

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja KOVANDA

MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC
HUMANEGA VIRUSA PAPILOMA HPV-53 IZ BELGIJE

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE**

Anja KOVANDA

**MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC HUMANEGA
VIRUSA PAPILOMA HPV-53 IZ BELGIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS HPV-53
SUBTYPE VARIANTS FROM BELGIUM**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Maria Poljaka, dr. med, za somentorja dr. Boštjana Kocjana univ. dipl. mikrobiol. in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme dr. med.

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

Somentor : 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

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.

Anja Kovanda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 578.2/.8:616-006.5(043)=163.6
- KG virusi/humani virus papiloma/HPV-53/izolati iz Belgije/podtipske različice/področje
LCR/gen E6/gen E7/molekularne tehnike/sekveniranje/filogenetske analize
- AV KOVANDA, Anja
- 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 2008
- IN MOLEKULARNA OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC HUMANEGA
VIRUSA PAPILOMA HPV-53 IZ BELGIJE
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 68 str., 3 pregl., 11 sl., 59 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Humani virusi papiloma (HPV) so zelo heterogena skupina majhnih DNA virusov, ki jih etiološko povezujemo z različnimi benignimi in malignimi spremembami kože in epitela sluznic. Čeprav so genotipi HPV značilno povezani z nastankom določenih bolezni (npr. rak materničnega vratu (RMV), genitalne bradavice (GB)), se slednje ne razvijejo pri vseh okuženih osebah. Genotip HPV-53 okužuje epitel sluznice anogenitalnega predela in je etiološko najpogosteje povezan z spremembami MV nižje stopnje. Med verjetno visokorizične genotipe ga uvrščamo zaradi tega, ker so ga odkrili tudi pri posamičnih primerih RMV. Ena od možnih razlag, zakaj se le pri redkih ženskah okuženih s HPV-53 razvije RMV, je, da so okužene z značilno, domnevno bolj patogeno, podtipsko različico HPV-53. V naši raziskavi smo z molekularno analizo treh področij virusnega genoma (LCR, E6, E7) želeli opredeliti podtipske različice HPV-53 iz Belgije, ter jih na podlagi filogenetskih analiz uvrstiti med že poznane različice HPV-53. V raziskavi smo z pomočjo sekveniranja pri 12 izolatih HPV-53 opredelili 6 različic področja LCR, 4 različice gena E6 in 1 različico gena E7. Z raziskavo smo potrdili domnevo o filogenetski uvrstitvi belgijskih različic HPV-53, saj so se le-te uvrstile tako med že opisane slovenske podskupine, kot tudi med podskupine podtipskih različic HPV-53, ki so bile izolirane z več geografskih področij po svetu, odkrili pa smo tudi dve novi podskupini podtipskih različic HPV-53. Da bi lahko prišli do ustreznih zaključkov glede vpliva polimorfizmov na patogenezo pri podtipskih različicah HPV-53, bi bile potrebne nadaljne raziskave polimorfizma še drugih genomskih področij, podrobnejše raziskave konformacijskih različic onkogenih beljakovin E6 in E7, in molekularna opredelitev podtipskih različic genotipa HPV-53 osamljenih pri ženskah z RMV.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.2/.8:616-006.5(043)=163.6
- CX viruses/human papillomavirus/HPV-53/Belgian isolates/subtype variants/LCR region/E6 gene/E7 gene/molecular methods/sequencing/phylogenetic analysis
- AU KOVANDA, Anja
- 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 2008
- TI MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS HPV-53 SUBTYPE VARIANTS FROM BELGIUM
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 68 p., 3 tab., 11 fig., 59 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Human papillomaviruses (HPV) are a diverse group of small DNA viruses etiologically associated with various benign and malignant changes of skin and mucous epithelia. Although HPV genotypes are distinctly related to the development of certain diseases (for example cervical cancer or genital warts), these diseases don't affect all infected individuals. Genotype HPV-53 infects mucous epithelium of the anogenital region and is etiologically associated mostly with the development of low-grade cervical lesions. HPV-53 is classified as a probable high-risk genotype as a result of it being found in several cases of cervical cancer. One of the possible explanations to why only a few of the women infected with HPV-53 develop cervical cancer, may be that they are infected with a certain presumably more pathogenic subtype variant of HPV-53. The purpose of our research was to characterize subtype variants of HPV-53 from Belgium by the molecular analysis of three regions of the viral genome (LCR, E6, E7) and to phylogenetically place these variants among the already known subtypes of HPV-53. By our research based on sequencing, we have identified 6 variants of LCR region, 4 variants of the gene E6 and 1 variant of the gene E7 among 12 isolates of HPV-53 from Belgium. We have also confirmed our assumptions about the phylogenetical placement of the Belgian HPV-53 variants, as they were grouped either with isolates found only in Slovenia or isolates that were present in many different geographical regions. In addition, we have identified two new sub-groups of HPV-53 subtype variants. In order that we may draw appropriate conclusions about the influence of polymorphisms on the pathogenicity of subtype variants of HPV-53, additional research is needed. It would need to focus on the polymorphism of additional parts of the viral genome, the conformational variants of the oncoproteins E6 and E7 and the molecular characterization of the HPV-53 subtype variants from women with cervical cancer.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA.....	3
2.1.1 Zgradba in organizacija genoma	3
2.1.2 Razmnoževanje HPV	3
2.1.3 Patogeneza HPV	5
2.1.4 Razvrščanje HPV	8
2.1.4.1 Genotipi in podtipske različice.....	8
2.1.4.2 Razvrščanje genotipov HPV	8
2.1.5 RMV in HPV.....	13
2.1.6 Podtipske različice in njihov patogenetski pomen	14
2.1.7 Diagnostika okužb s HPV	16
2.1.7.1 Hibridizacijske metode.....	16
2.1.7.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin.....	17
2.1.7.2.1 Verižna reakcija s polimerazo	17
2.1.7.2.2 Metode za dokazovanje oz. opredeljevanje pridelkov PCR	18
2.1.7.2.2.1 Določanje polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov, RFLP	18
2.1.7.2.2.2 Hibridizacijske metode dokazovanja pridelkov PCR.....	18
2.1.7.2.2.3 Metoda direktnega določanja nukleotidnega zaporedja	19
2.1.7.2.3 Verižna reakcija z polimerazo v realnem času	19
2.1.7.2.4 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA.....	20
2.1.7.2.5 Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA.....	21

2.1.8	HPV-53	21
2.1.8.1	Odkritje in razvrščanje HPV-53	21
2.1.8.2	Prevalenca okužb s HPV-53	22
2.1.8.3	Podtipske različice HPV-53	22
2.1.9	Namen dela.....	24
3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	MATERIALI	25
3.2	METODE.....	25
3.2.1	Osamitev DNA	25
3.2.2	Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnosti zaviralcev PCR.....	26
3.2.3	Dokazovanje DNA HPV-53 z uporabo tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov.....	27
3.2.4	Pomnoževanje genomskih področij HPV-53	28
3.2.4.1	Pomnoževanje genomskega področja LCR.....	29
3.2.4.2	Pomnoževanje gena E6	29
3.2.4.3	Pomnoževanje gena E7	30
3.2.5	Dokazovanje in analiza pridelkov PCR	30
3.2.6	Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja in določanje podtipskih različic HPV-53	31
3.2.6.1	Čiščenje in določanje koncentracije pridelkov PCR.....	31
3.2.6.2	Izvedba sekvenčne reakcije	33
3.2.6.3	Čiščenje sekvenčne reakcije z natrijevim acetatom in etanolom ..	34
3.2.6.4	Analiza nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic LCR, E6 in E7 HPV-53.....	35
3.2.7	Filogenetske analize.....	35
4	REZULTATI	37
4.1	PREVERJANJE KVALITETE DNA IN DOKAZOVANJE HPV-53 ..	37

4.2 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IN OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-53.....	39
4.2.1 Podtipska različnost genomskega področja LCR	39
4.2.2 Podtipska različnost genov E6 in E7	40
4.2.3 Genomske različice.....	41
4.3 FILOGENETSKA UVRSTITEV LCR RAZLIČIC HPV-53 IZ BELGIJE.....	42
4.3.1 Filogenetska drevesa	42
4.3.1.1 Filogenetsko drevo izrisano z pomočjo metode UPGMA	42
4.3.1.2 Filogenetsko drevo izrisano z metodo najbližjega soseda (NJ)	44
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	45
5.1 RAZPRAVA.....	45
5.1.1 Material in pomnoževanje genomskih področij LCR, E6 in E7..	45
5.1.2 Opredelitev podtipskih različic HPV-53	45
5.1.3 Filogenetske analize.....	46
5.2 SKLEPI.....	47
6 POVZETEK.....	48
7 VIRI	50
8 ZAHVALA.....	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrstna razporeditev HPV, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni povezane z genotipi HPV uvrščenimi v rodove PV alfa, beta, gama, mu in nu (De Villiers in sod., 2004).	11
Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, tarčni geni in velikost pričakovanih pridelkov PCR za HPV-53.....	28
Preglednica 3: Rezultati merjenja koncentracije osamljene DNA, pomnoževanja beta – globina in TS PCR za HPV-53.....	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz beljakovine E6 (Chakrabarti in Krishna, 2003).....	6
Slika 2: Shematski prikaz beljakovine E7 (Chakrabarti in Krishna, 2003.).....	7
Slika 3: Filogenetsko drevo družine <i>Papillomaviridae</i> (de Villiers in sod., 2004).....	9
Slika 4: Organizacija genoma HPV-53	22
Slika 5: Primeri pomnoževanja 536-bp dolgega predela humanega gena za beta-globin z začetnimi oligonukleotidi KM29/RS42.....	37
Slika 6: Rezultati pomnoževanja delcev HPV-53 v DNA osamljeni iz 8 vzorcev brisov MV z uporabo tipsko značilnih začetnih oligonukleotidov 53-99S/53-182R.....	38
Slika 7: Podtipske različice genomskega področja LCR HPV-53 opredeljene pri 12 izolatih HPV-53 iz Belgije.	40
Slika 8: Podtipske spremembe gena E6 opredeljene pri 12 izolatih HPV-53 iz Belgije.....	41
Slika 9: Genomske različice HPV-53 opredeljene pri 12 izolatih.....	41
Slika 10: Z metodo UPGMA izrisano filogenetsko drevo vseh do sedaj opredeljenih različic LCR HPV-53 iz različnih geografskih področij.	43
Slika 11: Z metodo najbližjega soseda izrisano filogenetsko drevo predstavnikov posameznih podskupin znotraj prototipske in neprototipske različice HPV-53.....	44

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	amino kislina
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EV	bolezen <i>epidermodysplasia verruciformis</i>
FDA	Ameriška uprava za hrano in zdravila (<i>angl. Food and Drug Administration</i>)
GB	genitalne bradavice, <i>condylomata acuminata</i>
HPV	humani virusi papiloma
LCR	dolgo uravnalno področje genoma pri virusih papiloma (<i>angl. long control region</i>)
mRNA	virusna sporočilna RNA (<i>angl. messenger RNA</i>)
MV	maternični vrat
NJ	metoda najbližjega sosedu (<i>angl. neighbor joining</i>)
ori	mesto začetka podvojevanja genoma (<i>angl. origin of replication</i>)
OZ	oligonukleotidni začetnik
PCR	verižna reakcija z polimerazo
PG	papilomi grla
PV	virusi papiloma
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (<i>angl. restriction fragment length polymorphism</i>)
RMV	rak materničnega vratu
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	število obratov na minuto (<i>angl. rotations per minute</i>)
RT PCR	verižna reakcija z polimerazo v realnem času (<i>angl. real-time PCR</i>)
TS PCR	tipsko specifična verižna reakcija z polimerazo
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine, (<i>angl. unweighted pair group method with arithmetic mean</i>)
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Humani virusi papiloma (HPV) so zelo heterogena skupina majhnih DNA virusov, ki jih etiološko povezujejo z različnimi benignimi in malignimi spremembami kože in epitela sluznic. Različni genotipi HPV so značilno povezani z razvojem določenih bolezni.

Do sedaj je bilo opredeljenih že več kot 100 genotipov HPV, od katerih sta klinično najbolj pomembna virusna genotipa HPV-16 in HPV-18, ki ju etiološko povezujemo z cervikalno intraepitelijsko neoplazijo najvišje stopnje in rakom materničnega vratu (RMV), oz. genotipa HPV-6 in HPV-11, ki sta povezana predvsem z razvojem benignih ploščatoceličnih sprememb, npr. genitalnih bradavic (GB) in papilomov grla (PG) (Poljak in sod., 1998., de Villiers in sod., 2004).

