozitivni/ št. PCK-UV	Prevalenca HPV (%)	Dokazani genotipi HPV
Smeets in sod.	2007	FFPE	GP5+/6+	9/30	30,0	np
Greer in sod.	2008	FFPE	np	4/26	15,0	np
Llamas-Martinez in sod.	2008	FFPE	WD72/76+, WD66/67/154	13/33	39,4	6, 11, 16, 31
Ishibashi in sod.	2011	FFPE	MY09/11, GP 5+/6+	12/50	18,0	16, 31, 58
Skupaj				510/1388	36,7	

Legenda: PCK-UV – ploščatocelični karcinom ustne votline, FFPE- tkivni vzorci fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin (angl. *formalin fixed, paraffin embedded*), FF- zamrznjeni vzorci, ki niso fiksirani (angl. *fresh frozen*), OZ-oligonukleotidni začetniki, TS-PCR- genotipsko značilni PCR (angl. *type-specific PCR*), np- ni podatka.

V 21 izbranih raziskavah, v katerih so testirali tkivne vzorce PCK-UV, se je opazovana prevalenca HPV gibala med 8,4 in 73,6 %. Skupna prevalenca HPV je znašala 36,7 %. V raziskave so bili vključeni najmanj 4 in največ 110 tkivnih vzorcev. V vseh raziskavah je bil v HPV-DNA pozitivnih vzorcih največkrat dokazan HPV16, sledili so HPV6, 11, 18, 31, 33 in 58.

V edini doslej objavljeni raziskavi v Sloveniji, so DNA primerne kakovosti osamili iz 59/62 tkivnih vzorcev PCK-UV in iz 61/62 tkivnih vzorcev histološko normalne ustne sluznice. Vzorci so bili odvzeti skupinama bolnikov, ki sta se ujemali v starosti (44-78 let; povprečje 58 let), spolu, mestu odvzema vzorca ter pogostosti kajenja in uživanja alkohola. HPV-DNA so dokazali v 8,4 % tkivnih vzorcev PCK-UV in 6,6 % tkivnih vzorcev normalne ustne sluznice- na podlagi rezultatov svoje raziskave so postavili hipotezo, da je prisotnost HPV-DNA v tkivnih vzorcih PCK-UV lahko posledica naključne kolonizacije virusa v ustni sluznici in, da je vloga HPV v etiopatogenezi velikega odstotka PCK-UV v Sloveniji stranskega pomena (Kansky in sod., 2003).

Preglednica 2: Pregled najpomembnejših raziskav, v katerih so raziskovalci za dokazovanje okužbe s HPV v tkivnih vzorcih PCK-UŽ uporabljali metodo PCR

Raziskovalna skupina	Leto objave	Izvor vzorca	Uporabljeni OZ	HPV-DNA pozitivni/ št. PCK-UŽ	Prevalenca HPV (%)	Dokazani genotipi HPV
Snijders in sod.	1996	FF+ FFPE	GP5/6	2/7	28,6	16
Fouret in sod.	1997	FFPE	WD72/76+, WD66/67/154	10/58	17,2	16
Schwartz in sod.	1998	FFPE	MY09/11	23/55	41,8	6, 11, 16, 18
Kleist in sod.	2000	FFPE	MY09/11	2/12	16,7	16, 18
Tsuhako in sod.	2000	FFPE	TS-PCR	8/17	52,9	6, 11, 16, 18
Mork in sod.	2001	FFPE	GP5+/6+, CpI/CpIIIG	12/18	66,7	16
Klussman in sod.	2001	FFPE	A10/A5-A6/A8, CP62/70- CP65/69a	15/33	45,5	16, 33
Lindel in sod.	2001	FFPE	SPF10	14/99	14,1	16, 33, 35
Strome in sod.	2002	FFPE	MY09/11, L1 6582-23D/7033- 22U	24/52	46,2	16
Mellin in sod.	2003	FFPE	GP5+/6+	27/60	45,0	16, 33
Li in sod.	2003	FFPE	GP5+/6+, A10/A5-A6/A8, CP65/70ct- CP66/69ct	31/67	46,3	16
Smith in sod.	2004	FFPE	MY09/11	24/65	36,9	16, 18, 33
Smeets in sod.	2007	FFPE	GP5+/6+	7/18	38,9	np
Shi in sod.	2009	FFPE	TS-PCR	73/111	66,0	16
Agoston in sod.	2010	FFPE	TS-PCR	74/102	72,5	16,18
Glombitza in sod.	2010	FFPE	MY09/11+ 125	17/36	47,2	16,13
Hannisdal in sod.	2010	FFPE	GP5+/6+	71/137	52,0	16, 18, 16/31, 31, 33, 67
Hong in sod.	2010	FFPE	np	110/300	36,6	16, 18, 16/35, 16/33, 16/39, 16/56, 16/82, 16/59, 35, 33, 56, 59
Ribeiro in sod.	2011	FFPE	PGMY09/11; TS-PCR	1/136; 3/68	0,7; 4,4	16
Skupaj				548/1451	37,8	

Legenda: PCK-UŽ – ploščatocelični karcinom ustnega dela žrela, FFPE- tkivni vzorci fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin (angl. *formalin fixed, paraffin embedded*), FF- zamrznjeni vzorci, ki niso fiksirani (angl. *fresh frozen*), OZ- oligonukleotidni začetniki, TS-PCR- tipsko-specifični PCR, np- ni podatka.

V 19 izbranih raziskavah, v katerih so testirali tkivne vzorce PCK-UŽ, se je opazovala prevalenca HPV gibala med 0,7 in 72,5 %. Skupna prevalenca HPV je znašala 37,8 %. V raziskave je bilo vključenih najmanj 7 in največ 300 tkivnih vzorcev. V vzorcih PCK-UŽ so najpogosteje dokazali HPV16, redkeje HPV6, 11, 18, 31, 33, 35, 39, 56, 59, 67 in 82.

2.3.6 Tumorogena aktivnost virusa

V nasprotju z raziskavami malignih tumorjev anogenitalnega področja, samo dokazovanje HPV-DNA v tkivnih vzorcih karcinomov iz predela glave in vratu ne zadostuje za sklepanje o vzročni zvezi med HPV in novotvorbami, saj je možno, da je virus v teh vzorcih prisoten zgolj naključno, npr. kot kontaminant ali v latentni neaktivni obliki (Wang-Johanning in sod., 2002; Kansky in sod., 2003; Kreimer in sod., 2005). Zato je v teh novotvorbah, poleg HPV-DNA, potrebno dokazati tudi virusno aktivnost. Dokazovanje tumorogene virusne aktivnosti najpogosteje poteka z dokazovanjem celične beljakovine p16, katere povečana raven nakazuje na nenormalno virusno aktivnost, z dokazovanjem mRNA E6 in E7 HR-HPV in z ISH, ki omogoča dokazovanje HPV-DNA v jedru rakavo spremenjenih celic (Wang-Johanning in sod., 2002; Kreimer in sod., 2005).

Preglednica 3 prikazuje pregled najpomembnejših raziskav, kjer so HPV-DNA v tkivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ dokazovali z uporabo ISH.

Preglednica 3: Pregled najpomembnejših raziskav, pri katerih so raziskovalci za dokazovanje HPV v tkivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ uporabljali ISH

Raziskovalna skupina	Leto objave	HPV-pozitivni/ št. primerov (%)	Genotip HPV
Syrjänen in sod.	1986	1/2 (50,0)	16
Maitland in sod.	1987	7/15 (46,7)	np
Chang in sod.	1989	13/17 (76,5)	16
Zeuss in sod.	1991	0/15	/
Young in Min	1991	0/17	/
Cox in sod.	1993	4/8 (50,0)	16
Cerovac in sod.	1996	5/25 (20,0)	16, 18, 6
Premoli-de Percoco in sod.	1998	35/50 (70,0)	16, 18, 6, 11
Bustos in sod.	1999	8/32 (25,0)	16
Shi in sod.	2009	62/106 (58,5)	16

Legenda: np- ni podatka

Kot je razvidno iz zgornje preglednice so v raziskave vključili najmanj 2 in največ 106 tkivnih vzorcev PCK-UV in PCK-UŽ. Prisotnost HPV-DNA v jedru tumorsko spremenjenih celic so dokazali v največ 76,5 % testiranih vzorcih, v dveh raziskavah pa prisotnosti HPV-DNA niso dokazali. V vseh vzorcih PCK je bil najpogosteje dokazan HPV16.

V preglednici 4 je prikazan pregled objav v katerih so v PCK-UV/-UŽ ugotavljali prisotnost HPV-DNA, izražanje mRNA E6/E7 in/ali izražanje celične beljakovine p16.

Preglednica 4: Pregled objav v katerih so dokazovali HPV status, mRNA E6 in/ali E7 in p16 in v vzorcih PCK-UV/-UŽ

Raziskovalna skupina	Leto objave	HPV-DNA +/- št. primerov (%)	E6/E7 mRNA/ št. primerov (%)	p16 +/- št. primerov (%)
Ke in sod.	1999	nt	7/10 (70,0)	nt
Braakhuis in sod.	2004	143/143 (100,0)	12/143 (8,4)	nt
Nemes in sod.	2006	33/79 (41,4)	nt	13/79 (16,5)
Bhawal in sod.	2007	8/22 (36,0)	8/22 (36,0)	nt
Smeets in sod.	2007	16/48 (33,3)	nt	18/44 (40,9)
Greer in sod.	2008	4/26 (15,0)	nt	15/29 (52,0)
Shi in sod.	2009	nt	73/111 (66,0)	72/111 (65,0)
Yamakawa-Kakuta in sod.	2009	nt	11/71 (15,5)	nt
Mendelson in sod.	2010	1/41 (9,1)	nt	6/41 (35,3)
Angiero in sod.	2010	3/11 (27,3)	nt	6/11 (54,5)
Ishibashi in sod.	2011	11/50 (22,0)	nt	10/50 (20,0)

Legenda: nt- ni bilo testirano

V raziskave izražanja genov, ki nosijo zapis za beljakovini E6/E7 so vključili najmanj 10 in največ 111 tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ; odstotek mRNA E6/E7 pozitivnih tkivnih vzorcev se je gibal med 8,4 in 70,0 %. V raziskavah, kjer so poleg mRNA E6/E7 dokazovali tudi HPV-DNA, je bil delež mRNA E6/E7 pozitivnih vzorcev manjši ali enak deležu HPV-DNA pozitivnih vzorcev.

Kot je razvidno iz Preglednice 4 so v raziskave dokazovanja p16 vključili najmanj 11 in največ 111 tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ. Povišano izražanje celične beljakovine p16 so dokazali v najmanj 14,6 % in največ 65,0 % tkivnih vzorcev. V raziskavah, kjer so poleg dokazovanja p16 dokazovali tudi HPV-DNA, je bil delež tkivnih vzorcev s prekomernim izražanjem celične beljakovine p16, v večini raziskav, višji v primerjavi z deležem HPV-DNA pozitivnih vzorcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

V raziskavo smo vključili 47 arhivskih tkivnih vzorcev, odvzetih pri istem številu bolnikov s histološko potrjeno diagnozo PCK-UV/-UŽ. Vzorce, ki so bili bolnikom odvzeti v letih 2005-2007 in so bili fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin, smo pridobili iz histopatološkega arhiva Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Med bolniki s PCK so prevladovali moški, ki so predstavljali 74,5 % (35/47) bolnikov, 25,5 % (12/47) bolnikov je bilo ženskega spola. Povprečna starost bolnikov ob odvzemu vzorca je bila 60 let, najmlajši je bil star 41 let, najstarejši pa 85 let. Povprečna starost se ni bistveno razlikovala po spolu, saj je pri moških znašala 59 let, pri ženskah pa 64 let.

Od 47 vključenih vzorcev, je bilo 20 (42,6 %) PCK-UV in 18 (38,3 %) PCK-UŽ. Za 9 vzorcev nismo uspeli pridobiti podatkov o natančni lokalizaciji karcinoma.

3.2 METODE

3.2.1 Postopek osamitve DNA

Za osamitev celokupne DNA iz arhivskih tkivnih vzorcev smo uporabili komplet kemikalij QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Postopek osamitve DNA smo izvedli po modificiranem internem postopku, pri katerem ne odstranjujemo parafina. Za osamitev DNA posameznega vzorca smo uporabili 3-5 tkivnih rezin, debelih 10 µm.