Genotip HPV-53 je bil odkrit leta 1989 v brisu materničnega vratu (Gallahan in sod., 1989) nosečnice brez vidnih citoloških oz. kliničnih sprememb. Na podlagi filogenetskih analiz HPV-53 uvrščamo v rod virusov papiloma alfa – vrsta 6, kamor poleg HPV-53 uvrščamo še genotipe HPV-30, HPV-66 in HPV-26. Vsi predstavniki te vrste okužujejo ploščatocelični epitel sluznic anogenitalnega predela, zato jih uvrščamo med sluznične genotipe HPV.

Čeprav okužbe s HPV-53 predstavljajo približno 10 % vseh dokazanih okužb s HPV (Kocjan, 2007), si z dosedanjim poznavanjem patogeneze okužbe s HPV-53 za zdaj ne znamo razložiti, zakaj se RMV razvije le pri redkih ženskah okuženih s HPV-53. Ena od možnih razlag je, da so te okužene z značilno, domnevno bolj patogeno, podtipsko različico HPV-53. Raznolikost podtipskih različic HPV-53 iz celega sveta sta zaenkrat raziskovali le dve raziskovalni skupini (Cerqueira in sod., 2003; Prado in sod., 2005). V Evropi so podtipsko raznolikost HPV-53 opredeljevali samo v Sloveniji (Kocjan in sod., 2007) in na Škotskem (Prado in sod., 2005). Do sedaj je tako skupaj znanih 26 genomskih različic HPV-53, ki tvorijo dihotomno razvejano filogenetsko drevo. Povezave med različnimi podtipskimi različicami HPV-53 in povečanim tveganjem za nastanek RMV za zdaj ni uspela dokazati nobena raziskovalna skupina.

Z molekularno analizo treh področij virusnega genoma smo v naši raziskavi želeli opredeliti podtipe različice belgijskih izolatov HPV-53 in jih s pomočjo filogenetskih analiz primerjati z že znanimi različicami HPV-53.

Pričakovali smo, da bo večji del različic HPV-53 iz Belgije podoben slovenskim oziroma različicam, opredeljenim pri ostalih evropskih izolatih. Za preostale izolate HPV-53 pa smo pričakovali, da bodo podobni tistim različicam, ki so zastopane v več populacijah po svetu. Glede na rezultate predhodnih raziskav, ki so pokazali veliko genetsko raznolikost HPV-53 (Kocjan in sod., 2007; Prado in sod., 2005), smo pričakovali tudi, da bomo v okviru vseh zajetih izolatov odkrili nekaj novih podtipskih različic HPV-53.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI VIRUSI PAPILOMA

Humani virusi papiloma (HPV) so zelo raznolika skupina DNA virusov, ki jih etiološko povezujemo z nastankom različnih benignih in malignih sprememb epitela kože in sluznic. Taksonomsko jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae* (de Villiers in sod., 2004).

2.1.1 Zgradba in organizacija genoma

HPV nimajo ovojnice in so veliki približno 55 nm. Virusni genom je obdan z dvoslojno kapsido z ikozaedrično simetrijo, ki jo sestavljata dva tipa strukturnih beljakovin, t.i. L1 ali velika (54 kDa), ter L2 ali mala (74-80 kDa) plaščna beljakovina.

Genom HPV predstavlja krožna in kovalentno zaprta dvojno vijačna DNA, velikosti 7500-8000 baznih parov (bp). Virusni genom je sestavljen iz regulatornih nekodirajočih in kodirajočih področij, pri čemer kodirajoče področje sestavljata zgodnje področje E (angl. *early*) in pozno področje L (angl. *late*). Področje E vsebuje zapise za virusne beljakovine povezane s prepisovanjem in podvojevanjem virusnega genoma (gena E1 in E2) ter transformacijo okuženih celic (geni E4, E5, E6 in E7), področje L pa vsebuje zapise za strukturne beljakovine virusne kapside (L1 in L2). Vsi geni znotraj virusnega genoma se prepisujejo v isti smeri. Nekodirajoče področje LCR (angl. long control region) ali URR (angl. upstream regulatory region) se nahaja med genoma L1 in E6 ter vsebuje zaporedja DNA, ki so pomembna za uravnavanje virusnega razmnoževanja in prepisovanja virusnih genov. Med genoma E5 in L2 najdemo še eno nekodirajoče področje, katerega vloga zaenkrat ni znana (McGlennen, 2000; zur Hausen, 1996; Bosch in sod., 2001).

2.1.2 Razmnoževanje HPV

HPV okužujejo bazalne celice večskladnega ploščatoceličnega epitela. Virusno razmnoževanje znotraj gostiteljskih celic je natančno uravnano in je odvisno od uravnalnih

virusnih beljakovin ter stopnje dozorelosti epitelijskih celic gostitelja. Tako je pri bazalnih epitelijskih celicah, ki niso dozorele, razmnoževanje virusa močno omejeno oziroma gre za latentno okužbo, pri kateri okuženih celic ni mogoče histološko ločiti od zdravih celic. Na tej stopnji virusnega razmnoževanja se genom HPV v gostiteljski celici ohranja v episomalni obliki, njegovo podvojevanje pa tesno sledi celičnemu ciklu gostiteljske celice – ob vsaki celični delitvi praviloma nastane le ena nova kopija virusnega genoma. Pomembno vlogo pri vzdrževanju HPV v episomalni obliki ima virusna beljakovina E1, ki deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo (Poljak in sod., 2005). E1 se veže na virusno DNA na mestu začetka podvojevanja (*ori*, *angl. origin of replication*) znotraj področja LCR. Na mesto *ori* se prav tako veže virusna beljakovina E2, ki v povezavi z virusno beljakovino E1 uravnava virusno replikacijo. Virusna beljakovina E2 ima še dodatno funkcijo pri uravnavi izražanja virusnih beljakovin E6 in E7. Pri nizkih koncentracijah E2 je prepisovanje zgodnjih virusnih genov (med katere sodita E6 in E7) omogočeno, pri višjih koncentracijah pa E2 z vezavo na mesto *ori* onemogoči prepisovanje genov E6 in E7, katerih produkta stimulirata bazalne epitelijske celice k hitrejšemu razmnoževanju. Tako E2 z svojo koncentracijo uravnava pomnoževanje okuženih celic.

Sposobnost razmnoževanja HPV v celici se povečuje sočasno z dozorevanjem okuženih celic. Ob začetku diferenciacije bazalnih celic se celični cikel ustavi, HPV pa svoje razmnoževanje nadaljuje na način kotalečega se kroga (*angl. rolling cycle replication*) pri čemer pride do nastanka velikega števila kopij virusnega genoma (Poljak in sod. 2005). V popolnoma dozorelih celicah pride pod vplivom celičnih dejavnikov prepisovanja do aktivacije prepisovanja genov L1 in L2 ter sinteze velike in male plaščne virusne beljakovine (de Villiers, 2001). Sestavljeni virioni se iz terminalno diferenciranih celic sproščajo s celično lizo in lahko okužijo sosednje celice. Kot posledica razmnoževanja HPV nastanejo v povrhnjih epitelnih celicah za HPV značilne morfološke spremembe, t.i. koilocitoza (zur Hausen, 1996; Smith in sod., 1998, Blachon in Demeret, 2003). Pomembno vlogo pri nastanku koilocitov pripisujejo virusni beljakovini E4, ki z vezavo na citokeratine povzroči porušenje celičnega citoskeleta in tako olajša zrelim virionom izstop iz okuženih gostiteljskih celic (Poljak in sod. 2005).

2.1.3 Patogeneza HPV

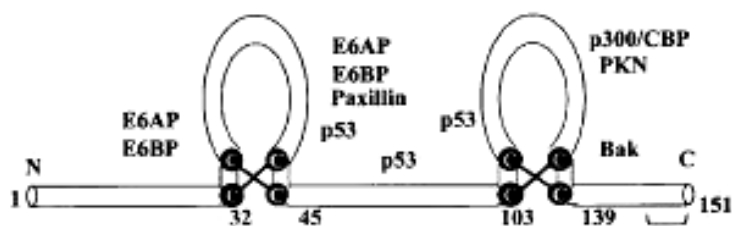
HPV se prenašajo s stiki in preko mikroskopskih ranic okužujejo bazalni sloj epitela kože in sluznic. Za okužbe s HPV je značilno, da so večinoma subklinične in same izzvenijo, redkeje pa lahko HPV povzročajo tudi dolgotrajnejše oz. perzistentne okužbe. Vzrok za dolgotrajne okužbe s HPV ni znan, verjetno pa je povezan z genetskim ozadjem gostitelja, različnimi zunanjimi vplivi (kajenje, imunosupresija) in biološkimi značilnostmi okužujočega HPV genotipa (Syrjänen K. in Syrjänen S., 2000).

V primeru relativno redke perzistentne okužbe s HPV lahko pride do vključitve oz. integracije DNA HPV v humani genom (zur Hausen, 1991). Nagnjenost k vključevanju v humani genom kaže predvsem skupina t.i. visoko rizičnih genotipov HPV, medtem ko je ta dogodek pri okužbi z nizko rizičnimi genotipi HPV izjemno redek. Pri vključevanju virusne DNA v genom bazalnih celic se virusni genom skoraj vedno prekine na področju gena za beljakovino E2, zaradi česar se preneha njeno izražanje. Ker je beljakovina E2 ključna za negativno uravnava izražanja genov E6 in E7, pride ob vključitvi HPV v genom tarčnih celic do povečanega in nereguliranega kopičenja beljakovin E6 in E7, kar v končni fazi lahko vodi v nenadzorovano proliferacijo celic in njihovo maligno transformacijo.

Do povečanega nereguliranega kopičenja beljakovin E6 in E7 lahko pride tudi v primeru, ko gen za beljakovino E2 ni prekinjen, in sicer takrat, ko je vezavno mesto za E2 znotraj regulatorne LCR regije metilirano. Beljakovina E2 s svojo vezavo na DNA v bližini genov E6 in E7 sterično ovira njuno prepisovanje – zaradi metilacije svojega vezavnega mesta se beljakovina E2 ne more vezati na DNA, posledično pa tudi ne ovira prepisovanja genov E6 in E7 (Bhattacharjee in Sengupta, 2006).

Virusni beljakovini E6 in E7 sta glavna virusna onkogeni in imata več funkcij. Glavno vlogo v mehanizmu onkogeneze HPV naj bi imelo njuno zaviranje normalnega delovanja obeh glavnih celičnih tumor zavirajočih beljakovin p53 in pRb.

Virusno beljakovino E6 visokorizičnega genotipa HPV-16 sestavlja 151 aminokislin, ki dvakrat tvorijo domene cinkovih prstov (*angl. zinc fingers*). Shematsko strukturo beljakovine E6 prikazuje slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz beljakovine E6 (Chakrabarti in Krishna, 2003).

Beljakovina E6 z vezavo na celično ubikvitinsko ligazo E6-AP pospešuje razgradnjo beljakovine p53, ki je ključna komponenta v kompleksnem sistemu preverjanja kvalitete celične DNA skozi celotni celični cikel. Ob poškodbi DNA zaradi kateregakoli dejavnika se količina p53 v celici poveča in začasno ustavi celični cikel, ki lahko steče po tem, ko se poškodbe DNA ustrezno popravijo (Poljak in sod., 2005). V primeru preobsežnih poškodb DNA p53 sproži programirano celično smrt oz. apoptozo. Že izredno majhne količine virusne beljakovine E6 bistveno zmanjšajo celični nivo p53, kar celicam omogoči nadaljevanje celičnega cikla in delitev kljub poškodbam DNA. Odsotnost p53 tako lahko privede do kopičenja nadaljnjih mutacij in s tem do maligne transformacije okuženih celic.

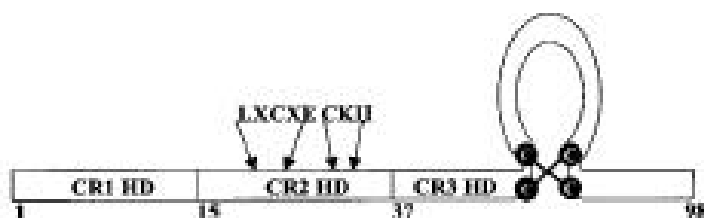
Beljakovina E6 se, poleg že omenjene vezave na E6-AP in p53, lahko veže na celo paletto različnih beljakovin, s čemer vpliva na povečano razmnoževanje epitelnih celic, formacijo benignih in malignih tumorjev, ustavitve apoptoze, porušitev medceličnih stikov itd. (Chakrabarti in Krishna, 2003). Beljakovina E6 lahko vpliva tudi na povečano izražanje oziroma transkripcijo genov. Tak primer sta gena, ki kodirata za podenote encima telomeraze (hTERT) in pa vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (*angl. vascular endothelial growth factor, VEGF*) in sta pomembna za nastanek in obstanek tumorjev.