V reakcijske tubice s tkivnimi rezinami smo najprej dodali 20 µl encima proteinaza K in 200 µl pufra ATL ter vsebine tubic premešali na mešalu Top Mix FB15024 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemčija). Sledila je preko-nočna inkubacija vzorcev v termobloku Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) pri 56 °C in 400 obratih na minuto (angl. *rotations per minute*; rpm). Naslednji dan smo vzorce na kratko centrifugirali v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf) in jih natančno 1 uro inkubirali pri 90 °C. Sledilo je kratko centrifugiranje, nato smo dodali 200 µl pufra AL in

vsebine tubic 15 sekund mešali na mešalu. Vzorce smo kratko centrifugirali. Dodali smo 200 µl 96-100 % etanola, 15 sekund mešali na mešalu in na kratko centrifugirali. V stojalo smo si pripravili zbiralne tubice s kolonicami, ki so bile del kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), in na kolonice prenesli celotne vsebine reakcijskih tubic. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje na 8000 rpm. Kolonice smo zopet prestavili v nove zbiralne tubice, dodali 500 µl spiralnega pufra AW1 in centrifugirali 1 minuto na 8000 rpm. Kolonice smo prestavili v nove zbiralne tubice, dodali 500 µl spiralnega pufra AW2 in centrifugirali 3 minute na 14000 rpm. Kolonice smo prestavili v nove zbiralne tubice in centrifugirali 1 minuto na 14000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo kolonice prestavili v sterilne reakcijske tubice, dodali 100 µl elucijskega pufra AE in 5 minut inkubirali na sobni temperaturi. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje na 8000 rpm. Kolonice smo zavrgli in osamljeno DNA shranili pri 4 °C v primeru takojšnje uporabe ali pri -20 °C za daljše obdobje.

Koncentracijo osamljene DNA v posameznih vzorcih smo določili s pomočjo aparature NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija). Omenjena aparatura na podlagi spektrofotometrične meritve omogoča kvantifikacijo nukleinskih kislin in beljakovin v vzorcu v ng/µl.

3.2.2 Postopek osamitve RNA

Za vse HPV-DNA pozitivne in 10 HPV-DNA negativnih PCK-UV/-UŽ smo iz Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pridobili dodatne rezine tkivnih količkov in iz njih osamili celokupno RNA. V ta namen smo uporabili komercialno dostopen RNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki je prilagojen osamitvi RNA iz FFPE vzorcev. Postopek osamitve RNA smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca uporabljenega kompleta kemikalij. Za osamitev celokupne RNA iz posameznega vzorca smo uporabili 4 tkivne rezine, debeline 10 µm. Postopek osamitve smo začeli z deparafinizacijo tkivnih rezin. Najprej smo v reakcijske tubice s tkivnimi rezinami dodali 1 ml ksilena in vsebine tubic 10 sekund mešali na mešalu Top Mix FB15024 (Fisher Scientific). Nato smo izvedli 2-minutno centrifugiranje na 13500 rpm v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf). Supernatant smo s pomočjo pipete previdno

odstranili in ga zavrgli. V tubice z usedlino smo dodali 1 ml 96-100 % etanola, s katerim smo odstranili ostanke ksilena, premešali na mešalu in 2 minuti centrifugirali na 13500 rpm v centrifugi. Supernatant in morebitne ostanke etanola smo previdno odstranili s pomočjo pipete. Sledila je 10-minutna inkubacija na sobni temperaturi, pri kateri smo pokrovčke tubic pustili odprte in tako omogočili, da je etanol popolnoma izhlapel. V tubice smo nato dodali 240 µl puфра PKD in vsebine tubic premešali na mešalu. Sledilo je kratko centrifugiranje. V tubice smo nato dodali 10 µl proteinaze K, s pomočjo katere smo iz celic sprostili nukleinske kisline, in vsebine premešali s pomočjo pipete. Sledili sta 15-minutna inkubacija pri 56 °C in 15-minutna inkubacija pri 80 °C. Tubice smo 3 minute inkubirali na ledu in centrifugirali 15 minut na 13500 rpm. Supernatant smo previdno prenesli v nove reakcijske tubice in dodali 24 µl (1/10 skupnega volumna) puфра DNase Booster in 10 µl DNaze I, s katero smo iz vzorca odstranili genomsko DNA. Vsebine tubic smo premešali z obračanjem zaprtih tubic in kratko centrifugirali. Sledila je 15-minutna inkubacija na sobni temperaturi. Nato smo dodali 500 µl puфра RBC, s katerim smo prilagodili pogoje vezave RNA in, s pomočjo mešala, lizate dobro premešali. Dodali smo 1200 µl 100 % etanola in vsebine tubic premešali s pipeto. Nato smo 700 µl vzorca prenesli v ločevalne kolonice, vstavljene v 2 ml zbiralne tubice. Sledilo je 15-sekundno centrifugiranje na 10000 rpm. Kolonice smo prestavili v nove zbiralne tubice in jih ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Kolonice smo prestavili v nove zbiralne tubice in dodali 500 µl puфра RPE. Sledilo je 15-sekundno centrifugiranje na 10000 rpm. Zbiralne tubice z izločkom smo zavrgli, kolonice pa prestavili v nove zbiralne tubice. Ponovno smo dodali 500 µl puфра RPE in centrifugirali 2 minuti na 10000 rpm ter tako sprali membrane kolonic. Kolonice smo prestavili v nove zbiralne tubice in kolonice z odprtimi pokrovčki centrifugirali 5 minut na 13500 rpm. S tem korakom smo odstranili ostanke etanola in osušili membrane kolonic. Kolonice smo nato vstavili v sterilne reakcijske tubice in neposredno na membrano dodali 25 µl vode brez RNaze. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje na 13500 rpm. Po končanem centrifugiranju smo kolonice zavrgli, osamljeno RNA pa shranili pri -20 °C v primeru takojšnje uporabe ali pri -70 °C za daljše obdobje.

RNeasy FFPE kit (Qiagen), po zagotovilih proizvajalca, omogoča odstranitev večine celične DNA iz vzorca. V kolikor želimo celokupno RNA osamiti iz velike količine vzorca ali vzorca, ki vsebuje velike količine genomske (virusne) DNA, moramo upoštevati, da

kljub doslednemu upoštevanju navodil proizvajalca, lahko naš izolat še vedno vsebuje majhne količine DNA. Z namenom, da bi preverili ali so naši izolati RNA kontaminirani z ostanki DNA, smo le-te pomnožili po standardnem rt-RT-PCR postopku (najprej poteče obratna transkripcija RNA v komplementarno DNA (angl. *complementary DNA*, cDNA), kar omogoča encim reverzna transkriptaza, drugi korak pa je pomnoževanje cDNA z RT-PCR), pri katerem smo izpustili obratno transkripcijo. V RNA vzorcih smo preverjali prisotnost tako ostankov tako človeške kot tudi virusne DNA.

Koncentracijo osamljene RNA v posameznih vzorcih smo določili s pomočjo aparature NanoDrop 2000c (NanoDrop Technologies).

3.2.3 Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnosti zaviralcev PCR

Kakovost osamljene DNA in odsotnost zaviralcev PCR smo preverili z RT-PCR z oligonukleotidnima začetnikoma (OZ) GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') in PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'), ki omogočata pomnoževanje 268 bp velikega dela gena za človeški beta-globin (Greer in sod., 1994). Za pomnoževanje človeške DNA smo uporabili računalniško vodeni sistem LightCycler Instrument tip 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija).

Za pomnoževanje smo uporabili komercialno dostopno mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH). Za posamezen vzorec smo v sterilno reakcijsko kapilaro odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice in 5 µl HPV DNA. Optimalna koncentracija DNA v posamezni reakciji je 100 ng/25 µl skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z deionizirano vodo. Vsebino posamezne reakcijske mešanice RT-PCR smo pripravili po navodilih proizvajalca in je prikazana v Preglednici 5.

Preglednica 5: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 268 bp velikega dela za človeški beta-globin

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (μl)	Končna koncentracija
LC - FastStart DNA Master SYBER Green I	2,5	1X
MgCl ₂ (25mM)	3	4,8 mM
Primer GH20 (50 μM)	0,25	0,5 μM
Primer PC04 (50 μM)	0,25	0,5 μM
dH ₂ O	14	
Skupni volumen reakcijske mešanice	20	
DNA	5	
Skupni reakcijski volumen	25	

Pomnoževanje 268 bp velikega dela gena za človeški beta-globin smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla RT-PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 15 s pri 95 °C (*ramp rate*: 20 °C/s), 4 s pri 67 °C (20 °C/s) in 10 s na 72 °C (20 °C/s). Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 10 min inkubirali pri 95 °C (20 °C/s), kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo dvoverižne DNA in aktivacijo termostabilnega encima FastStart Taq DNA polimeraza. Pomnoževanju DNA je sledilo preverjanje specifičnosti pridelkov PCR z analizo talilne krivulje (angl. *melting curve analysis*). Metodo smo izvedli z enkratnim temperaturnim ciklom: 0 s pri 95 °C (20 °C), 30 s pri 72 °C (20 °C/s) in 0 s pri 95 °C (0,1 °C/s). Ohlajanje je potekalo 30 s pri 40 °C (20 °C/s). Kot beta-globin pozitivne smo opredelili vzorce z vrednostmi talilne temperature pridelkov PCR (T_m , angl. *melting temperature*) 88-89 °C oziroma enakim T_m kot je bil T_m pozitivne kontrole RT-PCR.

3.2.4 Preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR

Za preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR smo uporabili rt-RT-PCR. Uporabili smo enostopenjski protokol, ki omogoča izvedbo obratne transkripcije in pomnoževanja v eni reakcijski posodici. Prednost te metode je krajši čas priprave reakcije, nižja cena in manj ravnanja z izvornimi vzorci. Negativna lastnost te metode je, da pridelkov obratne transkripcije ne moremo uporabiti za pomnoževanje drugih genov (Wacker in Godard, 2005).

Za dokazovanje človeške RNA smo uporabili OZ RibPS9-F (5'-ATCCGCCAGCGCCATA-3') in RibPS9-R (5'-TCAATGTGCTTCTGGGAATCC-3'), ki omogočata pomnoževanje 85 bp velikega odseka ribosomske RNA (rRNA), ki nosi zapis za beljakovino S9 ter lovko RibPS9-Probe (5'-LC610-AGCAGGTGGTGAACATCCCGTCCTT-BBQ-3') (Wang-Johanning in sod., 2002).

Za rt-RT-PCR smo uporabili računalniško vodeni sistem LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija). Protokol poteka reakcije smo razvili na podlagi priloženih navodil komercialno dostopnega kompleta kemikalij LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics GmbH), ki smo ga ustrezno prilagodili predvideni dolžini PCR pridelkov, lastnostim tarčnega nukleotidnega zaporedja, lastnostim sintetiziranih OZ in lovke ter uporabljeni aparaturi za rt-RT-PCR.

Za posamezen vzorec smo v luknjico mikrotitrne ploščice odpipetirali 15 µl reakcijske mešanice in 5 µl osamljene RNA. Optimalna koncentracija RNA v posamezni reakciji je 100 ng na 20 µl skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z vodo, ki ni vsebovala RNaze. Vsebinsko posamezne reakcijske mešanice smo pripravili po navodilih proizvajalca in je prikazana v Preglednici 6.

Preglednica 6: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za obratno transkripcijo RNA in pomnoževanje 85 bp velikega dela gena, ki nosi zapis za beljakovino S9

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (µl)	Končna koncentracija
LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (2,7x konc.)	7,4	1X
Enhancer (20x conc)	1,0	1X
Aktivator (50mM)	1,3	3,25 mM Mn(OAc) ₂
RibPS9-F (50µM)	0,2	0,5 µM
RibPS9-R (50µM)	0,2	0,5 µM
RibPS9-Probe LC610 (20µM)	0,25	0,25 µM
H ₂ O brez RNaze	4,65	
Skupni volumen reakcijske mešanice	15	
RNA	5	
Skupni reakcijski volumen	20	

Pomnoževanje cDNA smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 15 s pri 95 °C (4,4 °C/s), 60 s pri 60 °C (2,2 °C/s) in 1 s pri 72 °C (4,4 °C/s) (merjenje fluorescence). Pred pomnoževanjem cDNA je 3 min pri 63 °C (4,4 °C/s) potekala obratna transkripcija in 30-sekundna denaturacija pri 95 °C (4,4 °C/s). Pomnoževanju je sledilo 10-sekundno ohlajanje pri 40 °C (2,2 °C/s).

Kot RNA pozitivne smo opredelili vzorce s Ct vrednostjo 40 ali manj.

3.2.5 Dokazovanje HPV-DNA

3.2.5.1 Dokazovanje HPV-DNA z začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68

Za dokazovanje klinično najbolj pomembnih HPV iz rodu alfa smo uporabili PCR s skupinsko-značilnimi OZ GP5+/6+/68: GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'), GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') in GP68 (5'-TTTCTTACTGTTGTGGATACCAC-3'). Z GP5+/6+/68 PCR dokazujemo 140-150 bp velik del gena L1 najmanj 40 različnih genotipov HPV: HPV6, 11, 13, 26, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89, 90 in 91 (de Roda in sod., 1995; Jacobs in sod., 1997; van den Brule in sod., 2002).

Za pomnoževanje HPV-DNA smo uporabili aparaturo GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Norwalk, ZDA). Za pomnoževanje 150 bp velikega dela gena L1 HPV smo uporabili komercialno dostopne kemikalije, ki so del kompleta HotStarTaq Plus PCR (Qiagen, Hilden, Nemčija): 10x CoralLoad PCR Buffer, MgCl₂ in encim HotStar Taq Plus DNA polymerase ter dodatno še mešanico nukleotidov iz kompleta PCR Nucleotide Mix^{PLUS} (Roche Diagnostics), ki vsebuje dATP, dGTP, dCTP in dUTP ter encim Uracil-DNA Glycosylase (Roche Diagnostics).

Za pomnoževanje smo uporabili *Touchdown* PCR (TD-PCR) protokol, ki omogoča zaznavanje nizkih koncentracij DNA številnih genotipov HPV v vzorcih, ki vsebujejo velike koncentracije človeške DNA, in je uporaben tudi za zaznavanje okužb z večimi

HPV hkrati (Evans in sod., 2005). Za preprečevanje lažno pozitivnih rezultatov smo uporabili N-uracil glikozilazni postopek, pri katerem v reakcijsko mešanico namesto nukleotidov dTTP dodamo dUTP. Nastali pridelki, ki lahko predstavljajo možen izvor kontaminacije v prihodnjih reakcijah, vsebujejo nenaravno bazo uracil in jih lahko razlikujemo od izhodiščne DNA, ki vsebuje timin. Če novim reakcijam PCR dodamo encim uracil-DNA glikozilazo (angl. Uracil-DNA Glycosylase; UNG), ta v primeru kontaminacij razgradi dUTP pridelke predhodnih reakcij, s čimer se izognemo lažno pozitivnim rezultatom (Longo in sod., 1990).

Za posamezen vzorec smo v sterilno reakcijsko posodico odpipetirali 20 μ l reakcijske mešanice in 5 μ l HPV DNA. Optimalna koncentracija DNA v posamezni reakciji je 100 ng na 25 μ l skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z deionizirano vodo. Vsebinsko posamezne reakcijske mešanice smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca in je prikazana v Preglednici 7.

Preglednica 7: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 140-150 bp velikega dela gena L1 HPV

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (μ l)	Končna koncentracija
dNTP mix PLUS (10, 30 mM)	0,5	200, 600 μ M
10 \times CoralLoad PCR Buffer	2,5	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5	4 mM
GP5+ (44,44 μ M) GP68 (2,22 μ M)	0,5625	25 pmol (1 μ M) GP5+ 1,25 pmol (50 nM) GP68
GP6+ (50 μ M)	0,5	25 pmol (1 μ M)
Uracil-DNA Glycosylase (1U/ μ l)	1	1 U
HotStarTaq Plus DNA polymerase (5U/ μ l)	0,125	0,625 U
H ₂ O	12,3125	344,75
Skupni volumen reakcijske mešanice	20	
DNA	5	
Skupni reakcijski volumen	25	

Začetno pomnoževanje 140-150 bp velikega dela gena L1 HPV smo izvedli z 21-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 1 min pri 94 °C, 2 min pri 50 °C (pri vsakem naslednjem ciklu temperatura pade za 0,5 °C) in 1,5 min pri 72 °C. Nadaljevanje pomnoževanja smo izvedli z 29-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 1 min pri 94 °C, 2 min pri 40 °C in 1,5 min pri 72 °C. Pred začetkom pomnoževanja je potekla 10-minutna inkubacija pri 25 °C, s katero smo

aktivirali encim UNG, ter 5-minutna inkubacija pri 95 °C, s katero smo izvedli denaturacijo dsDNA, inaktivacijo UNG in aktivacijo termostabilnega encima HotStar Taq Plus DNA polymerase. Pomnoževanju je sledila ohladitev encimske reakcije na 4 °C.

Pridelke reakcije PCR smo dokazali kvalitativno z uporabo gelske elektroforeze. V primeru pozitivnega rezultata smo za genotipizacijo HPV uporabili sekveniranje.

3.2.5.2 Dokazovanje in opredeljevanje PCR pridelkov

3.2.5.2.1 Gelska elektroforeza

Pridelke PCR reakcije s skupinsko-značilnimi OZ GP5+/6+/68 smo kvalitativno dokazovali s pomočjo gelske elektroforeze. Uporabljali smo že pripravljene komercialno dostopne gele za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific, Cham, Švica) in elektroforezni sistem SEA 2000[®] (Elchrom Scientific). Omenjeni geli so sestavljeni iz 1 % agaroze, prečno zamrežene s polimerom BG (1,4-butanedioldiglycidylether). Prednost njihove uporabe je optimalno zaznavanje 100-4000 bp velikih delcev DNA.

Postopek dokazovanja pridelkov PCR reakcije je potekal tako, da smo najprej pripravili pufersko raztopino iz 1950 ml dvojno deionizirane vode, 50 ml 40X pufra TAE (Elchrom Scientific) in 100 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics NV). Pripravljeno pufersko raztopino smo vlili v banjico zgoraj omenjene elektroforezne aparature in vanjo vstavili že pripravljen gel.

V prvo luknjico gela smo vsakič nanesti 3,2 µl molekularnega utežnega označevalca XIII (Roche Diagnostics), ki v lestvici po 50 bp označuje velikost delcev, prepotovanih v gelu. Označevalec lahko uporabimo za dokazovanje 50-750 bp dolgih pridelkov PCR; označevalec dodatno vsebuje še 2642 bp velik delec DNA.

V vsako naslednjo luknjico gela smo direktno nanašali po 6 µl posameznega PCR pridelka. Direktno nanašanje na gel je možno, ker smo za izvedbo PCR-reakcije uporabili pufer, ki že vsebuje nanašalni reagent ter oranžno in rdeče barvilo.

Gelska elektroforeza je na sobni temperaturi in pri napetosti 120V med obema elektrodama potekala 20 minut; črpalka za kroženje pufra in hlajenje gela se je samodejno vključila 1,5 minute po vklopu aparature. Po končani elektroforezi smo rezultate nemudoma pogledali pod UV lučjo Benchtop 3 UVTM Transilluminator (Ultra Violet Products, Upland, ZDA) in gel fotografirali z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael). Ustreznost PCR pridelkov smo preverili s primerjavo njihove velikosti z velikostjo pridelka pozitivne kontrole in molekularnega označevalca. Kot pozitivne smo opredelili vzorce pri katerih smo zaznali PCR pridelke velikosti 140-150 bp.

Po koncu pregleda rezultatov smo gele očistili s 45-minutno izvedbo elektroforeze v obratni smeri in čistost gelov preverili z UV-svetlobo.

3.2.5.2.2 Metoda neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja

Za opredeljevanje genotipa HPV v vzorcih, ki so bili pozitivni s klasičnim GP5+/6+/68 PCR smo uporabili metodo direktnega določanja nukleotidnega zaporedja (sekveniranje). Dobljena zaporedja smo primerjali z zaporedji referenčnih izolatov, dostopnih v genski banki.

a) Čiščenje pridelkov PCR reakcije

Pred izvedbo sekvenčne reakcije smo pridelke PCR očistili s komercialno dostopnim kompletom kemikalij QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Namen čiščenja je bil odstranitev manjših nespecifičnih pridelkov PCR, encimov, OZ, nevgrajenih nukleotidov, soli ter ostalih nečistoč.

Postopek čiščenja smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca po naslednjem postopku. V sterilno reakcijsko tubico smo dodali 1 volumsko enoto (19 µl) PCR pridelka in 5 volumskih enot pufra PB. Vsebino smo dobro premešali na mešalu. Celoten volumen reakcijske tubice smo prenesli na ločevalno mikrokolono s silikatno membrano, vloženo v zbiralno tubico. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje na 13000 rpm. Nečistoče so se izločile skozi membrano mikrokolone, DNA pa je ostala vezana. Zbiralno tubico z izpirkom smo zavrgli, mikrokolono pa prestavili v čisto zbiralno tubico. Sledilo je spiranje nezaželjenih

solu z dodatkom 750 μ l pufru PE in 1-minutnim centrifugiranjem na 13000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo zbiralno tubico z izpirkom zavrgli, mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. S ponovitvijo centrifugiranja smo iz mikrokolone odstranili ostanke pufru PE. Zbiralno tubico in izpirek smo zavrgli, mikrokolono pa prestavili v sterilno 1,5 ml reakcijsko tubico. Na sredino membrane smo dodali 25 μ l elucijskega pufru EB in inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi. Z 1-minutnim centrifugiranjem na 13000 rpm smo DNA eluirali z membrane mikrokolone. Mikrokolone smo zavrgli, očiščene PCR-pridelke pa do nadaljne uporabe shranili na -20 °C.

b) Določanje koncentracije očiščenih pridelkov PCR

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določili s pomočjo 1,6 % agaroznega gela, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca. V erlenmajerico smo zatehtali 0,8 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA), dodali 50 ml 1X pufru TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH= 8,3) in premešali. Raztopino smo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, jo 3 minute mešali na sobni temperaturi in nato dodali 5 μ l etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics NV). Pripravljeno raztopino smo vlili v kalup z vstavljenima glavničkoma, ki v ohlajenem gelu omogočata nastanek luknjic v katere naneseemo vzorce. Po strditvi gela smo glavnička odstranili, gel položili v elektroforezno banjico HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit (Hoefler, San Francisco, ZDA) in ga prelili s 1X pufrom TAE, ki smo ga ohladili na 4 °C. V prvo luknjico smo nanесли 10 μ l molekularnega kvantitativnega označevalca MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litva), s katerim lahko določimo koncentracijo 80-1031 bp dolgim pridelkov PCR. V vsako naslednjo luknjico smo nanесли 12 μ l mešanice očiščenega PCR pridelka (5 μ l), deionizirane vode (5 μ l) in 2 μ l nanašalnega pufru 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas). Gelska elektroforeza je poteka 30 minut pri napetosti 120V na sobni temperaturi. Po končani elektroforezi smo rezultate nemudoma pogledali pod UV lučjo in gel fotografirali z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems). Koncentracijo DNA v vzorcu smo določili s primejavo njihove intenzitete fluorescence z intenziteto fluorescence fragmentov z znano koncentracijo DNA v kvantitativnem markerju.

c) Izvedba sekvenčne reakcije

Za izvedbo sekvenčne reakcije smo uporabili komercialno dostopen komplet kemikalij Big Dye[®] Terminator v3.1 Cyclor Sequencing kit (Applied BioSystems), oligonukleotidne začetnike GP5+ in GP6+ ter aparaturo GenAmp[®] PCR System 2700 (Applied BioSystems). Za vsak PCR pridelek smo pripravili 2 sekvenčni reakciji, ena je vsebovala OZ GP5+, druga OZ GP6+.

Vsebino posamezne reakcijske posodice smo pripravili po navodilih proizvajalca in je podana v Preglednici 8.

Preglednica 8: Vsebina posamezne reakcijske posodice za izvedbo posamezne sekvenčne reakcije

Kemikalije	Volumen za 1 reakcijo (μl)	Končna koncentracija
OZ (2,46 μM)	0,65	1,5 pmol
5X BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer	2	
Reakcijska mešanica BigDye Terminator v3.1	0,5	
DNA	(0,075-0,75)*	
ddH ₂ O	Dopolnili do 10 μl	
Skupni reakcijski volumen	10	

*Odvisno od koncentracije očiščenih pridelkov PCR; optimalna koncentracija 1,5 ng/ 10 μl za pridelke velike do 200 bp

Sekvenčno reakcijo smo izvedli po predhodno opisanem protokolu SteP (Platt in sod., 2007). Začetni 1-minutni inkubaciji pri 96 °C je sledilo 15 ponovitev temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 95 °C, 5 s pri 50 °C in 75 s pri 96 °C. Sledilo je 5 ponovitev temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 90 s pri 60 °C. Sledilo je 5 ponovitev temperaturnega cikla, sestavljenega iz 3 inkubacij: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 2 s pri 60 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcije na 8 °C.

d) Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

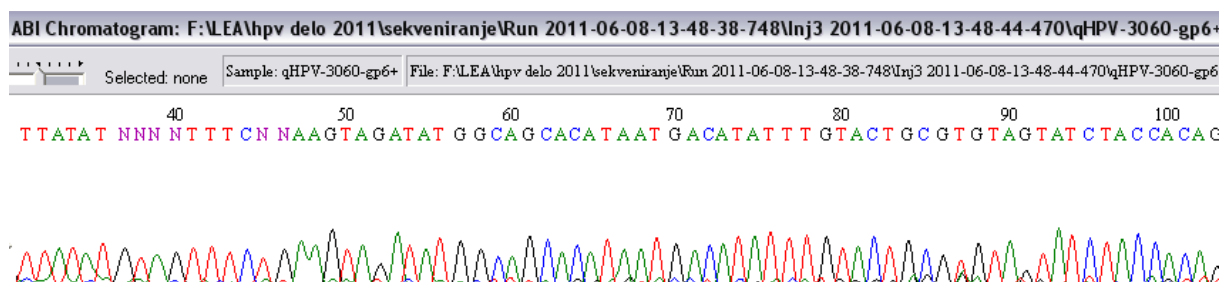
Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije smo izvedli s pomočjo komercialno dostopnega kompleta DyeEx[™] 20 Spin Kit (Qiagen), ki temelji na gelski kromatografiji, s katero lahko med seboj ločujemo molekule z različno molekulsko maso. S postopkom čiščenja smo odstranili nevgrajene dideoksinukleotide, ki so se zaradi nizke molekulske mase

ujamejo v pore nastalega gela. Molekule DNA, ki imajo večjo molekularno maso, se ne morejo ujeti v pore gela, zato prehajajo skozi gel.