V normalnih celicah se telomere ob vsaki celični delitvi skrajšajo – t.i. 'mitotska ura' –, celica pa po določeni življenjski dobi, ki je določena z dolžino telomer, odmre. Telomeraza, ki telomere podaljšuje, se v normalnih somatskih celicah ne izraža, nasprotno pa jo najdemo v več kot 90 % nesmrtnih in pa rakavih celic, kjer z vzdrževanjem dolžine telomer na koncih kromosomov ustavlja t.i. 'mitotsko uro'. Izražanje telomeraze zaradi vpliva beljakovine E6 tako povzroča nesmrtnost okuženih somatskih celic.

VEGF je eden najpomembnejših spodbujevalcev angiogeneze (procesa rasti krvožilnega sistema) – ustrezna prekrvavitev pa je ključna za rast tumorjev. E6 naj bi na povečano

izražanje VEGF vplival na več načinov, tako preko transkripcijskih faktorjev, ki direktno spodbujajo izražanje slednjega, kot tudi preko zaviranja normalne ubikvitinske razgradnje faktorja, ki spodbuja izražanje VEGF v stanju pomanjšane koncentracije kisika.

Virusno beljakovino E7 visokorizičnega genotipa HPV-16 sestavlja 98 amino kislin, delimo pa jo na tri področja oziroma domene; CR1, CR2 in CR3. Znotraj zadnje domene ima beljakovina E7, podobno kot beljakovina E6, motiv t.i. cinkovih prstov, s pomočjo katerih dimerizira v svojo aktivno obliko. Strukturo beljakovine E7 (Chakrabarti in Krishna, 2003) shematsko ponazarja slika 2.



Slika 2: Shematski prikaz beljakovine E7 (Chakrabarti in Krishna, 2003.)

V nasprotju z beljakovino E6, je učinek virusne beljakovine E7 odvisen od koncentracije v kateri je prisotna. E7 s svojo vezavo na celično tumor zavirajočo beljakovino pRb povzroči razgradnjo slednje po ubikvitinski poti. Beljakovina pRb uravnava celične dejavnike prepisovanja E2F, ki se v neokuženih celicah aktivirajo samo na prehodu iz G1 v S fazo celičnega cikla. V prisotnosti E7 zaradi razgradnje pRb pride do derepresije dejavnikov prepisovanja E2F, kar vodi v nekontrolirano nadaljevanje celičnega cikla (Poljak in sod., 2005).

Poleg že omenjene sposobnosti vezave pRb, lahko E7 veže še: druge beljakovine iz družine tumorskih supresorjev (npr. p107, p130); histonske deacetilaze; transkripcijske faktorje (npr. AP-1, TATA-box vezavne beljakovine...); cikline; od ciklinov odvisne kinaze (cdk); in inhibitorje cdk; skratka različne transkripcijske aktivatorje in/ali regulatorje, preko katerih lahko vpliva na pospešeno celično razmnoževanje in/ali diferenciacijo. E7 aktivira tudi nekatere celične encime (npr. M2-PK piruvatna kinaza, kislinska alfa glukozidaza itd.), ki omogočajo hitrejšo izrabo celičnih zalog glikogena, pospešujejo biosintezo in obenem zmanjšuje potrebo celice po kisiku, kar je značilno za tumorske celice (Chakrabarti in Krishna, 2003).

Poleg omenjenih funkcij naj bi beljakovini E6 in E7 visokorizičnega genotipa HPV-16 na še neraziskan način, s povzročanjem nastanka nenormalnega števila centrosomov in nepravilne formacije mitotskega vretena, dodatno vplivali na destabilizacijo genoma gostiteljske celice oziroma na nastanek aneuploidij, ki jih pogosto najdemo v maligno spremenjenih celicah (Duensing in sod., 2000). Tega učinka pri beljakovinah E6 in E7 nizkorizičnega genotipa HPV-6 niso potrdili.

Pri nekaterih genotipih HPV je prisotna tudi onkogeno beljakovina E5. Do sedaj najboljše proučena je beljakovina E5 genotipa HPV-16. Sestavljena je iz 83 amino kislin in med drugim zmanjšuje celično dovzetnost za apoptozo (Bravo in Alonso, 2004.), ovira celični transport MHC-I in MHC-II molekul (Marchetti in sod., 2002) – kar ovira predstavljanje antigenov na celični površini – in inducira celično transformacijo preko tirozin-kinaznih receptorjev nekaterih rastnih faktorjev (Poljak in sod., 2005).

2.1.4 Razvrščanje HPV

2.1.4.1 Genotipi in podtipske različice

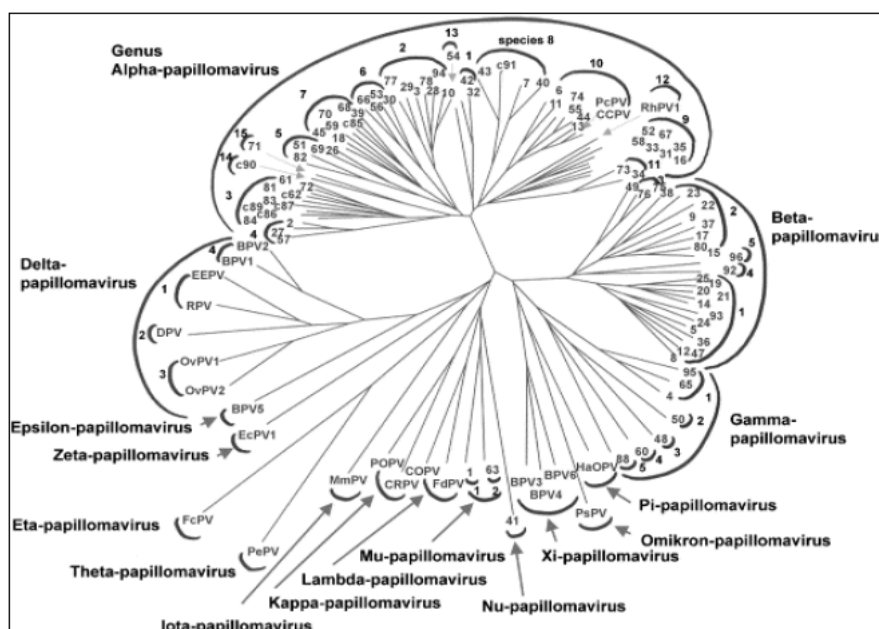
Na podlagi skladnosti nukleotidnih zaporedij evolucijsko močno ohranjenega virusnega gena L1, HPV delimo na virusne genotipe, ki so oštevilčeni glede na vrstni red osamitve in ne glede na biološke lastnosti virusov ali njihovo evolucijsko sorodnost. Različni genotipi HPV se v genu L1 razlikujejo $> 10 \%$, različice genotipov pa se od referenčnega genotipa HPV razlikujejo $< 2 \%$ nukleotidnega zaporedja L1. V redkih primerih, ko je neskladnost med dvema zaporedjema gena L1 med 2 in 10 %, novi virus opredelimo kot podtip nekega genotipa HPV (de Villiers in sod., 2004).

2.1.4.2 Razvrščanje genotipov HPV

Genotipe HPV in papiloma viruse (PV) živalskega izvora uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ki vsebuje 16 rodov, poimenovanih z grškimi črkami od alfa do pi (de

Villiers in sod., 2004). HPV uvrščamo - skupaj še z nekaterimi opičjimi PV - v pet rodov (alfa, beta, gama, mu in nu), medtem ko v ostale rodove uvrščamo različne druge živalske PV.

Različni rodovi PV so si med seboj podobni v manj kot 60 % nukleotidnega zaporedja gena L1. Vrste znotraj rodov so si medsebojno podobne v 60-70 % nukleotidnega zaporedja gena L1 (de Villiers in sod., 2004), genotipi znotraj vrst pa so si enaki v 71-89 % nukleotidne sekvence gena L1. Evolucijski odnosi med vsemi do sedaj uradno priznanimi PV so prikazani na sliki 3.



Slika 3: Filogenetsko drevo družine *Papillomaviridae* (de Villiers in sod., 2004).

V rod virusov papiloma alfa, ki ga sestavlja 15 virusnih vrst, uvrščamo genotipe HPV, ki okužijo predvsem neporoženevajoči večskladni ploščatocelični epitel sluznic. Zaradi tega jih pogosto opredeljujemo kot sluznične oziroma anogenitalne genotipe HPV.

Sluznične genotipe HPV glede na njihov onkogeni potencial delimo na visokorizične (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73, HPV-82), verjetno visokorizične (HPV-26, HPV-53, HPV-66), nizkorizične (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44,

HPV-54, HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81, candHPV-89) in genotipe z nejasnim onkogenim potencialom (de Villiers in sod., 2004; Munoz in sod., 2003.).

V vrsti 7 in 9 virusnega rodu papiloma alfa najdemo visokorizične genotipe HPV (npr. HPV-16 in HPV-18), ki jih povezujemo z nastankom cervikalne intraepitelijske neoplazije najvišje stopnje (CIN3) in RMV.

Glavni nizkorizični genotipi HPV (npr. HPV-6, HPV-11), ki jih povezujemo predvsem z razvojem benignih ploščatoceličnih tumorjev (npr. genitalne bradavice in papilomi grla), se uvrščajo v vrsto 10. V ostalih vrstah virusnega rodu papiloma alfa najdemo genotipe HPV, ki okužujejo epitel sluznic in na njih povzročajo različne spremembe. Izjemi v rodu virusov papiloma alfa sta vrsti 2 in 4, kamor uvrščamo genotipe HPV, ki okužijo predvsem poroženevajoči večskladni ploščatocelični epitel kože in povzročajo različne benigne spremembe (npr. navadne kožne bradavice, *verrucae vulgaris*) (de Villiers in sod., 2004).

Druge genotipe HPV s tropizmom za epitel kože uvrščamo v rodove virusa papiloma beta (5 vrst), gama (5 vrst), mu (2 vrsti) in nu (1 vrsta) in jih pogosto opredeljujemo kot kožne genotipe HPV.

Genotipi HPV, ki jih vključuje rod virusov papiloma beta, lahko povzročajo različne benigne in maligne spremembe kože, v rod pa spadajo tudi t.i. genotipi EV-HPV. Le-te povzročajo različne benigne in maligne spremembe kože pri bolnikih z dedno boleznijo *epidermodysplasia verruciformis* (EV) in pri imunokompromitiranih osebah (de Villiers in sod., 2004).

Genotipi iz virusnih rodov papiloma gama, mu in nu povzročajo različne, predvsem benigne spremembe kože (de Villiers in sod., 2004).

Vrstna razporeditev, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni povezane z genotipi HPV, uvrščenimi v rodove alfa, beta, gama, mu in nu so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Vrstna razporeditev HPV, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni povezane z genotipi HPV uvrščenimi v rodove PV alfa, beta, gama, mu in nu (povzeto iz De Villiers in sod., 2004).

Rod	Vrsta	Tipška vrsta	Genotip HPV	Vrstna patogeneza in tkivni tropizem
Humani virusi papiloma Alfa	1	HPV-32 (X74475)	HPV42 (M73236)	Nizko rizične spremembe na oralni in genitalni sluznici.
	2	HPV-10 (X74465)	HPV-3 (X74462) HPV-28 (U31783) HPV-29 (U31784) HPV-78 HPV-94 (AJ620211)	Benigne kožne in redkeje sluznične spremembe. Povzročitelji navadnih kožnih bradavic (<i>verrucae vulgaris</i>).
	3	HPV-61 (U31793)	HPV-72 (X94164) HPV-81 (AJ620209) HPV-83 (AF151983) HPV-84 (AF293960) candHPV 62 candHPV86 (AF349909) candHPV87 (AJ400628) candHPV89 (AF436128)	Nizko rizične spremembe anogenitalne sluznice.
	4	HPV-2 (X55964)	HPV-27 (X73373) HPV-57 (X55965)	Benigne kožne in redkeje sluznične spremembe. Povzročitelji navadnih kožnih bradavic (<i>verrucae vulgaris</i>).
	5	HPV-26 (X74472)	<u>HPV-51</u> (M62877) HPV-69 (AB027020) <u>HPV-82</u> (AB027021)	Visoko in nizko rizične spremembe anogenitalne sluznice
	6	HPV-53 (X74482)	HPV-30 (X74474) <u>HPV-56</u> (X74483) HPV-66 (U31794)	
	7	<u>HPV-18</u> (X05015)	<u>HPV-39</u> (M62849) <u>HPV-45</u> (X74479) <u>HPV-59</u> (X77858) <u>HPV-68</u> (X67161) HPV-70 (U21941) candHPV85 (AF131950)	Visoko rizične in maligne spremembe sluznice, RMV.
	8	HPV-7 (X74463)	HPV-40 (X74478) HPV-43 (AJ620205) candHPV-91 (AF131950)	Nizko rizične spremembe na sluznici in koži. Pogosto jih najdemo pri HIV bolnikih.
	9	<u>HPV-16</u> (K02718)	<u>HPV-31</u> (J04353) <u>HPV-33</u> (M12732) <u>HPV-35</u> (X74476) <u>HPV-52</u> (X74481) <u>HPV-58</u> (D90400) HPV-67 (D21208)	Visoko rizične in maligne spremembe sluznice, RMV.

Preglednica se nadaljuje.

Legenda: glavni genotipi, ki povzročajo RMV, so podčrtani.

Nadaljevanje preglednice 1: Vrstna razporeditev HPV, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni povezane z genotipi HPV uvrščenimi v rodove PV alfa, beta, gama, mu in nu (povzeto iz De Villiers in sod., 2004).

Rod	Vrsta	Tipška vrsta	Genotip HPV	Vrstna patogeneza in tkivni tropizem
Humani virusi papiloma Alfa	10	HPV-6 (X00203)	HPV-11 (M14119) HPV-13 (X62843) HPV-44 (U31788) HPV-74 (U40822) PcPV (X62844)	Nizko rizične spremembe na genitalni in oralni sluznici. Predstavniki te vrste so povzročitelji genitalnih bradavic (<i>condylomata acuminata</i>), in ploščatoceličnih papilomov grla.
	11	HPV-34 (X74476)	HPV-73 (X94165)	Visoko rizične spremembe sluznic, RMV.
	13	HPV-54 (U37488)	-	Nizko rizične spremembe sluznic.
	14	CandHPV-90 (AY057438)	-	
	15	HPV-71 (AB040456)	-	
Virusi papiloma Beta	1	HPV-5 (M17463)	HPV-8 (M12737) HPV-12 (X74466) HPV-14 (X74467) HPV-19 (X74470) HPV-20 (U31778) HPV-21 (U31779) HPV-25 (U74471) HPV-36 (U31785) HPV-47 (M32305) HPV-93 (AY382778)	Najpogosteje povzročajo kožne, redkeje sluznične spremembe. So povzročitelji EV (<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>) in kožnih sprememb pri bolnikih z imunosupresijo. Razširjeni so tudi pri imunokompetentnih osebah - večinoma povzročajo benigne, redko tudi maligne spremembe.
	2	HPV-9 (X74464)	HPV-15 (X74468) HPV-17 (X74469) HPV-22 (U31780) HPV-23 (U31781) HPV-37 (U31786) HPV-38 (U31787) HPV-80 (Y15176)	Benigne kožne spremembe.
	3	HPV-49 (X74480)	HPV-75 (Y15173) HPV-76 (Y15174)	
	4	HPVcand92 (AF531420)	-	Premaligne in maligne kožne spremembe.
	5	HPVcand96 (AY382779)	-	
	Virusi papiloma Gama	1	HPV-4 (X70827)	HPV-65 (X70829) HPV-95 (AJ620210)
2		HPV-48 (U31790)	-	
3		HPV-50 (U31790)	-	
4		HPV-60 (U31792)	-	
5		HPV-88	-	
Virusi papiloma Mu	1	HPV-1 (V01116)	-	
	2	HPV-63 (X70828)	-	
Virusi papiloma Nu	1	HPV-41 (X56147)	-	

Legenda: glavni genotipi, ki povzročajo RMV, so **podčrtani**.

2.1.5 RMV in HPV

Rak materničnega vratu je takoj za rakom dojke drugi najpogostejši rak pri ženskah in letno na novo prizadene okoli pol milijona žensk po svetu (Brooks in sod., 2004). Poleg dolgotrajne okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV, kar je osnovni dejavnik za nastanek RMV, so dodatni rizični dejavniki za nastanek RMV še: večje število spolnih partnerjev; nižja starost pri prvem spolnem odnosu; večje število porodov in splavov; okužbe z drugimi spolno prenosljivimi mikroorganizmi; kajenje in dodatne karcinogene snovi, kot so UV-žarki, obsevanje in različni kemični dejavniki (Syrjänen K. in Syrjänen S., 2000). Da je okužba s HPV nujen dejavnik za razvoj RMV potrjuje dejstvo, da DNA HPV najdemo pri več kot 99 % vseh primerov RMV (Bosch in sod., 1995, Walboomers in sod., 1995).

V meta-analizi (de Sanjose in sod., 2007) 78 raziskav med letoma 1995 in 2005, ki so ugotovljale genotipsko specifično prevalenco HPV pri ženskah z normalno citologijo MV, in ki so skupaj zajele 157.879 žensk, so ugotovili, da je svetovna prevalenca HPV pri ženskah z normalno citologijo MV 10,4 %. Na podlagi te ocene naj bi bilo s HPV okuženih kar 291 milijonov žensk po svetu, od teh pa naj bi jih bila skoraj tretina okuženih z enim ali pa obema visokorizičnima genotipoma HPV-16 in HPV-18.

Multicentrična raziskava, ki je vključevala 3607 primerov RMV iz 25 držav sveta (Munoz in sod., 2004), je pokazala, da je med petnajstimi visokorizičnimi genotipi HPV (Munoz in sod., 2003) v svetovnem merilu najpomembnejši visokorizični genotip HPV povezan z RMV genotip HPV-16, ki je bil dokazan v 54,4% vseh primerov RMV (Munoz in sod., 2004). Druga in tretja najpogostejša genotipa HPV povezana z RMV sta HPV-18 in HPV-45, ki sta bila dokazana v 11, 3 oz. 5, 2 % primerov RMV. Zastopanost ostalih visokorizičnih genotipov – glede na pogostost; HPV-31, HPV-52, HPV-33, HPV-58, HPV-35, HPV-56, HPV-59, HPV-39, HPV-51, HPV-73, HPV-68, HPV-82 – se je gibala med 3,8 in 0,07 %. Nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11 sta bila dokazana vsak v 0,07 %, medtem ko so bili verjetno visokorizični genotipi HPV-26, HPV-66 in HPV-53 dokazani v 0, 22, 0, 19 in 0,04 % vseh primerov RMV (Munoz in sod., 2004).

Najnovejša meta-analiza (Smith in sod., 2007) 115 raziskav, ki so med letoma 2002 in 2006 raziskovale porazdelitev genotipov HPV pri skupno 14.595 primerih invazivnega RMV in/oz. 7094 primerih visoko rizičnih sprememb MV iz različnih geografskih področij, je pokazala, da je tudi v svetovnem pogledu, najpomembnejši visokorizični genotip HPV povezan z RMV genotip HPV-16, sledi pa mu genotip HPV-18. Ta dva genotipa sta bila zastopana v 70 % primerov invazivnega RMV (HPV-16 v 55 % in HPV-18 v 15 %), naslednjih najpogostejših 6 genotipov (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-52 in HPV-58) pa je bilo odgovornih za skupaj 18 % invazivnega RMV.

Na podlagi epidemiološke zastopanosti različnih genotipov HPV pri ženskah z normalno citologijo MV, premalignimi spremembami MV in RMV je razvidno, da so določeni genotipi HPV značilno povezani z nastankom RMV in da predstavlja okužba z njimi dodatno tveganje za razvoj te maligne bolezni.

2.1.6 Podtipe različice in njihov patogenetski pomen

Čeprav so genotipi HPV značilno povezani z nastankom določenih bolezni, se slednje ne razvijejo pri vseh okuženih posameznikih, kar ostaja nepojasnjeno. Najverjetneje pri tem igrajo pomembno vlogo tako dejavniki gostitelja kot biološke značilnosti virusa. Ena od domnev, zakaj se bolezen razvije pri manjšini okuženih, je, da se genotipske različice in podtipi znotraj posameznega genotipa razlikujejo po svoji patogenosti. Zaenkrat je bilo največ tovrstnih raziskav narejenih pri genotipu HPV-16, ki je najpogosteje povezan z nastankom RMV (Hubert, 2005; Kämmer in sod., 2000).

Kljub temu, da so podtipe različice definirane na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju virusnega gena L1, se je pokazalo, da mutacije v področju gena L1 ne vplivajo bistveno na virusne antigenske lastnosti (Dillner in Brown, 2004), zato se veliko raziskav podtipskih različic genotipov HPV osredotoča na preiskovanje drugih področij genoma, npr. področja LCR ter obeh poglavitnih onkogenov, E6 in E7 (Bernard, 2005),

Molekularno epidemiološke raziskave so pokazale, da na razlike v patogenosti med podtipskimi različicami lahko v različni meri vplivajo tako kodirajoča kot tudi nekodirajoča področja genoma HPV (Bernard, 2005). Tako naj bi npr. pri genotipu HPV-16 razlike v regulatorni regiji LCR vplivale na povečano prepisovanje virusnih onkobeljakovin E6 in E7 (Hubert, 2005; Kämmer in sod., 2000). Ker imajo spremembe v regiji LCR lahko vpliv tudi na hitrost virusnega pomnoževanja je možno, da se določene LCR različice virusa razmnožujejo hitreje, kar neposredno poveča tveganje za okužbo in posledično za razvoj RMV (Hubert, 2005).

Manjšo vlogo pri tveganju za razvoj RMV naj bi pri HPV-16 imele tudi različice same onkobeljakovine E6. Zaradi spremenjene aminokislinske sestave bi lahko določene različice beljakovine E6 učinkoviteje posredovale razgradnjo p53 in tako posledično vplivale na hitrejši potek maligne transformacije. Podobno bi lahko veljalo tudi v primeru različic beljakovine E7 in razgradnje celične beljakovine pRb (Grassman in sod., 1996). Kako različna sestava beljakovin E6 in E7 vpliva na povečano razgradnjo p53 oz. pRb, je najbolj očitno iz primerjave aktivnosti obeh beljakovin pri visokorizičnih in nizkorizičnih genotipih HPV, npr. HPV-16 in HPV-6 (Grassmann in sod., 1996).

Pri visokorizičnih genotipih HPV-16 in HPV-18 so nekatere raziskovalne skupine postavile dodatno tezo, po kateri okužba z določenimi podtipskimi različicami predstavlja povečano tveganje za nastanek RMV pri ženskah s specifičnim naborom alelov PHK (Ellis in sod., 1995; Terry in sod., 1997; Maciag in sod., 2000; Zehbe in sod., 2003). Tako npr. pri genotipu HPV-16 povečano tveganje za razvoj RMV predstavlja okužba evropskih žensk z ne-evropskimi podtipskimi različicami HPV-16 (Tornesello in sod., 2004).

Pri nastanku RMV gre za kumulativen učinek različnih onkogenih dejavnikov. Raziskave so pokazale, da se RMV pogosteje razvije pri tistih okuženih posameznikah, ki imajo določene mutacije v genu za tumor zavirajočo beljakovino p53 (Tomassino in sod., 2003; Zehbe in sod., 2001). Tako je torej možno, da se pri ženskah, okuženih s visokorizičnimi genotipi HPV, spremembe materničnega vratu višje stopnje in RMV razvijejo le kot posledica specifičnega genetskega ozadja posameznice.

2.1.7 Diagnostika okužb s HPV

HPV zaradi bioloških posebnosti (virus se razmnožuje le v terminalno diferenciranih epiteljskih celicah) ni mogoče osamiti z metodo gojenja v celičnih kulturah. Ker tradicionalne virološke metode (svetlobna in elektronska mikroskopija, imunohistokemične metode) niso zadosti občutljive in ne omogočajo genotipizacije HPV, so se za diagnostiko okužb s HPV uveljavile le molekularne metode. Molekularne metode, ki temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusnih nukleinskih kislin, delimo na hibridizacijske metode in metode pomnoževanja virusnih nukleinskih kislin.

2.1.7.1 Hibridizacijske metode

Hibridizacija je proces samodejnega medsebojnega združevanja enoverižnih nukleinskih kislin, s komplementarno bazno sestavo, zaradi vodikovih vezi, ki se tvorijo med komplementarnimi nukleotidnimi bazami. Značilna zaporedja virusne DNA ali RNA lahko zaznamo na podlagi njihove hibridizacije s skupinsko ali tipsko specifično lovko, ki je označena z encimom ali fluorescenčnim barvilom, kar omogoča njeno zaznavo. Obstaja več tehničnih različic hibridizacije, med katerimi se za dokazovanje okužb s HPV najpogosteje uporabljajo testi, ki temeljijo na hibridizaciji po Southernu, hibridizaciji dot-blot, hibridizaciji *in situ* ter tekočinski hibridizaciji. Razen tekočinske hibridizacije so vse ostale metode preveč dolgotrajne in premalo občutljive za uporabo v rutinski diagnostiki.