Postopek čiščenja smo začeli s pripravo mikrokolon, ki smo jih premešali na mešalu, za četrto obrata odvili pokrovček in s tem preprečili nastanek vakuuma, jim odlomili spodnji del ter jih vstavili v 2 ml zbiralne tubice. Sledilo je 3-minutno centrifugiranje na 3000 rpm. Pripravljene mikrokolone smo prestavili v sterilne 1,5 ml reakcijske tubice, jim odstranili pokrovčke in na sredino nastalega gela nanесли celoten volumen sekvenčne reakcije (10 μ l). Sledilo je 3-minutno centrifugiranje na 3000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo reakcijske tubice z eluatom DNA prenesli v vakuumsko centrifugo Savant Speed VAC SC 110 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, ZDA) in jih sušili 12 minut. Po sušenju smo v reakcijske tubice dodali 25 μ l, na sobno temperaturo ogrete, denaturacijske raztopine Hi-DiTM Formamide (Applied BioSystems), ki oslabi vodikove vezi med nukleotidi. Vsebinske tubice smo premešali na mešalu in jo prenesli v reakcijske posodice, namenjene za PCR. Sledila je 2-minutna denaturacija pri 95 °C v aparaturi GenAmp[®] PCR System 2700 (Applied BioSystems). Nemudoma po končani denaturaciji smo reakcijske posodice za najmanj 10 minut prestavili v hladni blok, ohlajen na -20 °C.

e) Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja

Reakcijske posodice smo prenesli v posebna stojala in jih vstavili v aparaturo 3500 Dx Genetic Analyzer (Applied BioSystems), ki omogoča avtomatsko določanje nt zaporedja. Omenjena aparatura, po končani analizi, podatke o določenem nukleotidnem zaporedju prenese v pripadajoč računalniški program, ki jih poda v obliki elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem (Slika 4).



Slika 4: Nukleotidno zaporedje HPV16, pridobljeno z avtomatskim sekveniranjem

f) Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja, pridobljena z avtomatskim sekveniranjem, smo pregledali s pomočjo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, Carlsbad, ZDA) in analizirali oz. sestavili s pomočjo računalniškega paketa Vector NTI Advance v10.1.1 (Invitrogen, Carlsbad, ZDA). S pomočjo posebnih algoritmov smo za vsak PCR pridelek uskladili nukleotidna zaporedja, ki smo jih pridobili z obema OZ.

Usklajeno zaporedje smo prenesli v prosto dostopno spletno orodje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki omogoča primerjavo pridobljenih nukleotidnih zaporedij z nukleotidnimi zaporedji dostopnimi v genski banki EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Nemčija). Na podlagi te primerjave smo dobili podatke o najverjetnejšem genotipu HPV. Kot iste genotipe HPV smo opredelili izolate, ki so z referenčnimi izolati HPV izkazovali več kot 90 % ujemanje v analiziranem delu gena L1.

3.2.5.3 Dokazovanje HPV-DNA z Abbott RealTime High Risk HPV testom

Abbott RealTime High Risk HPV (RealTime; Abbott, Wiesbaden, Germany) je kvalitativen *in vitro* test, namenjen za dokazovanje DNA 14 HR-HPV. Ločeno lahko v eni reakciji dokažemo genotipa HPV16 in 18 ter združeno še 12 genotipov (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 in 68). Osamitev HPV-DNA lahko izvedemo ročno, ali s pomočjo dveh različic avtomatskih instrumentov: *m2000sp* ali *m24sp* (Abbott). Pomnoževanje HPV-DNA izvedemo z RT-PCR instrumentom *m2000rt* (Abbott), z uporabo mešanice modificiranih OZ GP5+/6+, ki omogoča pomnoževanje 150 bp velikega dela gena L1. Instrument *m2000rt* ima 4 kanale za zaznavanje fluorescentnih signalov: Cy5 (zaznavanje interne procesne kontrole (IC), ki jo predstavlja 136 bp velik del gena za človeški beta-globin; namen IC je zaznavanje ustrezne količine vzorca, uspešnosti osamitve DNA in pravilnega pomnoževanja), VIC (zaznavanje HPV-16), NED (zaznavanje HPV-18) in FAM (zaznavanje 12 HR-HPV genotipov) (Poljak in Kocjan, 2010; Poljak in sod., 2011). Test je primarno namenjen dokazovanju HPV v brisih materničnega vratu. Nedavno je bilo dokazano, da je uporaben tudi za dokazovanje HPV v arhivskih tkivnih vzorcih (Kocjan in sod., 2011)

Za pomnoževanje HPV-DNA smo uporabili kemikalije, ki so del kompleta Abbott RealTime High Risk HPV Amplification Reagent Kit in komplet Abbott RealTime High Risk HPV Control Kit (Abbott, Wiesbaden, Nemčija). Komplet z amplifikacijskimi reagenti je vseboval: tubico z 0,070 ml termofilnega encima AmpliTaq Gold (5,4- 5,9 U/ μ l) v raztopini pufra s stabilizatorji, tubico z oligonukleotidi z <0,1 % sintetičnih oligonukleotidov in <1 % dNTP-jev v raztopini pufra ter referenčnega barvila (skupen volumen tubice je bil 0,502 ml) in tubico z 0,778 ml aktivacijskega reagenta, ki je vsebovala 38 mM MgCl₂ v raztopini pufra.

Najprej smo vsak vzorec 15-20 sekund mešali na mešalu in ga nato na kratko centrifugirali. Odtalili smo kontrolne in amplifikacijske reagente ter pripravili reakcijsko mešanico za 24 reakcij. V reakcijsko tubico z encimom AmpliTaq Gold smo z avtomatsko pipeto dodali 278 μ l aktivacijskega reagenta in 402 μ l reagenta z oligonukleotidi. Vsebinsko smo nežno premešali s pomočjo avtomatske pipete. V posamezne luknjice na optični reakcijski plošči z 96 luknjicami smo nato odpipetirali 25 μ l reakcijske mešanice in dodali 25 μ l DNA. Optimalna koncentracija DNA v posamezni reakciji je 200 ng na 50 μ l skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z deionizirano vodo. Luknjice na optični reakcijski plošči smo nato prelepili s samolepilno prozorno folijo. Pomnoževanje HPV DNA smo po navodilih proizvajalca izvedli z instrumentom Abbott *m2000rt* (Abbott, Wiesbaden, Nemčija), ki omogoča izvedbo pomnoževanja in zaznavanja RT-PCR pridelkov.

Po končanem pomnoževanju smo analizirali rezultate. Za vsak vzorec smo dobili ločene podatke o prisotnosti oz. odsotnosti DNA HPV v vseh treh kanalih (HPV16, HPV18, hr-HPV). Kot HPV pozitivne smo opredelili vzorce s Ct vrednostjo ≤ 32 .

3.2.5.4 Dokazovanje HPV-DNA s HPV16 E7 genotipsko značilnim RT-PCR

Za dokazovanje približno 80 bp velikega dela gena E7 HPV 16 smo uporabili 2 genotipsko značilna OZ: HPV16E7-F (5'-AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-3') in HPV16E7-R (5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCAAA-3') ter lovko HPV16E7-Probe (5'-YAK-GCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTA-BBQ-3') (Wang-Johanning in sod.,

2002). Uporabljeni OZ in lovka so bili sintetizirani v podjetju TIB MOLBIOL (Berlin, Nemčija).

Protokol pomnoževanja odseka gena E7 smo razvili na osnovi priloženih navodil komercialno dostopnega kompleta kemikalij LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija) in ga ustrezno prilagodili predvideni dolžini pridelkov PCR (80 bp), lastnostim tarčnega nukleotidnega zaporedja in lastnostim sintetiziranih OZ in lovke. Optimizacijo RT-PCR protokola in preverjanje navzkrižne reaktivnosti z netarčnimi genotipi HPV smo izvedli z uporabo mednarodnih standardov HPV iz zbirke World Health Organization HPV LabNet DNA proficiency panel 2010 (WHO, Ženeva, Švica), ki je vsebovala genotipe HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 in 68. Za pomnoževanje HPV16 DNA smo uporabili računalniško vodeni sistem LightCycler Instrument tip 2.0 (Roche Diagnostics GmbH). Za posamezen vzorec smo v sterilno reakcijsko posodico odpipetirali 15 µl reakcijske mešanice in 5 µl HPV DNA. Optimalna koncentracija DNA v posamezni reakciji je 100 ng na 20 µl skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z deionizirano vodo. Vsebino posamezne reakcijske mešanice smo pripravili po navodilih proizvajalca in je prikazana v Preglednici 9.

Preglednica 9: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 80 bp velikega dela gena E7 HPV16

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (µl)	Končna koncentracija
TaqMan Master Reaction Mix	4	5X
HPV16E7-F (50µM)	0,2	0,5 µM
HPV16E7-R (50µM)	0,2	0,5 µM
HPV16E7-Probe YAK (20µM)	0,2	0,2 µM
dH ₂ O	10,4	
Skupni volumen reakcijske mešanice	15	
DNA	5	
Skupni reakcijski volumen	20	

Pomnoževanje gena E7 HPV16 smo izvedli s 45 ponovitvami temperaturnega cikla, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 s pri 95 °C (20 °C/s), 40 s pri 60 °C (20 °C/s) in 1 s pri 72 °C (20 °C/s) (merjenje fluorescence). Pred začetkom pomnoževanja je potekla 10-

minutna denaturacija dvoverižne DNA in aktivacija termostabilnega encima pri 95 °C (20°C/s). Pomnoževanju je sledilo 30-sekundno ohlajanje na 40 °C (20 °C/s).

Kot HPV-DNA pozitivne smo opredelili vzorce s Ct vrednostjo 37 ali manj.

3.2.6 Dokazovanje mRNA HPV16 E7

Dokazovanje značilnih prepisov za onkogeni beljakovini E6 in E7 predstavlja občutljiv indikator direktnega vključevanja virusnih onkogenov v razvoj raka materničnega vratu in drugih karcinomov (Watanabe in sod., 1989).

V vzorcih iz katerih smo osamili celokupno RNA smo tumorogeno aktivnost virusa preverjali z dokazovanjem izražanja gena, ki nosi zapis za beljakovino E7 HPV16. V ta namen smo uporabili predhodno opisana OZ HPV16E7-F in HPV16E7-R ter lovko HPV16E7-Probe (Wang-Johanning in sod., 2002). Z uporabo teh dveh OZ smo pomnožili približno 80 bp dolg del mRNA HPV16 E7.

Za dokazovanje mRNA HPV16 E7 smo uporabili rt-RT-PCR, ki smo ga izvedli s pomočjo računalniško vodene sistema LightCycler 480 II (Roche Diagnostics). Protokol poteka reakcije smo razvili na podlagi priloženih navodil komercialno dostopnega kompleta kemikalij LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche), ki smo ga ustrezno prilagodili predvideni dolžini PCR pridelkov, lastnostim tarčnega nukleotidnega zaporedja, lastnostim sintetiziranih OZ in lovke ter uporabljeni aparaturi za rt-RT-PCR.

Za posamezen vzorec smo v luknjico mikrotitrne ploščice odpipetirali 15 µl reakcijske mešanice in 5 µl osamljene RNA. Optimalna koncentracija RNA v posamezni reakciji je 100 ng na 20 µl skupnega reakcijskega volumna, zato smo vzorce z višjo koncentracijo ustrezno redčili z vodo, ki ni vsebovala RNaze. Vsebinsko posamezne reakcijske mešanice smo pripravili po navodilih proizvajalca in je prikazana v Preglednici 10.

Preglednica 10: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za obratno transkripcijo RNA in pomnoževanje 80 bp velikega dela gena E7 HPV16

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (μ l)	Končna koncentracija
LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (2,7x konc.)	7,4	1X
Enhancer (20x conc)	1,0	1X
Aktivator (50mM)	1,3	3,25 mM Mn(OAc) ₂
HPV16E7-F (50 μ M)	0,2	0,5 μ M
HPV16E7-R (50 μ M)	0,2	0,5 μ M
HPV16E7-Probe YAK (20 μ M)	0,25	0,25 μ M
H ₂ O brez RNaze	4,65	
Skupni volumen reakcijske mešanice	15	
RNA	5	
Skupni reakcijski volumen	20	

rt-RT-PCR smo izvedli po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.2.4 Preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR.