Edina hibridizacijska metoda, ki je bila s strani FDA (*angl. Food and Drug Administration*) odobrena za uporabo v rutinski diagnostiki, je metoda Hybrid Capture II (hc2) (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA), ki temelji na tekočinski hibridizaciji. Hc2 vsebuje dva kompleta RNA lovka, ki prepoznajo 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68) oziroma 5 nizkorizičnih genotipov HPV (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43, HPV-44). Metoda ne omogoča določanja genotipa HPV. Nastale hibridizacijske komplekse lovka z odgovarjajočimi odsekom DNA HPV se pri tej metodi zaznava s pomočjo z encimom konjugiranih monoklonskih protiteles in kemiluminiscentnega substrata. Pomanjkljivost testa je, da zaradi navzkrižne reaktivnosti lovka z nekaterimi

genotipi HPV, ki niso vključeni v test, lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov (Poljak in sod., 2002).

2.1.7.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin

2.1.7.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo temelji na *in vitro* pomnoževanju značilnih odsekov virusnega genoma z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Oligonukleotidni začetniki so lahko genotipsko ali skupinsko značilni, kar pomeni, da so specifični bodisi za posamezen genotip HPV, bodisi za skupino genotipov HPV. Ker bi z uporabo tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov za izključitev prisotnosti HPV v nekem vzorcu bilo potrebno izvesti veliko število reakcij PCR, se v diagnostiki okužb z PCR uporabljajo predvsem metode, ki temeljijo na uporabi skupinsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov, saj le-ti omogočajo pomnoževanje večih genotipov HPV v eni sami reakciji PCR. Skupinsko značilni oligonukleotidni začetniki praviloma zajemajo področja močno ohranjenih virusnih genov ali predelov genoma. Tako se za dokazovanje sluzničnih genotipov HPV največkrat uporabljajo skupinsko značilni oligonukleotidni začetniki MY09/MY11 (PGMY09/PGMY11), GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450-, 150- oz. 65-bp dolg odsek močno ohranjenega virusnega gena L1 (de Roda in sod., 1995; Kleter in sod., 1998; Gravitt in sod., 2000; Coutlée in sod., 2002), in pa skupinsko značilni oligonukleotidni začetniki CPI/IIg, ki pomnožujejo 188-bp dolg odsek gena E1 (Tieben in sod., 1993).

Dokazovanje več različnih genotipov HPV v eni sami reakciji PCR lahko, namesto z uporabo skupinsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov, izvedemo z sočasno uporabo večih tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov (*angl. multiplex PCR*), specifičnih za različna področja genoma pri različnih genotipih HPV (Lei in sod., 2007). Nastale pridelke PCR lahko potem ločimo glede na njihove velikosti z elektroforezo v gelu. Pomanjkljivost te metode je relativna težavnost optimizacije pogojev reakcije PCR zaradi več parov oligonukleotidnih začetnikov.

2.1.7.2.2 Metode za dokazovanje oz. opredeljevanje pridelkov PCR

Dokazovanje specifičnih pridelkov reakcije PCR je možno na več načinov. Pridelke reakcije PCR lahko ločimo z navadno elektroforezo v gelu in njihove velikosti primerjamo z velikostjo molekularnega standarda. Specifičnost tovrstnega dokazovanja pridelkov PCR je majhna, zato se praviloma uporablja le za potrditev uspešno izvedene reakcije PCR pred genotipizacijo z drugimi metodami.

2.1.7.2.2.1 Določanje polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov, RFLP

Genotipe HPV lahko do neke mere opredelimo z metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (angl. *restriction fragment length polymorphism, RFLP*), ki temelji na restrikciji pridelkov PCR (npr. PCR s tipsko specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, PGMY09/PGMY11) in njihovi ločitvi na gelu, pri čemer ima vsak genotip svoj značilen profil velikosti restrikcijskih odsekov (Molijn in sod., 2005). Omejitev metode je, da lahko mutacije vplivajo na restrikcijska mesta in posledično spremenijo profil velikosti restrikcijskih odsekov, tudi znotraj enega genotipa.

2.1.7.2.2.2 Hibridizacijske metode dokazovanja pridelkov PCR

Za genotipizacijo HPV iz pridelkov PCR lahko uporabimo tudi hibridizacijske metode. Te metode so: encimsko-oligonukleotidni test, ki temelji na spektrofotometričnem določanju hibridizacije pridelkov PCR vezanih na mikrotitracijske ploščice z oligonukleotidnimi lovki, označenimi z encimom (npr. komercialno dostopen test AMPLICOR® Human Papillomavirus (HPV) test (Roche Diagnostics, Basel, Švica)); reverzni dot-blot, ki temelji na prenosu pridelkov PCR na najlonsko membrano in hibridizacijo z genotipsko značilnimi lovki; ter reverzni line-blot, ki temelji na istem principu kot reverzni dot-blot, le da so pri njem lovke nanešene v obliki jasno omejenih pasov. Prednost zadnje metode je, da lahko istočasno uporabimo več tipsko specifičnih lovki in na ta način dokažemo več genotipov HPV. Komercialno dostopna testa, ki temeljita na reverznem line-blotu, sta

INNO-LiPA (Innogenetics, Gent, Belgija) in Linear Array HPV Genotyping Test (Roche) (Molijn in sod., 2005).

2.1.7.2.2.3 Metoda direktnega določanja nukleotidnega zaporedja

Določanje nukleotidnega zaporedja je edini način s katerim lahko dokončno opredelimo genotip HPV, saj omogoča natančno analizo virusnih nukleotidnih zaporedij, odkrivanje mutacij in določanje podtipskih različic oz. opredeljevanje novih genotipov HPV. Metoda predstavlja zlati standard za genotipizacijo HPV, vendar pa je manj uporabna za opredelitev HPV takrat, ko je v nekem vzorcu prisotnih več genotipov HPV oziroma, kadar za reakcijo PCR uporabljamo tipsko značilne oligonukleotidne začetnike. Zaradi cene, časovne zamudnosti in tehnične zahtevnosti se metoda direktnega določanja nukleotidnega zaporedja večinoma uporablja le v raziskovalne namene.

2.1.7.2.3 Verižna reakcija z polimerazo v realnem času

Verižna reakcija z polimerazo v realnem času (*angl. real-time PCR, RT-PCR*) predstavlja nadgradnjo klasične PCR, pri kateri lahko, z uporabo fluorescenčno označenih oligonukleotidnih lovk, določamo specifičnost pomnoženih pridelkov PCR že med samim pomnoževanjem tarčne DNA. Zaradi cene izvedbe se RT-PCR pogosto izvede hkrati za več različnih genotipov HPV, t.i. multiplex RT-PCR.

Zaradi tehnoloških omejitev – večina do sedaj razpoložljivih sistemov lahko istočasno zaznava največ štiri tipe fluorescentnih označevalcev – in visoke cene kemikalij gre trenutni razvoj metode v več smeri. Ena od teh temelji na istočasnem dokazovanju nekaj klinično pomembnih genotipov HPV z uporabo lovk označenih z enim tipom fluorescentnega označevalca, s čemer lahko s štirimi neodvisnimi reakcijami RT-PCR in tremi tipi označenih lovk pokrijemo 8 genotipov HPV (Dve RT-PC reakciji kvantificirata genotipa HPV-16 oz. HPV-31, drugi dve pa genotipe HPV-18 in HPV-45 oz. genotipe HPV-33, HPV-52, HPV-58 in HPV-67. Pri tem imata zadnji dve RT-PCR reakciji enak fluorescentni označevalec.) (Broccolo in Cocuzza, 2007). Drug pristop predstavlja RT-

PCR s skupinsko značilnimi oligonukleotidnimi začetniki, pri katerem se pridelki RT-PCR visokorizičnih genotipov HPV zaznajo z enim tipom, pridelki za nizkorizične genotipe HPV pa z drugim tipom fluorescentno označene lovke (Takacs in sod, 2008). Tudi ta način ne omogoča ločevanja med genotipi. Tretji pristop omogoča ločevanje med genotipi in temelji na sočasni izvedbi ločenih reakcij RT-PCR za posamezne genotipe HPV z uporabo tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov (Lindh in sod, 2007), vendar ima praktične omejitve (veliko število reakcij, cena).

2.1.7.2.4 Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA

Poleg opisanih metod se za dokazovanje okužb s HPV uporabljajo tudi metode, ki temeljijo na dokazovanju virusne sporočilne RNA (angl. *messenger RNA*, *mRNA*). Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem virusne RNA (angl. *nucleic acid sequence based amplification*, *NASBA*), poteka v izotermalnih pogojih po naslednjem postopku. Prvi oligonukleotidni začetnik naleže na tarčno sporočilno RNA, ki jo reverzna transkriptaza prepíše v komplementarno DNA verigo. Nato RNAza H uniči RNA v RNA/DNA hibridni molekuli, na prepisano DNA pa se lahko veže drugi oligonukleotidni začetnik. Od njega naprej se s pomočjo T7 RNA polimeraze tvori nova RNA veriga, ki zopet vstopa v začetno stopnjo reakcije. Sistem zaznave pomnoževanja tarčne molekule temelji na hibridizaciji tačnega pomnoženega nukleotidnega zaporedja z oligonukleotidnim molekularnim označevalcem. Le-tega v osrednjem delu sestavlja zaporedje komplementarno tarčni DNA, na svojih koncih pa ima vezani fluoroformo in dušilsko molekulo (angl. *quencher*). V odsotnosti tarčne DNA je molekularni označevalec v taki obliki, da sta fluoroforma in dušilska molekula blizu skupaj, zaradi česar ne pride do fluorescence. V prisotnosti tarčne DNA, osrednji del molekularnega označevalca hibridizira s tarčno DNA, zaradi česar se njegova konca, z vezano fluoroformo in dušilsko molekulo, ločita, posledično pa pride do oddajanja fluorescence.

Edini tovrstni komercialno dostopen test je PreTect® HPV-Proofer Kit (NorChip, Klokkarstua, Norveška), ki omogoča opredelitev mRNA E6/E7 petih visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 in HPV-45) (Molijn in sod., 2005).

2.1.7.2.5 Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA

Z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA (*angl. Loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP*) (Notomi in sod., 2000) je nova izotermalna metoda pomnoževanja nukleinskih kislin z DNA polimerazo. LAMP omogoča specifično in hitro pomnoževanje tarčnih odsekov DNA, vendar pa je omejena na pomnoževanje DNA velikosti do 300-bp. Metoda temelji na uporabi štirih oligonukleotidnih začetnikov, ki v začetnih stopnjah reakcije omogočajo nastanek enoverižne zanke na koncih tarčne DNA molekule in sprotno razklapljanje dvojno verižne DNA med samim pomnoževanjem. To vodi v nastanek posebne, delno krožne predloge tarčne DNA, ki se vedno znova reciklira in proizvaja nove tovrstne molekule. Pridelki LAMP pomnoževanja so različno veliki in so sestavljeni iz večkratnih, z zankami povezanih ponovitev tarčnega zaporedja DNA, katerih specifičnost lahko potrdimo z izvedbo restrikcijske analize.

Metoda je bila razvita tudi za dokazovanje DNA HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18, vendar zaenkrat ni razširjena ali komercialno dostopna (Hagiwara in sod., 2007).

2.1.8 HPV-53

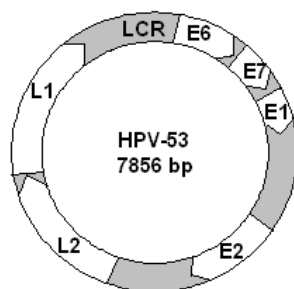
2.1.8.1 Odkritje in razvrščanje HPV-53

HPV-53 je bil odkrit leta 1989 (Gallahan in sod., 1989) v vzorcu brisa MV nosečnice brez vidnih citoloških oz. kliničnih sprememb. Avtorji so že takrat na podlagi hibridizacije po Southernu ugotovili, da gre za virus soroden genotipu HPV-30.

Celotni genom HPV-53 (dostopna koda v genskih bankah EMBL, DDBJ in NCBI: X74482) je bil opredeljen leta 1993 (Delius in Hofmann, 1994). HPV-53 ima za HPV značilno organizacijo genoma in kodira 6 različnih genov; L1, L2, E1, E2, E6 in E7. Zaenkrat ni znano da bi vseboval gena E4 in E5, ki jih najdemo pri nekaterih drugih genotipih HPV. Genom HPV-53 shematsko prikazuje slika 4.

HPV-53 na podlagi filogenetskih analiz uvrščamo v rod virusov papiloma alfa – vrsta 6, skupaj z genotipi HPV-30, HPV-56 in HPV-66 (de Villers in sod., 2004). Vsi genotipi te

vrste okužujejo večskladni ploščatocelični epitel sluznic, na podlagi česar jih opredeljujemo kot sluznične genotipe HPV (de Villers in sod., 2004). Na podlagi najnovejše epidemiološke razdelitve, HPV-53 uvrščamo med verjetno visokorizične genotipe HPV (Munoz in sod., 2003).



Slika 4: Organizacija genoma HPV-53

2.1.8.2 Prevalenca okužb s HPV-53

Najnovejša meta-analiza prevalence HPV (de Sanjose in sod., 2007), ki je zajemala skupaj več kot 150.000 žensk z normalno citologijo MV, je pokazala, da se HPV-53 v nekaterih področjih sveta uvršča med pet najpogostejših genotipov HPV (s prevalenco 3,1%, 1,5% oz. 1,1% v Vzhodni Afriki ter Srednji in Severni Ameriki).

Prevalenca HPV-53 je pri ženskah z nizko oz. visokorizičnimi spremembami MV in RMV nižja kot pri ženskah z normalno citologijo MV. Glede na meta-analizo Clifforda in sod. (2005) je bila prevalenca HPV-53 v 2,516 nizko rizičnih spremembah MV 10,1%, pri 3,053 primerih RMV pa je bila še nižja in je znašala 0,1%.

2.1.8.3 Podtipske različice HPV-53

Z dosedanjim poznavanjem patogeneze okužb s HPV-53 si za zdaj ne znamo razložiti, zakaj se RMV razvije le pri redkih ženskah okuženih s HPV-53. Ena od možnih razlag je, da so te okužene z značilno, domnevno bolj patogeno, podtipsko različico HPV-53. Ta domneva, kakor tudi ta, da gre pri HPV-53 za verjetno visokorizični genotip, zaenkrat ni potrjena.

Raznolikost podtipskih različic HPV-53 iz celega sveta sta zaenkrat raziskovali le dve raziskovalni skupini (Cerqueira in sod., 2003; Prado in sod., 2005). V Evropi so podtipsko raznolikost genotipa HPV-53 opredeljevali samo v Sloveniji (Kocjan in sod., 2007) in na Škotskem (Prado in sod., 2005). V raziskavi Cerqueira in sod., 2003, so na podlagi primerjave 450-bp predela gena L1 dveh izolatov HPV-53 iz Brazilije ugotovili, da poleg referenčnega zaporedja gena L1 izolata HPV-53 (X74482) obstajata še najmanj dve različici gena L1 HPV-53. V raziskavi Prado in sod. (2005), kjer so primerjali 43 izolatov HPV-53 iz sedmih etnično in geografsko ločenih področij z referenčnim izolatom HPV-53, se je pokazalo, da je genotip HPV-53 izrazito polimorfen. V raziskavi so opredelili 9 različic genomskega področja LCR, tri podtipe različice gena E6 in dve podtipski različici gena L1. Presenetljivo odkritje raziskave je bilo, da obstoječe različice LCR HPV-53 tvorijo dihonomno razvejano filogenetsko drevo (angl. *dichotomically branched phylogenetic tree*), značilno za nekatere genotipe HPV in njihove podtipe (Calleja-Macias in sod., 2005).

V raziskavi Kocjana in sod., 2007, v katero je bilo vključenih 94 izolatov, osamljenih pri 70 Slovenkah, so opredelili 11 novih različic genomskega področja LCR, 13 novih različic gena E6 in 4 nove različice gena E7. Na podlagi molekularno-filogenetskih analiz področja LCR slovenskih in vseh drugih do sedaj opredeljenih izolatov HPV-53, so potrdili dihonomno filogenijo HPV-53 in dodatno prvi dokazali, da po dihonomni razdelitvi obe filogenetski družini podtipskih različic LCR HPV-53 oblikujeta zvezdasto razporejene poddružine. Pri filogenetski analizi vseh do sedaj poznanih 26 genomskih različic HPV-53 (Kocjan in sod., 2007) se je pokazalo tudi, da je veliko izolatov kljub veliki geografski razdalji filogenetsko tesno povezanih, oziroma gre za iste različice. Obenem so bili v vseh geografskih regijah prisotni izolati tako prototipske kot neprototipske podtipe različice (oz. z obeh vej dihonomnega filogenetskega drevesa), kar potrjuje domnevo, da je HPV-53 zelo star genotip HPV in da je do dihonomne razdelitve genotipa HPV-53 mogoče prišlo že v prednikih današnjega človeka (Prado in sod., 2005). Domneva, da nekatere podtipe različice vplivajo na povečano tveganje za nastanek RMV, za zdaj ni bila potrjena v nobeni od navedenih raziskav.

2.1.9 Namen dela

Rak materničnega vratu (RMV) je v razvitem svetu, za rakom dojk, drugi najpogostejši rak pri ženskah in letno prizadene okoli pol milijona žensk po svetu (Brooks in sod., 2004). S številnimi raziskavami, ki so bile opravljene v zadnjem desetletju so nedvoumno dokazali, da je dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek RMV (Poljak in sod., 2005.). Med poglavitne povzročitelje RMV uvrščamo genotipa HPV-16 in HPV-18, ki sta bila dokazana v več kot 65 % vseh primerov RMV (Munoz in sod., 2004).

Verjetno visoko rizični genotip HPV-53 je etiološko najpogosteje povezan s predrakavimi spremembami MV nižje stopnje in le redko povzroča RMV. Ena od možnih razlag, zakaj se le pri redkih ženskah okuženih s HPV-53 razvije RMV, je, da so okužene z značilno, domnevno bolj patogeno, podtipsko različico HPV-53.

Po dosegljivih podatkih iz literature sta podtipsko raznolikost izolatov HPV-53, osamljenih na različnih predelih sveta, opredeljevali le dve raziskovalni skupini (Cerqueira in sod., 2003; Prado in sod., 2005). V Evropi so podtipsko raznolikost HPV-53 opredeljevali samo v Sloveniji (Kocjan in sod., 2007) in na Škotskem (Prado in sod., 2005). Omenjene raziskave so do sedaj opredelile 26 genomskih različic genotipa HPV-53, ki tvorijo dihotojno razvejano filogenetsko drevo.

Prvi cilj diplomske naloge je bila opredelitev podtipskih različic HPV-53 iz Belgije, in sicer z molekularno analizo treh področij virusnega genoma. Drugi cilj naloge je bila izvedba molekularno-filogenetskih analiz in uvrstitev belgijskih različic HPV-53 v obstoječe filogenetske skupine (Prado in sod., 2005., Kocjan in sod., 2007). Po dosegljivih podatkih iz literature gre za prvo molekularno oz. filogenetsko opredelitev podtipskih različic HPV-53 iz Belgije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

V raziskavo smo vključili 21 HPV-53 DNA pozitivnih vzorcev brisov materničnega vratu (MV), ki so bili odvzeti pri istemu številu belgijskih žensk z različnimi stopnjami predrakavih sprememb MV. Vsi HPV-53 DNA pozitivni vzorci so bili zaznani v laboratoriju za molekularno virologijo, Pasteurjev inštitut, Bruselj, Belgija, z uporabo komercialno dostopnega testa za dokazovanje okužb s HPV INNO-LiPa Genotyping (Innogenetics). V naš laboratorij smo za vsak vzorec prejeli približno 10-20 % izhodiščnega materiala, in sicer celice, resuspendirane v 1-2 ml fiksacijske raztopine Easyfix solution (Labonord, Templemars, France). Vzorci so bili poslani po navadni pošti, pri sobni temperaturi in so potovali tri tedne.

3.2 METODE

3.2.1 Osamitev DNA

Pred začetkom osamitve celične DNA smo dobljene vzorce najprej centrifugirali 15 min pri 3000 rpm (število obratov na minuto). Po odstranitvi supernatanta, smo nastali pelet resuspendirali v 200 µl fosfatnega pufru (PBS) in ga prenesli v 1,5 ml epice. DNA smo nato osamili po navodilih proizvajalca – po protokolu za osamitev nukleinskih kislin iz telesnih tekočin – s pomočjo diagnostičnega kompleta QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Po tem protokolu smo v 1,5 ml epice z resuspendiranimi celicami dodali 20 µl proteinaze K in 200 µl pufru AL. Nastalo mešanico smo vorteksirali 15 s in jo nato inkubirali 10 minut pri 56 °C. Po inkubaciji smo epice na kratko centrifugirali in jim dodali 200 µl 100 % etanola. Mešanico smo ponovno vorteksirali 15 s, jo na kratko centrifugirali ter jo nato pazljivo prenesli na kolono s silikatno membrano (QIAamp Spin Column), vloženo v 2 ml zbiralno epico. Sledilo je eno minutno centrifugiranje kolone pri 8000 rpm. V nadaljevanju smo kolono premestili v novo zbiralno epico, dodali 500 µl pufru AW1 in centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. Kolono smo nato premestili v novo zbiralno epico, dodali 500 µl pufru AW2 in epico z vloženo kolono centrifugirali 3 minute pri 14000 rpm.

V zadnji fazi smo kolono premestili v 1,5 ml epico, dodali 100 µl pufru AE in vzorec inkubirali 1 min pri sobni temperaturi. Celokupno DNA smo iz membrane kolone izločili z eno minutnim centrifugiranjem pri 8000 rpm in jo shranili pri -20 °C.

Osamljeni DNA smo nato določili koncentracijo v ng/µl tako, da smo 5 µl izolirane DNA redčili z vodo do 50 µl končnega volumna in ji izmerili optično gostoto (angl. *optical density*, *O.D.*) pri valovni dolžini 260 nm. Pri tem smo upoštevali redčitveni koeficient in podatek, da 1 O.D. ds DNA pri 260 nm ustreza koncentraciji 50 ng/µl ds DNA. Vse meritve smo izvedli na aparaturi BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

3.2.2 Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnosti zaviralcev PCR.

Kakovost osamljene DNA in odsotnost zaviralcev PCR smo preverili s PCR v realnem času (RT-PCR) z oligonukleotidnima začetnikoma KM29 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3') in RS42 (5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3') ki omogočata pomnoževanje 536 bp velikega dela gena za humani beta-globin. Pomnoževanje DNA smo izvedli na računalniško vodenem sistemu LightCycler Instrument tip 1.5 (Roche), ki omogoča zaznavanje pridelkov PCR v realnem času.

Za pomnoževanje humane DNA smo uporabili mešanico kemikalij iz kompleta LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 2,5 µl pufru RT-PCR (LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I); 3 mM MgCl₂; 6, 25 pmol oligonukleotidnih začetnikov RS42 in KM29; do 100 ng DNA in vodo do 25 µl končnega reakcijskega volumna.

Pomnoževanje gena za beta-globin smo izvedli s 45 – kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla RT-PCR, sestavljenega iz treh inkubacij; 15s pri 95 °C, 4s pri 69 °C in 10 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 10 minut pri 95 °C, kar je zagotovilo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo encima FastStart Taq DNA polimeraze.

Specifičnost pridelkov PCR smo določili z analizo talilne krivulje (angl. *melting curve analysis*), ki smo jo izvedli z enkratnim temperaturnim ciklom RT-PCR, sestavljenim iz štirih inkubacij; 0 s pri 95 °C, 30 s pri 72 °C, 0 s pri 95 °C in 30 s pri 40 °C. Kot beta-globin pozitivne smo opredelili vzorce pridelkov RT-PCR z vrednostmi talilne temperature (T_m , angl. *melting temperature*) 88-89 °C oziroma enakimi, kot je T_m pozitivne kontrole RT-PCR.

3.2.3 Dokazovanje DNA HPV-53 z uporabo tipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov

Prisotnost DNA HPV-53 smo v vzorcih brisov MV dokazovali s PCR z uporabo genotipsko značilnih oligonukleotidnih začetnikov 53-99S (5'-AAATACAGAAGAGCGACCAC-3') in 53-182R (5'-AGAACACACAGCCAAGTTGC-3'), ki pomnožujeta 88-bp velik del gena E6 HPV-53. Za pomnoževanje virusne DNA smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta Amplitaq® Gold with GeneAmp® (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) in mešanico nukleotidov iz kompleta PCR Nucleotid Mix (Roche Diagnostics). Pri sestavi končnih reakcijskih mešanic reakcije PCR smo upoštevali navodila proizvajalca.

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala po 7,5 pmol oligonukleotidnih začetnikov 53-99S in 53-182R; 200 μ M dATP, dTTP, dGTP in dCTP; 2,5 μ l pufru PCR (10x Gold Buffer), 1,5 mM MgCl₂; 0,625 U encima AmpliTaq Gold DNA Polymerase; do 100ng tarčne DNA in vodo do 25 μ l končnega reakcijskega volumna.