Kot HPV-DNA pozitivne smo opredelili vzorce s Ct vrednostjo 37 ali manj.

3.2.7 Opredeljevanje statusa celične beljakovine p16

Dokazovanje izražanja celične beljakovine p16 z metodo IHK je bilo izvedeno na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Tkivne rezine (debeline 4-5 μ m) arhivskih vzorcev PCK-UV/-UŽ smo narezali z mikrotomom (Leica) in jih položili na objektna stekelca. Da bi preprečili navzkrižne kontaminacije med vzorci smo rezilo in površino mikrotoma po vsaki uporabi očistili in dekontaminirali z DNA AWAY solution (Molecular BioProducts, San Diego, ZDA). Objektna stekelca s tkivnimi rezinami smo najprej izpostavili delovanju ksilena, s katerim smo odstranili parafin. Tkivne rezine smo nato rehidrirali s spiranjem z alkoholi padajočih koncentracij in destilirano vodo. Za prikaz preiskovane beljakovine smo uporabili primarna protitelesa iz komercialno dostopnega kompleta CINtec Histology (klon E6H4; Roche mtm Laboratories). Imunohistokemična reakcija je potekala v aparatu BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Tuscon, ZDA). Začetna inkubacija v pufru Cell

Conditioning 1 (CC1) (Ventana Medical Systems), s katero smo razkrili antigen, je potekala 30 minut pri 95 °C. Vse nadaljnje reakcije so potekale pri 38°C. Po 30-minutni inkubaciji s primarnimi protitelesi smo postopek, po navodilih proizvajalca, nadaljevali z detekcijskim sistemom streptavidin-biotin-peroksidaza (iVIEW DAB Detection Kit, Ventana Medical Systems). Vzorce smo 8 minut inkubirali z biotiniliranimi sekundarnimi protitelesi in s streptavidinom, konjugiranim s peroksidazo. Nespecifično obarvanje smo preprečili z 8-minutno inkubacijo z reagentom za blokado endogenega biotina (Endogenous Biotin Blocking Kit, Ventana Medical Systems). Za vizualizacijo reakcije smo vzorce 8 minut inkubirali s 3,3' diaminobenzidinom. Za kontrastiranje smo jedra obarvali z Mayerjevim hematoksilinom in z uporabo mikroskopa določili % obarvanih celic.

Negativno kontrolo reakcij smo izvedli z zgoraj opisanimi postopki, pri čemer smo primarna protitelesa zamenjali z reagentom za negativno kontrolo, ki je priložen kompletu CINtec Histology (Negative Reagent Control).

V primeru odsotnosti obarvanja oz. če je bilo obarvanih manj kot 50 % celic smo vzorec označili kot p16 negativen (kategorija 0), v primeru da je bilo obarvanih več kot 50 % celic smo vzorec označili kot p16 pozitiven/ s povišanim izražanjem p16 (kategorija 1).

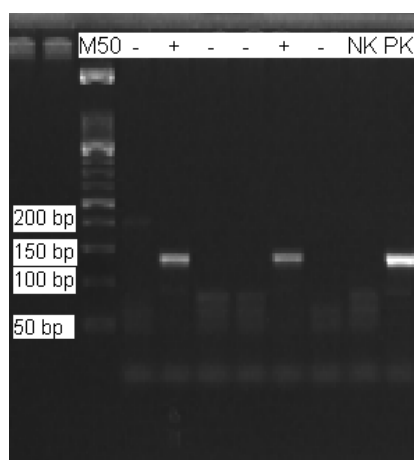
4 REZULTATI

4.1 HPV-DNA V TKIVNIH VZORCIH BOLNIKO V S PCK-UV/-UŽ

Koncentracijo DNA smo uspešno določili v vseh vzorcih vključenih v raziskavo (47/47, 100 %); najnižja izmerjena koncentracija je bila 4,8 ng/μl, najvišja pa 710,4 ng/μl. Podatke o koncentracijah smo uporabili za določanje optimalne količine DNA, ki smo jo uporabili v reakcijah PCR.

Značilen 268 bp velik del gena za človeški beta-globin smo uspešno pomnožili v vseh 47 vzorcih, vključenih v raziskavo.

S skupinsko-značilnimi OZ GP5+/6+/68, ki pomnožujejo 150 bp dolg del gena L1 smo HPV-DNA dokazali v 5 od 47 (10,6 %) vzorcev PCK-UV/-UŽ. Slika 5 prikazuje fotografijo elektroforeznega gela PCR pridelkov GP5+/6+/68.

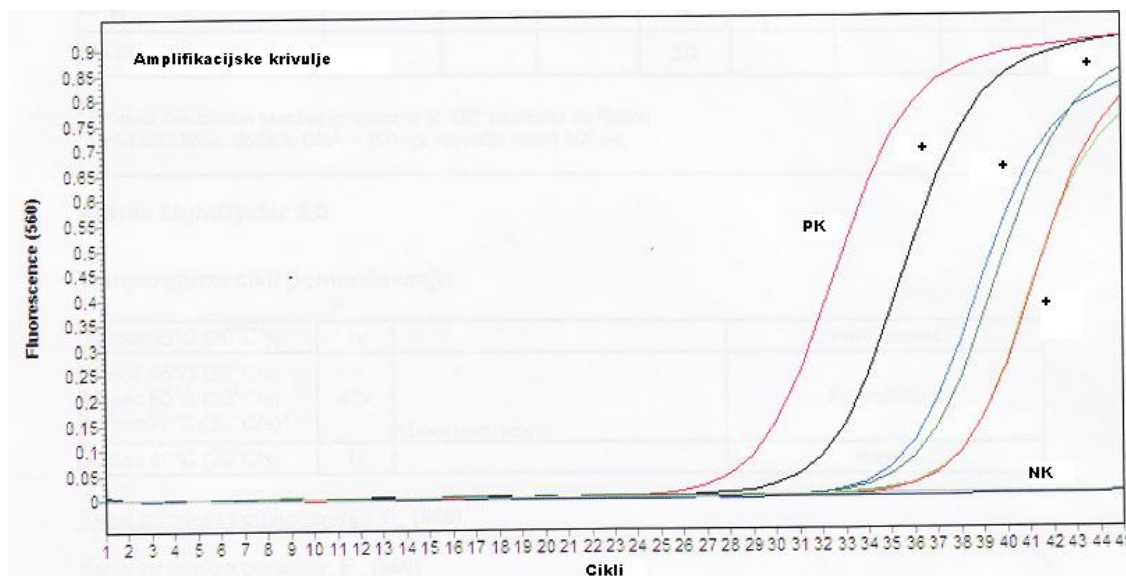


Slika 5: Fotografija elektroforeznega gela PCR pridelkov GP5+/6+/68
M50 (molekularni označevalec XIII), - (negativni rezultat), + (pozitiven rezultat), NK (negativna kontrola), PK (pozitivna kontrola)

Z Abbott RealTime High Risk HPV testom smo HPV-DNA dokazali v 5 od 47 (10,6 %) vzorcev.

Optimizacijo protokola za HPV16 E7 RT-PCR smo izvedli s pomnoževanjem mednarodnih standardov HPV16 in ostalih HR-HPV z znanim številom kopij genoma iz

zbirke WHO LabNet DNA proficiency panel 2010. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo za to različico RT-PCR določili občutljivost 5 kopij HPV16/reakcijo (ct vrednost = 36,61); ostali testirani genotipi HPV se niso pomnožili. Z uporabo HPV16 E7 tipsko specifičnega RT-PCR smo nato DNA HPV16 dokazali v 5 od 47 vzorcev (10,6 %), vključenih v raziskavo. Rezultati pomnoževanja HPV16 DNA so prikazani na Sliki 6.



**Slika 6: Amplifikacijske krivulje, pridobljene z HPV16 RT-PCR
PK (pozitivna kontrola), + (pozitiven rezultat), NK (negativna kontrola)**

Z uporabo treh različnih metod smo kot HPV-DNA pozitivne opredelili iste vzorce PCK-UV/-UŽ in pri vseh (5/5; 100 %) dokazali okužbo s HPV16. HPV-DNA smo dokazali v 15,0 % (3/20) vzorcev PCK-UV in v 11,1 % (2/18) vzorcev PCK-UŽ.

Izmed 47 testiranih vzorcev smo DNA HPV nesporno dokazali v 5 primerih oz. smo HPV-DNA dokazali pri 5/47 (10,6 %) bolnikih s PCK-UV/-UŽ, vključenih v raziskavo.

Rezultati testiranj tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ s tremi kompleti OZ, sublokalizacija PCK in dokazan genotip HPV so prikazani v Preglednici 11.

Preglednica 11: Rezultati testiranja tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ s tremi različicami PCR, sub-lokalizacija karcinoma in dokazan genotip HPV

Št. DNA izolata	GP5+/6+/68	Abbott RT-PCR (Ct)	HPV16 E7 RT-PCR (Ct)	Lokalizacija/ Sub-lokalizacija	Genotip HPV
1	1	1 (21,20)	1 (25,91)	UV/ Jezik	HPV16
19	1	1 (30,08)	1 (34,21)	UŽ [§]	HPV16
20	1	1 (20,61)	1 (24,55)	UV/ Trdo nebo	HPV16
24	1	1 (28,31)	1 (32,73)	UV/ Retromolarni trigonum	HPV16
26	1	1 (23,17)	1 (28,52)	UŽ/ Mandlji	HPV16

Legenda: 1- pozitivno, UV- ustna votlina, UŽ- ustni del žrela, §- sub-lokalizacija ni navedena

4.2 mRNA HPV16 E7 V TKIVNIH VZORCIH BOLNIKOV S PCK-UV/-UŽ

mRNA HPV16 E7 smo dokazovali v 5 HPV16 DNA pozitivnih PCK-UV/-UŽ in v 10 HPV-DNA negativnih PCK-UV/-UŽ. Koncentracijo RNA smo uspešno določili v vseh 15 vzorcih; najnižja izmerjena koncentracija je bila 69,5 ng/μl, najvišja pa 295,9 ng/μl. Podatke o koncentracijah smo uporabili za določanje optimalne količine RNA, ki smo jo uporabili v reakcijah rt-RT-PCR.

Značilen 85 bp velik del rRNA človeškega gena S9 smo uspešno pomnožili pri vseh 15 vzorcih. Rezultati kontrolnih testov, s katerimi smo želeli preveriti ali so naši izolati RNA kontaminirani z ostanki genomske oz. virusne DNA, so bili negativni.

Z uporabo rt-RT-PCR smo mRNA HPV16 E7 dokazali v 3/5 (60 %) HPV-DNA pozitivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ. Vseh 10 HPV-DNA negativnih vzorcev je bilo mRNA HPV16 E7 negativnih. Rezultati pomnoževanja HPV-DNA, mRNA HPV16 E7 in sub-lokalizacija PCK-UV/-UŽ so prikazani v Preglednici 12.

Preglednica 12: Rezultati dokazovanja mRNA HPV16 E7 v vzorcih PCK-UV/-UŽ, pozitivnih na HPV-DNA

Št. DNA izolata	HPV-DNA (Ct)*	HPV16 E7 mRNA (Ct)	Sub-lokalizacija
1	1 (21,20)	1 (34,54)	UV/ Jezik
20	1 (20,61)	1 (30,53)	UV/ Trdo nebo
26	1 (23,17)	1 (26,02)	UŽ/ Mandlji
19	1 (30,08)	0	UŽ [§]
24	1 (28,31)	0	UV/ Retromolarni trigonum

Legenda: 1- pozitivno, 0- negativno, *Abbott RT-PCR, UV- ustna votlina, UŽ- ustni del žrela, §-sub-lokalizacija ni navedena.

4.3 OPREDELJEVANJE STATUSA CELIČNE BELJAKOVINE p16

Opredeljevanje statusa celične beljakovine p16 smo izvedli v 43 od 47 (91,5 %) vzorcev PCK-UV/-UŽ, vključenih v raziskavo. Povišano izražanje beljakovine p16 smo dokazali pri 16,3 % (7/43) vzorcev.

Rezultati dokazovanja dokazovanja HPV-DNA, mRNA HPV16 E7 in celične beljakovine p16 ter sub-lokalizacija PCK so prikazani v Preglednici 13.

Preglednica 13: Rezultati dokazovanja HPV-DNA, mRNA HPV16 E7 in celične beljakovine p16 ter sub-lokalizacija PCK

Št. DNA izolata	HPV-DNA (Ct)*	mRNA HPV16 E7 (Ct)	p16	Sub-lokalizacija
1	1 (21,20)	1 (34,54)	1	UV/ Jezik
7	0	0	1	UV/ Trdo nebo
13	0	0	1	UV/ Jezik
20	1 (20,61)	1 (30,53)	1	UV/ Trdo nebo
22	0	0	1	UŽ/ Valekula
26	1 (23,17)	1 (26,02)	1	UŽ/ Mandlji
45	0	0	1	UV/ Jezik
19	1 (30,08)	0	0	UŽ [§]
24	1 (28,31)	0	0	UV/ Retromolarni trigonum

Legenda: 1- pozitivno, 0- negativno, *Abbott RT-PCR, UV- ustna votlina, UŽ- ustni del žrela, §-sub-lokalizacija ni navedena.

Kot je razvidno iz zgornje preglednice, smo pri 3 od 43 (7,0 %) vzorcev dokazali tako izražanje celične beljakovine p16 kot tudi prisotnost DNA oz. mRNA HPV16; dva od teh vzorcev sta bila odvzeta iz ustne votline, eden pa iz ustnega dela žrela. Izražanje celične beljakovine p16 smo dokazali tudi v štirih HPV16-DNA/mRNA HPV16 E7 negativnih vzorcih. Izražanja p16 nismo dokazali v dveh HPV-DNA pozitivnih/mRNA HPV16 E7 negativnih vzorcih PCK-UV/-UŽ.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Okužba s HR-HPV, predvsem z HPV16 in 18, je tesno povezana z nastankom malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela v anogenitalnem predelu (Kocjan in Poljak, 2011). HR-HPV predstavljajo enega od možnih etioloških dejavnikov tudi pri nastanku karcinomov UV/-UŽ (Kreimer in sod., 2005; Syrjänen in sod., 2011). PCK-UV/-UŽ, ki so povezani s HPV, se od HPV-negativnih (povzročenih s kajenjem in prekomernim uživanjem alkohola) razlikujejo v bioloških značilnostih, epidemiologiji, klinični sliki in napovedi poteka bolezni (Syrjänen, 2010).

V raziskavo smo vključili arhivske (vklopljene v parafin in fiksirane s formalinom) tkivne vzorce PCK-UV/-UŽ, odvzete bolnikom, ki so bili v povprečju stari 60 let.

Celokupno DNA smo uspešno osamili iz vseh 47 vzorcev, vključenih v raziskavo, kar smo dokazali s pomnoževanjem 268 bp dolgega dela gena za človeški beta-globin.

Z uporabo treh različnih molekularnih metod za dokazovanje HPV iz rodu alfa, smo HPV-DNA dokazali v 10,6 % vzorcih PCK-UV/-UŽ. Vsi HPV-DNA pozitivni vzorci so vsebovali genotip HPV16, kar je v skladu s predhodnjimi raziskavami. Dokazana prevalenca HPV spada med najnižje doslej objavljene v vzorcih PCK-UV/-UŽ. Naši rezultati so primerljivi z rezultati predhodno izvedene raziskave v Sloveniji (Kansky in sod., 2003), v kateri so določili prevalenco HPV-DNA 8,4 % v primerljivi skupini bolnikov s PCK-UV. Iz rezultatov obeh raziskav lahko sklepamo, da incidenca HPV-pozitivnih tumorjev UV/-UŽ v Sloveniji ne narašča oz. da je v Sloveniji le majhen delež teh rakov povezan s HPV. Menimo, da imajo v Sloveniji, vsaj v starejši populaciji, glavno vlogo v razvoju raka UV/-UŽ drugi rizični dejavniki (kajenje in prekomerno uživanje alkohola) in ne okužba z visokorizičnimi HPV.

Dobljena nizka prevalenca HPV je, poleg odsotnosti virusne okužbe, lahko posledica uporabe številnih dekontaminacijskih postopkov: dekontaminacija delovne površine in

mikrotoma med pripravo tkivnih rezin, uporaba uracil DNA-glikozilaze in številnih negativnih kontrol v vseh PCR reakcijah, ki smo jih uporabili v raziskavi.

V predhodno objavljenih raziskavah (Syrjänen, 2004; Kreimer in sod., 2005) poročajo o višji prevalenci HPV-DNA v karcinomi ustnega dela žrela (predvsem v predelu mandljev), v primerjavi s karcinomi ustne votline. V skladu s temi ugotovitvami smo rezultate testiranja vseh 47 tkivnih vzorcev, vključenih v raziskavo, obravnavali ločeno glede na lokacijo tumorjev. HPV-DNA smo dokazali v 15,0 % (3/20) karcinomov ustne votline in v 11,1 % (2/18) karcinomov ustnega dela žrela. Na podlagi naših rezultatov, lahko zaključimo, da so redki HPV-pozitivni tumorji v Sloveniji enako pogosti v UV in UŽ. Naša raziskava je bila omejena z majhnim številom dostopnih arhivskih tkivnih vzorcev PCK-UV/-UŽ – da bi lahko natančneje opredelili prevalenco HPV v PCK-UV in PCK-UŽ, bi morali v raziskavo vključiti večje število vzorcev.

Kansky in sodelavci so leta 2003 objavili raziskavo, v kateri so dokazali primerljivo prevalenco HPV-DNA v vzorcih raka ustne votline in v vzorcih normalne ustne sluznice, kar nakazuje, da je prisotnost HPV-DNA v vzorcih raka lahko zgolj posledica naključne kolonizacije ali latentne okužbe, in ni nujno rezultat aktivne virusne okužbe. Številni raziskovalci (Smeets in sod., 2007; Syrjänen, 2010; Cantley in sod., 2011) menijo, da je ugotavljanje vloge visokorizičnih HPV v etiopatogenezi raka glave in vratu možno le z določevanjem aktivnosti virusa v gostiteljskih celicah z raziskovanjem izražanja onkogenih virusnih beljakovin (E6/E7), določanjem izražanja celične beljakovine p16 in ugotavljanjem prisotnosti virusa v jedru okuženih celic s hibridizacijo *in-situ*.

V drugem delu diplomske naloge smo zato z dokazovanjem mRNA HPV16 E7 in uporabo imunohistokemijske metode za dokazovanje celične beljakovine p16 želeli ugotoviti, katere HPV-DNA pozitivne tumorje dejansko povzročajo HPV. HPV-DNA smo dokazali v 5 primerih PCK-UV/-UŽ. V 3/47 (6,4 %) karcinomov (dva sta bila iz ustne votline, en pa iz ustnega dela žrela) smo dokazali tako prisotnost HPV-DNA kot tudi izražanje gena E7 HPV16 in celične beljakovine p16. Iz navedenega lahko sklepamo, da je okužba s HPV povezana z nastankom teh karcinomov. Za dokončno opredelitev aktivne virusne okužbe v

teh treh primerih bi morali uporabiti še ISH, s katero lahko HPV-DNA dokažemo v jedru rakavo spremenjenih celic.

Izražanje celične beljakovine p16 smo dokazali tudi v štirih HPV16-DNA/ mRNA HPV16 E7 negativnih vzorcih. Možna vzroka za razlike med rezultati omenjenih metod sta nižja specifičnost IHK v primerjav s PCR ter prisotnost neznanih HR-HPV, ki jih z uporabljenimi različicami PCR nismo zaznali. Nekateri raziskovalci zato predlagajo uporabo dokazovanja izražanja p16 kot presejalnega testa in PCR kot potrditvenega testa (Smeets in sod., 2007).

V dveh HPV-DNA pozitivnih karcinomi nismo dokazali niti mRNA HPV16 E7 niti celične beljakovine p16, iz česar lahko sklepamo, da je virus v teh karcinomi prisoten zgolj naključno oz. da je vzrok za njun nastanek prisotnost drugih dejavnikov tveganja.

5.2 SKLEPI

- ⇒ Z uporabo treh različnih metod za dokazovanje in genotipizacijo HPV-DNA, smo v 47 arhivskih tkivnih vzorcih PCK ustne votline in ustnega dela žrela določili 10,6% prevalenco okužbe s HPV (HPV16) in tako potrdili našo hipotezo, da bomo HPV-DNA dokazali v 5-15 % analiziranih novotvorb. Dokazana prevalenca spada med najnižje doslej objavljene prevalence HPV-DNA v vzorcih PCK ustne votline in ustnega dela žrela.
- ⇒ Rezultati naše raziskave se ujemajo z rezultati predhodno izvedene raziskave v Sloveniji na vzorcih PCK ustne votline (Kansky in sod., 2003), v kateri so, v primerljivi skupini bolnikov, določili 8,4 % prevalenco okužbe s HPV. Na podlagi te primerjave sklepamo, da incidenca teh tumorjev v Sloveniji ne narašča.
- ⇒ Glede na ugotovljeno zelo nizko prevalenco HPV-DNA v slovenskih vzorcih raka ustne votline in ustnega dela žrela menimo, da imajo pri nas, vsaj pri starejši populaciji, glavno vlogo v razvoju teh tumorjev drugi dejavniki tveganja (kajenje in prekomerno uživanje alkohola) in ne okužba s HR-HPV.
- ⇒ V predhodno objavljenih raziskavah (Syrjänen, 2004; Kreimer in sod., 2005) poročajo o višji prevalenci HPV-DNA v karcinomi ustnega dela žrela v primerjavi s karcinomi ustne votline. Na podlagi naših rezultatov, lahko zaključimo, da so redki HPV-pozitivni tumorji v Sloveniji enako pogosti v ustni votlini in ustnem delu žrela, vendar bi za natančno opredelitev prevalence HPV v teh dveh predelih morali v raziskavo vključiti večje število vzorcev.
- ⇒ Na podlagi primerjave rezultatov določanja prisotnosti HPV-DNA, določanja izražanja celične beljakovine p16 in izražanja mRNA HPV16 E7 sklepamo, da je imela okužba s HPV pomembno vlogo pri nastanku le 6,4 % analiziranih rakov ustne votline in ustnega dela žrela.

6 POVZETEK

Razlikovanje med HPV-pozitivnimi in –negativnimi tumorji je pomembno predvsem zaradi boljše napovedi poteka bolezni pri bolnikih s HPV-pozitivnimi tumorji ustne votline in ustnega dela žrela. Pri teh bolnikih je, kljub temu, da diagnozo postavijo relativno pozno, 60-80 % nižje tveganje smrtnega izida kot pri bolnikih s HPV-negativnimi tumorji (zur Hausen, 2009; Syrjänen, 2010).

V diplomski nalogi smo želeli z različnimi metodami za dokazovanje in genotipizacijo HPV-DNA najprej določiti prevalenco okužbe s HPV v arhivskih tkivnih vzorcih ploščatoceličnega karcinoma ustne votline in ustnega dela žrela (PCK-UV/-UŽ). Z ugotavljanjem izražanja celične beljakovine p16 in gena E7 HPV16 smo nato želeli ugotoviti, katere HPV-DNA pozitivne tumorje dejansko povzročajo HPV.

Z uporabo klasičnega GP5+/6+/68 PCR v kombinaciji s sekveniranjem, Abbott RealTime High Risk HPV testa in HPV-16 PCR v realnem času smo HPV-DNA (HPV16) dokazali v 5/47 (10,6 %) vzorcih PCK-UV/-UŽ.

Dokazovanje izražanja tumorogene beljakovine E7 HPV16 smo izvedli v petih vzorcih PCK, pri katerih smo predhodno potrdili prisotnost HPV-DNA, in 10 HPV-DNA negativnih vzorcih PCK. Izražanje omenjene beljakovine dokazali le v 3/5 (60 %) HPV-DNA pozitivnih vzorcih PCK-UV/-UŽ.

Z imunohistokemijsko metodo smo izražanje celične beljakovine p16 dokazali pri 16,3 % (7/43) analiziranih tumorjev; pri treh od teh vzorcev smo dokazali tudi HPV-DNA in izražanje mRNA HPV16 E7, štirje p16 pozitivni vzorci so bili HPV-DNA negativni.

Na podlagi rezultatov dokazovanja HPV-DNA, izražanja mRNA HPV16 E7 ter izražanja celične beljakovine p16 sklepamo, da je imela okužba s HPV pomembno vlogo pri razvoju raka le pri treh bolnikih, pri katerih smo dobili pozitivne rezultate z vsemi tremi omenjenimi metodami.

Rezultate naše raziskave smo primerjali z rezultati predhodno izvedene raziskave v Sloveniji na vzorcih PCK-UV primerljive skupine bolnikov (Kansky in sod., 2003). Ugotovili smo, da se incidenca HPV pozitivnih tumorjev, v naši državi, v 10 letih ni spremenila. Na podlagi rezultatov obeh raziskav sklepamo, da nastanek PCK-UV/-UŽ pri nas, vsaj v starejši populaciji, ni povezan z okužbo s HPV.