Pomnoževanje DNA HPV-53 smo izvedli na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System tip 9700 (Applied Biosystems) s 40 – kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 94 °C, 30 s pri 56 °C in 30 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 9 minut pri 95 °C. Po 40 ciklih PCR je sledila zaključna stopnja podaljševanja pridelkov PCR 10 minut pri 72 °C. Reakcijo PCR smo ustavili z znižanjem temperature na 4 °C.

3.2.4 Pomnoževanje genomskih področij HPV-53

Genetsko raznolikost izolatov HPV-53 smo ugotavljali z molekularno analizo 3' predela nekodirajočega genomskega področja LCR (605-bp) ter genov E6 (465-bp) in E7 (318-bp). Izbrana področja genoma HPV-53 smo pomnožili s PCR z uporabo oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih v raziskavi Kocjana in sod. (2007). Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, tarčno področje pomnoževanja in velikosti pričakovanih pridelkov PCR prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, tarčni geni in velikost pričakovanih pridelkov PCR za HPV-53.

Genomsko področje	Približna velikost pridelka PCR	Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnega začetnika
LCR	679-bp	53f2 53r2	5'-TGTGTGTATTTGTTGTCTGTGTTGT-3' 5'-CTATTTTCGGTTACTCCCTGTC-3'
E6	612-bp	E6-25F E6-636R1	5'-GACAGGGAGTAACCGAAATAGG-3' 5'-CAGGTCAATCTCAGTTTGTGGT-3'
E7	492-bp	L1A-530 R1A-1022	5'-CTGGAGACACACAACAGCAAC-3' 5'-TCAGATTCGGTGCTTTCTC-3'

Za pomnoževanje DNA HPV-53 z različnimi kompleti oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 2) smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics), ki vsebuje DNA polimerazo s 3'-5' eksonukleazno aktivnostjo, in mešanico nukleotidov iz kompleta PCR Nucleotid Mix (Roche Diagnostics). Za preprečevanje nastanka sekundarnih struktur smo v reakcijsko mešanico PCR za pomnoževanje gena E7 dodali dimetil sulfoksid (DMSO). V posamezno reakcijsko mešanico smo dodajali do 5 µl vzorca, odvisno od izmerjene koncentracije DNA. Optimalni vnos DNA na 25 µl končnega reakcijskega volumna je bil 100 ng za vse različice PCR. Pomnoževanje virusne DNA smo izvedli na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System tip 2400 oz. 9700 (Applied Biosystems).

3.2.4.1 Pomnoževanje genomskega področja LCR

Za pomnoževanje 3' predela nekodirajočega genomskega področja LCR smo uporabili oligonukleotidna začetnika 53f2 in 53r2 (Preglednica 2). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala po 10 pmol vsakega oligonukleotidnega začetnika; 200 μ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 μ l pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂); 1, 25 U encima FastStart High Fidelity Enzyme Blend; tarčno DNA in vodo do 25 μ l končnega reakcijskega volumna.

Pomnoževanje genomskega področja LCR HPV-53 smo izvedli s 40 – kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 95 °C, 30 s pri 53 °C in 70 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 2 minuti pri 95 °C. Po 40 ciklih PCR je sledila zaključna stopnja podaljševanja pridelkov PCR 7 minut pri 72 °C. Reakcijo PCR smo ustavili z znižanjem temperature na 4 °C.

3.2.4.2 Pomnoževanje gena E6

Za pomnoževanje celotnega gena E6 smo uporabili oligonukleotidna začetnika E6-25F in E6-636R1 (Preglednica 2). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 10 pmol vsakega nukleotidnega začetnika; 200 μ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 μ l pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂); 1, 25 U encima FastStart High Fidelity Enzyme Blend; tarčno DNA in vodo do 25 μ l končnega reakcijskega volumna.

Pomnoževanje gena E6 smo izvedli z 40 - kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 95 °C, 30 s pri 57 °C in 60 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 2 minuti pri 95 °C. Po 40 ciklih PCR je sledila zaključna stopnja podaljševanja pridelkov PCR 7 minut pri 72 °C. Reakcijo PCR smo ustavili z znižanjem temperature na 4 °C.

3.2.4.3 Pomnoževanje gena E7

Za pomnoževanje gena E7 smo uporabili oligonukleotidna začetnika L1A-530 in R1A-1022 (Preglednica 2). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 10 pmol vsakega nukleotidnega začetnika; 200 μ M nmol dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 5 μ l pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂); 1, 25 U encima FastStart High Fidelity Enzyme Blend; 0,5 μ l DMSO, tarčno DNA in vodo do 25 μ l končnega reakcijskega volumna.

Pomnoževanje gena E7 smo izvedli z 40 – kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 95 °C, 30 s pri 55 °C in 60 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 2 minuti pri 95 °C. Po 40 ciklih PCR je sledila zaključna stopnja podaljševanja pridelkov PCR 7 minut pri 72 °C. Reakcijo PCR smo ustavili z znižanjem temperature na 4 °C.

3.2.5 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR

Pridelke PCR smo dokazovali z elektroforezo v gelu. Pri tem smo uporabili že pripravljene gele za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific, Cham, Švica). Geli so sestavljeni iz 1% agaroze, prečno zamrežene s polimerom BG (1,4-butanedioldiglycidylether) in omogočajo optimalno zaznavanje delcev DNA velikosti med 100 in 4000-bp.

Gele smo za uporabo pripravili tako, da smo jih vstavili v elektroforezno banjico aparature SEA 2000® (Elchrom Scientific) in jih prelili z elektroforeznim pufrom pripravljenim iz 1950 ml dvojno deionizirane vode, 50 ml 40 x pufra TAE (Elchrom Scientific) in 100 μ l etidijevega bromida (10mg/ml) (Innogenetics).

V prvo luknjico smo vsakič nanesti molekularni označevalec 100-bp lestvico (Roche), ki vsebuje delce velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, ..., 1500-bp in dodatni 2642-bp velik delec DNA. V ostale luknjice smo nanesti mešanico, ki smo jo pripravili iz 6 μ l pridelka PCR in 1,6 μ l nanašalnega pufra – Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 20 minut, z napetostjo med elektrodama 120 V in samodejno vključitvijo črpalke za kroženje pufra in hlajenje gela 1,5 minute po začetku elektroforeze.

Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV-svetlobo in ga fotografirali z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel). Specifičnost naših pridelkov PCR smo določali s primerjavo njihove velikosti glede na velikost pozitivne kontrole in velikost delcev molekularnega označevalca.

Po vsaki uporabi smo gele očistili pridelkov PCR tako, da smo na njih izvedli elektroforezo v obratni smeri (45 minut) in čistost gela preverili pod UV-svetlobo.

3.2.6 Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja in določanje podtipskih različic HPV-53

Za opredeljevanje podtipskih različic HPV-53 smo uporabili metodo neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR, značilnih za posamezno genomsko področje HPV-53 (Preglednica 2), in primerjavo dobljenih zaporedij z nukleotidnimi zaporedji referenčnega izolata HPV-53.

3.2.6.1 Čiščenje in določanje koncentracije pridelkov PCR

Pridelke PCR, ki so ustrezali pričakovanim velikostim, smo očistili polimeraze, nukleotidov, začetnih oligonukleotidov in ionov reakcije PCR s komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR – QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

Čiščenje pridelkov PCR smo izvedli tako, da smo eni volumski enoti pridelka PCR (19 μ l) dodali pet volumskih enot pufra PBI in dobro premešali. Nastalo mešanico smo prenesli v mikrokolono s silikatno membrano, vloženo v 2 ml zbiralno epico in centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm. Za centrifugiranje smo uporabljali centrifugo Rotanta 460 (Hettich AG, Bäch, Švica). Po centrifugiranju smo izpirek in zbiralno epico zavrgli, mikrokolono pa

prestavili v novo zbiralno epico. Dodali smo 750 μ l pufru PE in zopet centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm. Izpirek smo znova zavrgli in mikrokolono prestavili v novo zbiralno epico ter ponovili centrifugiranje 2 minuti pri 13000 rpm. V nadaljevanju smo mikrokolono prenesli v 1,5 ml epico, dodali 30-50 μ l (30 μ l za šibkejše in 50 μ l za močnejše pridelke PCR) elucijskega pufru EB in vzorec inkubirali eno minuto pri sobni temperaturi. Pridelke PCR smo iz membrane kolone izločili z 2 minutnim centrifugiranjem pri 13000 rpm in jih do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določali na 1,7% agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku iz 0,8 g agaroze v prahu – A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA), ki smo ji dodali 50 ml 1x pufru TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH = 8,3). Rastopino agaroze smo dobro premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Še vroči smo dodali 5 μ l etidijevega bromida (10mg/ml) (Innogenetics) in jo ohladili v kalupu z elektroforeznimi glavnički. Strjeni gel smo položili v elektroforezno banjico HE 33 Mini Submarine Unit (Hofer, San Francisco, ZDA) in ga prelili z 1x pufrom TAE, ohlajenim na 4 °C. V prvo vdolbinico na gelu smo nanesti 10 μ l molekularnega označevalca MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Vilnius, Litva), ki vsebuje 11 delcev DNA velikosti od 80-1031-bp v koncentracijah 0.8, 1, 2, 3, 4, 10, 6, 7, 8, 9 in 10 ng/ μ l. V ostale vdolbinice na gelu smo nanesti mešanice, pripravljene iz 5 μ l očiščenega pridelka PCR, 5 μ l dH₂O in 2 μ l nanašalnega pufru - 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 30 minut in napetosti med elektrodama 120V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV-svetlobo in ga fotografirali z digitalnim sistemom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems). DNA koncentracijo smo očiščenim pridelkom PCR določili s pomočjo primerjave njihove intenzitete fluorescence pod UV svetlobo, z intenziteto fluorescence različnih fragmentov z znano koncentracijo DNA v molekularnem označevalcu.

3.2.6.2 Izvedba sekvenčne reakcije

Očiščene pridelke PCR smo sekvenirali s komercialno dostopnim kompletom Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) z oligonukleotidnimi začetniki uporabljenimi v reakcijah PCR (Preglednica 2).

Za določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR, značilnih za gensko področje LCR HPV-53, smo, poleg 53f2 in 53r2, uporabili še dva dodatna (notranja) oligonukleotidna začetnika: 53s7645R (5'-AGTTGGCAGCCTACAGTAAGTG-3') in 53s7583 (5'-CATAGTGCCGTTTCCTGTGT-3'). Optimalna količina DNA za izvedbo sekvenčne reakcije je bila 3 ng – za pridelke PCR velikosti med 200 in 500-bp – oz. 5 ng - za pridelke PCR velikosti med 500 in 1000 bp.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili 1,476 pmol posameznega oligonukleotidnega začetnika; 0,5µl reakcijske mešanice - Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing-Kit -; 2µl pufru za sekveniranje - BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer 5X -; ustrezno količino (3 oz. 5 ng) očiščenega pridelka PCR in ddH₂O do 10µl končnega reakcijskega volumna.

Sekvenčno reakcijo s posameznim oligonukleotidnim začetnikom smo izvedli po predhodno opisanem postopku (Platt in sod., 2007), in sicer s 15-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz dveh inkubacij 10 s pri 96 °C in 75 s pri 60 °C; s 5-kratnim ponavljanjem dvostopenjskega temperaturnega cikla 10 s pri 96 °C in 90 s pri 60 °C; in s 5-kratnim ponavljanjem dvostopenjskega temperaturnega cikla 10 s pri 96 °C in 2 min pri 60 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 1 minuto pri 96 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 8 °C. Pri vseh treh temperaturnih ciklih smo – za razliko od predhodno opisanega protokola (Platt in sod., 2007) – izpustili inkubacijo naleganja oligonukleotidnih začetnikov pri 5s 50 °C, saj je izračunani T_m oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih v raziskavi presejala vrednost 60 °C izračunano po formuli $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

3.2.6.3 Čiščenje sekvenčne reakcije z natrijevim acetatom in etanolom

Pridelkom sekvenčne reakcije smo pred vnosom v avtomatski sistem za določanje nukleotidnega zaporedja odstranili ne vgrajene dideoksinukleotide s pomočjo natrijevega acetata in etanola.

Po tem protokolu se čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije izvaja v 1,5 ml epicah. Pred pričetkom čiščenja smo nastavili termo blok na 95 °C in si pripravili sveže mešanice kemikalij, potrebnih za čiščenje. Za prvo stopnjo čiščenja smo v ustrezni količini pripravili raztopino 3.0 M natrijevega acetata (pH = 4,6) in 100 % etanola v razmerju 1 : 25. Za vsak vzorec smo potrebovali 26 µl raztopine, ki smo jo dodali 10 µl sekvenčne reakcije. Nato smo nastalo mešanico prenesli v 1,5 epice, ki smo jih na eni strani označili. Epice smo vorteksirali 3-5 s, ter jih nato vstavili v centrifugo z označeno stranjo navzven. Med centrifugiranjem so se na označeni strani epice nabrali oborjeni pridelki sekvenčne reakcije). Epice smo centrifugirali pri 30 minut 14000 rpm. Po centrifugiranju smo pazljivo odstranili supernatant in v epice takoj dodali 250 µl ledenega 70 % etanola. Epice smo vorteksirali 3-5 s, jih ponovno vstavili v centrifugo z označeno stranjo navzven ter centrifugirali 5 minut pri 14000 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili ves supernatant in pelet sušili v termo bloku točno 2 minuti pri 95 °C.