7 VIRI

- Agoston E.S., Robinson S.J., Mehra K.K., Birch C., Semmel D., Mirkovic J., Haddad R.I., Posner M.R., Kindelberger D., Krane J.F., Brodsky J., Crum C.P. 2010. Polymerase chain reaction detection of HPV in squamous carcinoma of the oropharynx. *American Journal of Clinical Pathology*, 134, 1: 36-41
- Allen C.T., Lewis J.S. Jr., El-Mofty S.K., Haughey B.H., Nussenbaum B. 2010. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope*, 120, 9: 1756-1772
- Angiero F., Gatta L.B., Seramondi R., Berenzi A., Benetti A., Magistro S., Ordesi P., Grigolato P., Dessy E. 2010. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Research*, 30, 9: 3435-3440
- Balaram P., Nalinakumari K.R., Abraham E., Balan A., Hareendran N.K., Bernard H.U., Chan S.Y. 1995. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers-high prevalence and multiplicity of infections. *International Journal of Cancer*, 61, 4: 450-454
- Bernard H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32: 1-6
- Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., Hausen H., de Villiers E.M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401: 70-79
- Bhawal U.K., Sugiyama M., Nomura Y., Sawajiri M., Tsukinoki K., Ikeda M.A., Kuniyasu H. 2007. High-risk human papillomavirus type 16 E7 oncogene associates with Cdc25A over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archives*, 450, 1: 65-71

- Bosch F.X., Rohan T., Schneider A., Frazer I., Pfister H., Castellsagué X., de Sanjosé S., Moreno V., Puig-Tintore L.M., Smith P.G., Muñoz N., zur Hausen H. 2001. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus Conference. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 163–175
- Bottalico D., Chen Z., Dunne A., Ostolozza J., McKinney S., Sun C., Schlecht N.F., Fatahzadeh M., Herrero R., Schiffman M., Burk R.D. 2011. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *Journal of Infectious Diseases*, 204: 787–792
- Braakhuis B.J.M., Snijders P.J.F., Keune W.J.H., Meijer C.J.L.M., Ruijter-Schippers H.J., Leemans C.R. 2004. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human Papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute*, 96: 998-1006
- Brunner M., Koperek O., Wrba F., Erovic B.M., Heiduschka G., Schopper C., Thurnher D. 2011. HPV infection and p16 expression in carcinomas of the minor salivary glands. *European Archives of Otorhinolaryngology*, doi: 10.1007/s00405-011-1894-2: 5 str. (v tisku)
- Bustos D.A., Pavan J.V., Carricart S.E., Talavera A.D., Secchi D., Carrica V., Panico R.L., Gendelman H. 1999. Human papillomavirus detection in oral cancer lesions in the city of Córdoba. *Revista de La Facultad de Ciencias Medicas Cordoba*, 1956, 1: 65-71
- Campisi G., Panzarella V., Giuliani M., Lajolo C., Di Fede O., Falaschini S., Di Liberto C., Scully C., Lo Muzio L. 2007. Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (Review). *International Journal of Oncology*, 30: 813-823
- Cantley R.L., Gabrielli E., Montebelli F., Cimbaluk D., Gattuso P., Petruzzelli G. 2011. Ancillary studies in determining human papillomavirus status of squamous cell

- carcinoma of the oropharynx: a review. *Pathology Research International*, 2011: e138469, doi: 10.4061/2011/138469: 7 str.
- Cao J., Zhang Z.Y., Patima, Zhang Y.X., Chen W.T. 2000. Human papillomavirus infection and p53 alteration in oral squamous cell carcinoma. *Chinese Journal of Dental Research*, 3, 3: 44-49
- Cerovac Z., Sarcević B., Kralj Z., Ban J. 1996. Detection of human papillomavirus (HPV) type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by *in situ* hybridization. *Neoplasma*, 43, 3:185-194
- Chang F., Syrjanen S., Kellokoski J., Syrjanen K. 1991. Human papillomavirus infections and their associations with oral disease. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 20: 305-310
- Chang J.Y., Lin M.C., Chiang C.P. 2003. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *American Journal of Clinical Pathology*, 120, 6: 909-916
- Chaudhary A.K., Singh M., Sundaram S., Mehrotra R. 2009. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head and Neck Oncology*, 1: e22, doi: 10.1186/1758-3284-1-22: 12 str.
- Chin-Hong P.V., Klausner J.D. 2008. New diagnostic tests for HPV in the developed and the developing world. *Medical Laboratory Observer*, 40, 11: 48-52
- Chiu C., Miller S. 2011. Microarrays and deep sequencing in clinical microbiology. *Microbe*, 6, 1: 13-20

- Cox M., Maitland N., Scully C. 1993. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *European Journal of Cancer*, 29, 3: 215-219
- Danos O., Katinka M., Yaniv M. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO Journal*, 1, 2: 231-236
- de Roda Hausman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., Meijer C.J., Snijders P.J. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 74, 4: 1057-1062
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- de Villiers E.M., Weidauer H., Otto H., zur Hausen H. 1985. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *International Journal of Cancer*, 36: 575-578
- DiMaio D., Lai C.C., Mattoon D. 2000. The platelet-derived growth factor b receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 11: 283-293
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541
- Evans M.F., Adamson C.S.C., Simmons-Arnold L., Cooper K. 2005. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Pathology*, 5: e10, doi:10.1186/1472-6890-5-10: 14 str.

- Fornatora M., Jones A.C., Kerpel S., Freedman P. 1996. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 82: 47-56
- Fouret P., Monceaux G., Temam S., Lacourreye L., St Guily J.L. 1997. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 123, 5: 513-516
- Galvao Castro T.P.P., Bussoloti IF. 2006. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 72, 2: 272-282
- Giuliano A.R., Tortolero-Luna G., Ferrer E., Burchell A.N., de Sanjose S., Kjaer S.K., Muñoz N., Schiffman M., Bosch F.X. 2008. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions, *Vaccine*, 26: 17–28
- Glombitza F., Guntinas-Lichius O., Petersen I. 2010. HPV status in head and neck tumors. *Pathology, Research and Practice*, 206, 4: 229-234
- Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Inc: 400 str.
- Graham S.V. 2010. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5, 10: 1493-1506
- Greer C.E., Wheeler C.M., Manos M.M. 1994. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods and Applications*, 3: 113–122
- Greer R.O., Meyers A., Said S.M., Shroyer K.R. 2008. Is p16(INK4a) protein expression in oral ST lesions a reliable precancerous marker? *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37, 9: 840-846

- Hannisdal K., Schjølberg A., De Angelis P.M., Boysen M., Clausen O.P. 2010. Human papillomavirus (HPV)-positive tonsillar carcinomas are frequent and have a favourable prognosis in males in Norway. *Acta Otolaryngologica*, 130, 2: 293-299
- Helliwell T. 2011. The impact of HPV on the diagnosis and management of patients with oropharyngeal carcinoma. V: *Tumorji v povezavi z okužbo s človeškimi virusi papiloma (HPV)*. Zbornik predavanj ob XLII Memorialnem sestanku profesorja Janeza Plečnika. Gale N., Poljak M., Luzar B., Vizjak A., Volavšek M., Cardesa A. (ur.) Ljubljana, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani: 207-210
- Hoffman H.T., Karnell L.H., Funk G.F., Robinson R.A., Menck H.R. 1998. The national cancer data base report on cancer of the head and neck. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 124, 9: 951-962
- Holladay E.B., Gerald W.L. 1993. Viral gene detection in oral neoplasms using the polymerase chain reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 100, 1: 36-40
- Hubbard R.A. 2003. Human papillomavirus testing methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127: 940-945
- Ishibashi M., Kishino M., Sato S., Morii E., Ogawa Y., Aozasa K., Kogo M., Toyosawa S. 2011. The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control. *International Journal of Clinical Oncology*, 16, 6: 646-653
- Jacobs M.V., Snijders P.J., van den Brule A.J., Helmerhorst T.J., Meijer C.J., Walboomers J.M. 1997. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 3: 791-795
- Kahn J.A. 2009. HPV Vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. *New England Journal of Medicine*, 361: 271-278

- Ke L.D., Adler-Storthz K., Mitchell M.F., Clayman G.L., Chen Z. 1999. Expression of human papillomavirus E7 mRNA in human oral and cervical neoplasia and cell lines. *Oral Oncology*, 35, 4: 415-420
- Kansky A.A., Poljak M., Seme K., Kocjan B.J., Gale N., Luzar B., Golouh R. 2003. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virologica*, 47: 11-16
- Kleist B., Poetsch M., Bankau A., Werner E., Herrmann F.H., Lorenz G. 2000. First hints for a correlation between amplification of the Int-2 gene and infection with human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 29, 9: 432-437
- Kocjan B.J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41-60
- Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. 2011. Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for the detection of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical cancer specimens. *Journal of Virological Methods*, 175: 117– 119
- Kovanda A., Kocjan B.J., Luzar B., Bravo I.G., Poljak M. 2011. Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS ONE*, 6, 7: e22529, doi:10.1371/journal.pone.0022529: 10 str.
- Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14: 467-475
- Kumaraswamy K.L., Vidhya M. 2011. Human papillomavirus and oral infections: An update. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 7: 120-127

- Llamas-Martínez S., Esparza-Gómez G., Campo-Trapero J., Cancela-Rodríguez P., Bascones-Martínez A., Moreno-López L.A., García-Núñez J.A., Cerero-Lapiedra R. 2008. Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer Research*, 28, 6: 3733-3741
- Li L., Barry P., Yeh E., Glaser C., Schnurr D., Delwart E. 2009. Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *Journal of General Virology*, 90: 2413–2417
- Li W., Thompson C.H., O'Brien C.J., McNeil E.B., Scolyer R.A., Cossart Y.E., Veness M.J., Walker D.M., Morgan G.J., Rose B.R. 2003. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *International Journal of Cancer*, 106, 4: 553-558.
- Lindel K., Helmke B., Simon C., Weber K.J., Debus J., de Villiers E.M. 2009. Cutaneous human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Investigation*, 27, 7: 781-787
- Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93: 125-128
- Löning T., Ikenberg H., Becker J., Gissmann L., Hoepfer I., zur Hausen H. 1985. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *Journal of Investigative Dermatology*, 84: 417–420
- Maitland N.J., Cox M.F., Lynas C., Prime S.S., Meanwell C.A., Scully C. 1987. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *British Journal of Cancer*, 56, 3: 245-250.
- Malone J.H., Oliver B. 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9: e34, doi:10.1186/1741-7007-9-34: 9 str.

- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437: 376–380
- Mellin H., Friesland S., Auer G., Dalianis T., Munck-Wikland E. 2003. Human papillomavirus and DNA ploidy in tonsillar cancer-correlation to prognosis. *Anticancer Research*, 23, 3: 2821-2828
- Mendelsohn A.H., Lai C.K., Shintaku I.P., Elashoff D.A., Dubinett S.M., Abemayor E., St John M.A. 2010. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope*, 120, 9: 1788-1794
- Moody C.A., Laimins L.A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews: Cancer*, 10, 8: 550-560
- Mork J., Lie A.K., Glatte E., Hallmans G., Jellum E., Koskela P., Møller B., Pukkala E., Schiller J.T., Youngman L., Lehtinen M., Dillner J. 2001. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 344, 15: 1125-1131
- Münger K. 2002. The role of Human papillomaviruses in human cancers. *Frontiers in Bioscience*, 7: 641-649
- Münger K., Phelps W.C., Bubb V., Howley P.M., Schlegel R. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*, 63: 4417-4421
- Nagpal J.K., Patnaik S., Das B.R. 2002. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *International Journal of Cancer*, 97, 5:649-653

- Nemes J.A., Deli L., Nemes Z., Márton I.J. 2006. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 3: 344-352
- Nuovo G.J. 2011. *In situ* detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods in Molecular Biology*, 688: 35-46
- Ostwald C., Müller P., Barten M., Rutsatz K., Sonnenburg M., Milde-Langosch K., Löning T. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. 1994. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 23, 5: 220-225
- Parkin D.M., Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 21, 24: 11–25
- Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L. Jr. 2007. Improved sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques*, 43: 58-62
- Poljak M. 2007. Molekularno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 133-134
- 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., Kocjan B.J. 2010. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses (HPV). *Expert Reviews of Anti-infective Therapy*, 10, 8: 1139-1162
- Poljak M., Kocjan B.J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 2: 60-72

- Poljak M., Oštrbenk A., Seme K., Učakar V., Hillemanns P., Bokal E.V., Jančar N., Klavs I. 2011. Comparison of clinical and analytical performance of the Abbott RealTime High Risk HPV test to the performance of Hybrid Capture 2 in population-based cervical cancer screening. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 5: 1721-1729
- Premoli-De-Percoco G., Ramirez J.L. 2001. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 30, 6: 355-361
- Premoli-De-Percoco G., Ramírez J.L., Galindo I. 1998. Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology: An *in situ* hybridization study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 86, 1: 77-81
- Rector A., Tachezy R., Van Ranst M. 2004. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of Virology*, 78: 4993–4998
- Reinstein E., Scheffner M., Oren M., Ciechanover A., Schwartz A. 2000. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*, 19: 5944-5950
- Ribeiro K.B., Levi J.E., Pawlita M., Koifman S., Matos E., Eluf-Neto J., Wunsch-Filho V., Curado M.P., Shangina O., Zaridze D., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Daudt A., Menezes A., Bencko V., Mates D., Fernandez L., Fabianova E., Gheit T., Tommasino M., Boffetta P., Brennan P., Waterboer T. 2011. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *International Journal of Epidemiology*, 40, 2: 489-502
- Schwartz S.M., Daling J.R., Doody D.R., Wipf G.C., Carter J.J., Madeleine M.M., Mao E.J., Fitzgibbons E.D., Huang S., Beckmann A.M., McDougall J.K., Galloway D.A.

1998. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *Journal of National Cancer Institute*, 90, 21:1626-1636
- SEEK Training Modules. 2011. Head and neck cancer. Bethesda, U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute: 1 str.
<http://training.seer.cancer.gov/head-neck/anatomy/mouth.html> (oktober 2011)
- Seaman W.T., Andrews E., Couch M., Kojic E.M., Cu-Uvin S., Palefsky J., Deal A.M., Webster-Cyriaque J. 2010. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virology Journal*, 19, 7: e194, 10.1186/1743-422X-7-194: 17 str.
- Shi W., Kato H., Perez-Ordenez B., Pintilie M., Huang S., Hui A., O'Sullivan B., Waldron J., Cummings B., Kim J., Ringash J., Dawson L.A., Gullane P., Siu L., Gillison M., Liu F.F. 2009. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with *in situ* hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 36: 6213-6221
- Shindoh M., Chiba I., Yasuda M., Saito T., Funaoka K., Kohgo T., Amemiya A., Sawada Y., Fujinaga K. 1995. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer*, 76, 9: 1513-1521
- Smeets S.J., Hesselink A.T., Speel E.J., Haesevoets A., Snijders P.J., Pawlita M., Meijer C.J., Braakhuis B.J., Leemans C.R., Brakenhoff R.H. 2007. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International Journal of Cancer*, 121: 2465-2472
- Smith E.M., Ritchie J.M., Yankowitz J., Wang D., Turek L.P., Haugen T.H. 2004. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infectious Diseases of Obstetrics and Gynecology*, 12, 2: 45-56

- Snietura M., Piglowski W., Jaworska M., Mucha-Malecka A., Wozniak G., Lange D., Suwinski R. 2011. Impact of HPV infection on the clinical outcome of p-CAIR trial in head and neck cancer. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 268: 721-726
- Snijders P.J., Scholes A.G., Hart C.A., Jones A.S., Vaughan E.D., Woolgar J.A., Meijer C.J., Walboomers J.M., Field J.K. 1996. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *International Journal of Cancer*, 66, 4: 464-469
- Spence A.R., Franco E.L.F. 2006. Screening for cervical cancer using HPV tests. V: *The cervix*. Jordan J.J., Singer A., Jones H.W., Shafi M.I. (eds.). Malden, Blackwell Publishing: 373-386
- Stanley M.A., Pett M.R., Coleman N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1456-1460
- Sterlinko Grm H., Bergant M., Banks L. 2009. Human papillomavirus infection, cancer and therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 130: 277-285
- St Guily J.L., Clavel C., Okäis C., Prétet J.L., Beby-Defaux A., Agius G., Birembaut P., Jacquard A.C., Léocmach Y., Soubeyrand B., Riethmuller D., Denis F., Mouglin C. 2011. Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head and Neck Oncology*, 3: e6, doi: 10.1186/1758-3284-3-6: 5 str.
- Strome S.E., Savva A., Brissett A.E., Gostout B.S., Lewis J., Clayton A.C., McGovern R., Weaver A.L., Persing D., Kasperbauer J.L. 2002. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clinical Cancer Research*, 8, 4: 1093-1100
- Sturgis E.M., Cinciripini P.M. 2007. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus associated cancers? *Cancer*, 110, 7: 1429-1435

- Sugiyama M., Bhawal U.K., Dohmen T., Ono S., Miyauchi M., Ishikawa T. 2003. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 95, 5: 594-600
- 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: 334-339
- Syrjänen S. 2004. HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 57, 5: 449–455
- Syrjänen S. 2010. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of Oncology*, 21, 7: 243-245
- Syrjänen S., Lodi G., von Bültzingslöwen I., Aliko A., Arduino P., Campisi G., Challacombe S., Ficarra G., Flaitz C., Zhou H.M., Maeda H., Miller C., Jontell M. 2011. Human papillomavirus in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases*, 17, 1: 58–72
- Syrjänen S.M., Syrjänen K.J., Lamberg M.A. 1986. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using *in situ* DNA-hybridization applied on paraffin sections. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 62, 6: 660-667
- Syrjänen K.J., Pyrhönen S., Syrjänen S.M., Lamberg M.A. 1983. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *British Journal of Oral Surgery*, 21: 147–153
- Szentirmay Z., Pólus K., Tamás L., Szentkúti G., Kurcsics J., Csernák E., Tóth E., Kásler M. 2005. Human papillomavirus in head and neck cancer: Molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24: 19-34

- Tieben L.M., ter Schegget J., Minnaar R.P. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *Journal of Virological Methods*, 42: 265-279
- Tsuhako K., Nakazato I., Miyagi J., Iwamasa T., Arasaki A., Hiratsuka H., Sunakawa H., Kohama G., Abo T. 2000. Comparative study of oral squamous cell carcinoma in Okinawa, Southern Japan and Sapporo in Hokkaido, Northern Japan; with special reference to human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 29, 2: 70-79
- van den Brule A.J., Pol R., Fransen-Daalmeijer N., Schouls L.M., Meijer C.J., Snijders P.J. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3: 779-787
- Wacker M.J., Godard M.P. 2005. Analysis of One-step and Two-step Real-Time RT-PCR using Super Script III. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16, 3: 266-271
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews: Genetics*, 10: 57-63
- Wang-Johanning F., Lu D.W., Wang Y., Johnson M.R., Johanning G.L. 2002. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using Real-Time polymerase chain reaction analysis. *Cancer*, 94, 8: 2199-2210
- Watanabe S., Kanda T., Yoshiike K. 1989. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *Journal of Virology*, 63: 965-969

- Wen S., Tsuji T., Li X., Mizugaki Y., Hayatsu Y., Shinozaki F. 1997. Detection and analysis of human papillomavirus 16 and 18 homologous DNA sequences in oral lesions. *Anticancer Research*, 17, 1: 307-311
- Weinberger P.M., Yu Z., Haffty B.G., Kowalski D., Harigopal M., Brandsma J., Sasaki C., Joe J., Camp R.L., Rimm D.L., Psyrri, A. 2006. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 736–747
- Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248: 76-79
- Wu J., Feng T., Xu R., Ye F., Petersen B.E., Cheng L., Zhong D.Y. 2008. Diagnostic methodology and technology. V: Molecular genetic pathology. Cheng L., Zhang D.Y. (eds.). Totowa, Humana Pres: 65-131
- Yamakawa-Kakuta Y., Kawamata H., Doi Y., Fujimori T., Imai Y. 2009. Does the expression of HPV16/18 E6/E7 in head and neck squamous cell carcinomas relate to their clinicopathological characteristics? *International Journal of Oncology*, 35, 5: 983-988
- Young S.K., Min K.W. 1991. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 71, 6: 726-729
- Zeuss M.S., Miller C.S., White D.K. 1991. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 71, 6: 714-720
- Zheng Z.M., Baker C.C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11: 2286–2302

zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infection- a major cause of human cancers.
Biochimica Biophysica Acta, 1288: 55-78

zur Hausen H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical
account. Virology, 384: 260-265

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorju, prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., ker mi je omogočil izvedbo diplomske naloge v svojem laboratoriju in sodelovanje v raziskovalnem delu ter mi s tem uresničil sanje.

Iskrena hvala somentorju, razisk. asist. dr. Boštjanu Kocjanu, univ. dipl. mikrobiol., za zaupanje, podporo, usmerjanje pri izvedbi in pisanju diplomske naloge, prenekateri koristen nasvet ter, ker mi je posvetil velik del svojega časa in pomagal pridobiti veliko neprecenljivega znanja.

Hvala prof. dr. Katji Seme, dr. med. za recenzijo diplomskega dela in vse prijazne besede.

Hvala prof. dr. Nini Gale, dr. med. za pripravo arhivskih tkivnih vzorcev in izvedbo imunohistokemijske metode. Hvala dr. Katarini Odar, dr. dent. med. za prijaznost in pomoč pri interpretaciji rezultatov in razlago imunohistokemijske metode.

Prav tako bi se rada zahvalila Mateji, Maji, Anji, Kristini, Robiju, Tini, Blanki, Adeli in vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, ker so me lepo sprejeli medse ter za vso pomoč in prijetno vzdušje med delom.

Najlepša hvala mojim staršem in bratu za podporo skozi celoten študij, da so verjeli vame, poslušali moje predolge monologe in, da so me vsaki vikend napolnili s pozitivno energijo in novimi močmi.

Hvala Sonji, Mateji in vsem ostalim prijateljem ter sorodnikom za številne prijetne trenutke in vzpodbudo.

PRILOGA A: Splošni podatki bolnikov, katerim so bili odvzeti vzorci PCK, in rezultati testiranj

Št. DNA izolata	Spol	Starost	Lokalizacija/ Sub-lokalizacija	HPV-DNA			mRNA HPV16 E7	Izražanje p16
				GP5+/6+/68	Abbott RT-PCR	HPV16 E7 RT-PCR		
			Ustna votlina:					
1	ž	65	Jezik	HPV16	HPV16	HPV16	1	1
2	m	54	Trdo nebo	-	-	-	nt	0
3	m	53	Jezik	-	-	-	nt	0
5	m	53	Trdo nebo	-	-	-	nt	0
7	m	52	Trdo nebo	-	-	-	0	1
8	m	53	Ustno dno	-	-	-	nt	0
11	m	77	Trdo nebo	-	-	-	nt	0
13	m	66	Jezik	-	-	-	0	1
20	ž	55	Trdo nebo	HPV16	HPV16	HPV16	1	1
21	m	67	Jezik	-	-	-	nt	0
24	m	45	Retromolarni trigonum	HPV16	HPV16	HPV16	0	0
25	m	57	Ustno dno	-	-	-	nt	0
28	m	54	Ustno dno	-	-	-	nt	0
32	ž	64	Jezik	-	-	-	nt	0
36	m	68	Ustno dno	-	-	-	0	0
38	m	47	Ustno dno	-	-	-	nt	0
39	ž	54	Trdo nebo	-	-	-	nt	0
40	ž	66	Ustno dno	-	-	-	nt	0
42	ž	85	Jezik	-	-	-	nt	0
45	m	80	Jezik	-	-	-	0	1
			Ustni del žrela:					
4	m	57	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
6	ž	56	Mandlji	-	-	-	nt	0
9	m	72	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
10	m	52	Mehko nebo	-	-	-	0	nt
12	m	46	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
14	m	79	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0

Se nadaljuje

Nadaljevanje

PRILOGA A: Splošni podatki bolnikov, katerim so bili odvzeti vzorci PCK, in rezultati testiranj

Št. DNA izolata	Spol	Starost	Lokalizacija/ Sub-lokalizacija	HPV-DNA			mRNA HPV16 E7	Izražanje p16
				GP5+/6+/68	Abbott RT-PCR	HPV16 E7 RT-PCR		
			Ustni del žrela:					
19	m	67	Ni opredeljeno	HPV16	HPV16	HPV16	0	0
22	m	55	Valekula	-	-	-	0	1
26	m	57	Mandlji	HPV16	HPV16	HPV16	1	1
27	m	57	Ni opredeljeno	-	-	-	0	0
29	m	66	Mandlji	-	-	-	nt	0
31	m	45	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
33	m	56	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
34	m	81	Ni opredeljeno	-	-	-	nt	0
35	m	58	Ni opredeljeno	-	-	-	0	0
37	m	44	Mandlji	-	-	-	nt	0
43	m	54	Koren jezika	-	-	-	nt	0
44	m	69	Koren jezika	-	-	-	nt	0
			Ni podatka o lokalizaciji:					
15	m	41	UV/ UŽ	-	-	-	0	0
16	m	41	UV/ UŽ	-	-	-	nt	0
17	m	81	UV/ UŽ	-	-	-	nt	0
18	ž	52	UV/ UŽ	-	-	-	nt	0
23	ž	68	UV/ UŽ	-	-	-	0	nt
30	m	65	UV/ UŽ	-	-	-	nt	nt
41	ž	62	UV/ UŽ	-	-	-	nt	0
46	ž	71	UV/ UŽ	-	-	-	nt	0
47	ž	67	UV/ UŽ	-	-	-	nt	nt

Legenda: m- moški; ž- ženska; UV- ustna votlina, UŽ- ustni del žrela, izražanje p16: 0- negativno, 1- >50 % pozitivnih tumorskih celic; nt- ni bilo testirano