Osušenim in očiščenim pridelkom sekvenčne reakcije smo dodali 30 µl denaturacijske raztopine Hi-DiTM Formamide (Applied BioSystems) in jih dobro pretresli na vorteksu (vsaj 15 sekund). Po vorteksiranju smo epice centrifugirali 10 s, ter jih prenesli v 0,2 ml reakcijske posodice za PCR. Sledila je denaturacija pridelkov sekvenčne reakcije PCR v aparaturi PCR – GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)- 2 minuti pri 95 °C. Po denaturaciji smo reakcijske posodice vstavili v hladni blok (-20 °C) za najmanj 10 minut.

Sekvenčna analiza je bila izvedena na aparaturi za avtomatsko sekveniranje ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Aparatura po končanem delu zabeležene podatke o določenem nukleotidnem zaporedju prenese v računalniški program ABI PRISMTM Sequencing Analysis v. 3.7 (Applied Biosystems), ki slednje poda v obliki elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

3.2.6.4 Analiza nukleotidnih zaporedij in opredelitev podtipskih različic LCR, E6 in E7 HPV-53

Nukleotidna zaporedja iz elektroferogramov smo analizirali in obdelali z uporabo paketa računalniških programov Vector NTI Advance v.10.1.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Končno – konsenzno – zaporedje izbranega pridelka PCR smo sestavili tako, da smo uskladili njegovi komplementarni zaporedji.

Primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij belgijskih izolatov HPV-53 z nukleotidnimi zaporedji referenčnega izolata HPV-53 (X74482) in določanje značilnih mutacij v posameznih genomskih področjih smo izvedli z uporabo programskega paketa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. (6/27/07) (North Carolina State University, ZDA) (Hall, 1999).

Kot novo različico HPV-53 smo opredelili vsak izolat HPV-53, ki se je od referenčnega izolata HPV-53 razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo, oz. nukleotidni vstavek/izpad v izbranem genomskem področju (LCR, E6 in E7). Ko smo opredelili podtipske različice za posamezno genomsko področje, smo za vsak izolat HPV-53 opredelili še genomsko različico, ki jo predstavlja skupek mutacij, zabeleženih v posameznih genomskih področjih.

3.2.7 Filogenetske analize

Za ugotavljanje evlucijskih povezav med belgijskimi izolati HPV-53, referenčnim izolatom HPV-53 in preostalimi do sedaj opredeljenimi izolati HPV-53 iz drugih predelov sveta (Kocjan in sod. 2007, Prado in sod. 2005), smo uporabili 3' predel nekodirajočega področja LCR HPV-53. Pred izvedbo filogenetskih analiz smo iz poravnanih nukleotidnih zaporedij LCR odstranili dva (1-bp (T), 4-bp (TGGG)) nukleotidna vstavka, kar ni bistveno vplivalo na topologijo filogenetskih dreves.

Poravnavo nukleotidnih zaporedij smo izvedli z uporabo računalniškega programa ClustalW Multiple Alignment (Thompson in sod., 1994), ki je dostopen v okviru

programskega paketa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. (North Carolina State University). Za ugotavljanje evolucijskih povezav in izdelavo filogenetskih dreves smo uporabili prosto dostopen programski paket Phylip v3.6.

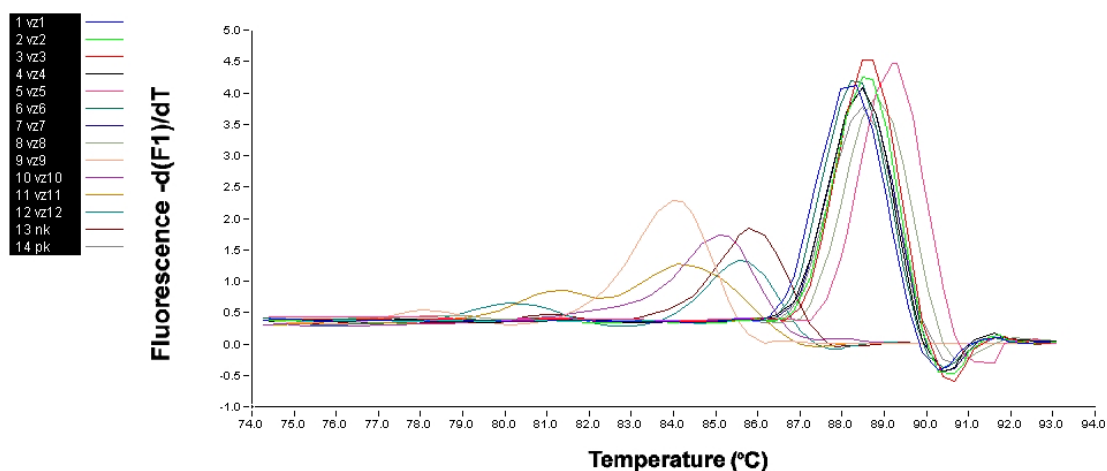
Filogenetske analize smo izvedli z metodo neponderirane aritmetične sredine (angl. *unweighted-pair group method with arithmetic average, UPGMA*) in metodo najbližjega sosedu (angl. *neighbour joining, NJ*), z uporabo Kimurinega dvoparametričnega modela računanja hitrosti nukleotidnih zamenjav (delež tranzicij/transverzij = 2). Statistično moč in zanesljivost postavljenih vej drevesa izdelanega z metodo NJ smo preverili z analizo 1000 - kratnih ponovitev izrisa drevesa (angl. *bootstrapping*), ki ga omogoča programski paket Phylip v3.6. Izdelana drevesa smo si ogledali s programom Treeview 1.61. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)

4 REZULTATI

4.1 PREVERJANJE KVALITETE DNA IN DOKAZOVANJE HPV-53

Po osamitvi in določitvi koncentracije DNA v vzorcih brisov MV smo najprej izvedli notranje kontrole pomnoževanja. Značilen 536-bp dolg predel gena za humani beta-globin nam je uspelo pomnožiti v 16 od 21 (76%) vzorcev, medtem ko je bilo pri petih (23%) vzorcih notranje kontrolno pomnoževanje neuspešno. Raziskavo smo nato nadaljevali na 16 vzorcih.

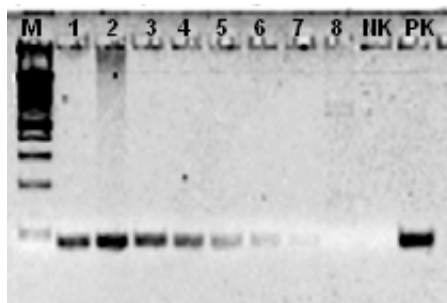
Rezultati pomnoževanja 536-bp predela za humani beta-globin v 21 vzorcih brisov MV in njihove pripadajoče koncentracije DNA so podani v preglednici 3. Primeri notranjega kontrolnega pomnoževanja z uporabo oligonukleotidnih začetnikov KM29/RS42 so prikazani na sliki 5.



Slika 5: Primeri pomnoževanja 536-bp dolgega predela humanega gena za beta-globin z začetnimi oligonukleotidi KM29/RS42. Mesta 1-8: rezultati uspešnega pomnoževanja za vzorce št. 1-8; mesta 9-12 : rezultati neuspešnega pomnoževanja za vzorce št.9 – 12; mesto 13: negativna kontrola; mesto 14: pozitivna kontrola.

Z oligonukleotidnima začetnikoma 53-99S in 53-182R, ki pomnožujeta 88-bp velik predel gena E6 smo DNA HPV-53 uspeli dokazati v 14 od 16 (87,5%) vzorcev brisov MV.

Primeri pomnoževanja 88-bp velikih delcev DNA HPV-53 iz 8 vzorcev so prikazani na sliki 6. Rezultati pomnoževanja s kompletom oligonukleotidnih začetnikov 53-99S/53-182R pa so podani v preglednici 3.



Slika 6: Rezultati pomnoževanja delcev HPV-53 v DNA osamljeni iz 8 vzorcev brisov MV z uporabo tipsko značilnih začetnih oligonukleotidov 53-99S/53-182R. Kolona 1-8: rezultati pomnoževanja vzorcev št. 1-8; kolona NK: negativna kontrola; kolona PK: pozitivna kontrola; kolona M: molekularni označevalec 100-bp (Roche Diagnostics).

Preglednica 3: Rezultati merjenja koncentracije osamljene DNA, pomnoževanja beta –globina in TS PCR za HPV-53.

Oznaka izolata	št. vzorca	konc. DNA ng/μl	beta –globin	HPV-53 tipsko specifični PCR
B16	1	7,3	+	+
B17	2	101,2	+	+
B18	3	21,6	+	+
B19	4	26,2	+	+
B12	5	25,2	+	+
B4	6	22,7	+	+
B5	7	4,7	+	+
B13	8	32,2	+	-
B1	9	4,0	-	/
B7	10	3,5	-	/
B2	11	7,1	-	/
B6	12	6,5	-	/
B3	13	5,3	-	/
B11	14	15,4	+	+
B8	15	7,0	+	-
B10	16	23,0	+	+
B9	17	18,6	+	+
B14	18	87,4	+	+
B15	19	36,7	+	+
B20	20	27,8	+	+
B21	21	25,1	+	+

Legenda: +: pozitivno pomnoževanje, -: ni pomnoževanja, /: vzorec ni bil vključen v pomnoževanje.

4.2 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IN OPREDELITEV PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV-53.

Z oligonukleotidnimi začetniki značilnimi za genomska področja LCR, E6 oz. E7 smo DNA HPV-53 uspešno pomnožili v 12 od 14 (85,7%) HPV-53 DNA pozitivnih vzorcev. Nukleotidno zaporedje vseh treh genomskih področij smo uspešno določili pri vseh 12 izolatih HPV-53.

4.2.1 Podtipska različnost genomskega področja LCR

Z določitvijo nukleotidnega zaporedja LCR smo pri 12 izolatih HPV-53 opredelili 6 različic LCR HPV-53, od katerih nobena ni ustrezala LCR sekvenci referenčnega izolata HPV-53 (EMBL: X74482). Štiri različice LCR smo uvrstili med prototipske, medtem ko smo preostali dve različici LCR HPV-53 uvrstili med neprototipske podtipske različice HPV-53.

Različica B-LCR-A1 se je od referenčnega zaporedja LCR razlikovala na enem nukleotidnem mestu, medtem ko sta se različici B-LCR-A2 in B-LCR-A3 od referenčnega zaporedja razlikovali na dveh nukleotidnih mestih. Pri različici B-LCR-A3 smo, poleg treh nukleotidnih zamenjav, med nukleotidnima mestoma 7776 in 7777 zabeležili tudi 53-bp dolgo podvojitev sosednjega ležečega področja genoma (ki ustreza področju genoma med nukleotidnimi pozicijami 7724 in 7776). Da bi potrdili dejanski obstoj duplikacije, in izključili morebitni vpliv reakcije PCR, smo za ta izolat ponovili reakcijo PCR in še enkrat izvedli sekvenčno reakcijo. Le-ta je prisotnost omenjene duplikacije potrdila.

Neprototipski različici B-LCR-B1 in B-LCR-B2 sta se od referenčnega zaporedja LCR razlikovali po za neprototipsko podskupino HPV-53 značilnem vstavku štirih nukleotidov (TGGG) in po 16 oz. 17 enojnih nukleotidnih zamenjavah. Razporeditev različic LCR HPV-53 pri 12 belgijskih izolatih je prikazana na sliki 7.

LCR	7351	7422	7428	7508	7528	7530		7531	7538	7552	7565	7618	7619	7634	7655	7676	7685	7756	7758	7776		7784	7797	7810	frekvence
ref. zap.	A	T	C	G	T	T	-	G	T	A	A	T	T	T	A	C	C	C	G	T	-	C	A	C	0
B-LCR-A1				A			-														-				3
B-LCR-A2	G			A																					1
B-LCR-A3			T	A																					1
B-LCR-A4				A							G										53bp*			T	1
B-LCR-B1		A	T	A	C		TGGG	A	C			G	C	C	G	G	T	T	A		-	T	C		5
B-LCR-B2		A	T	A	C		TGGG	A	C	G		G	C	C	G	G	T	T	A		-	T	C		1

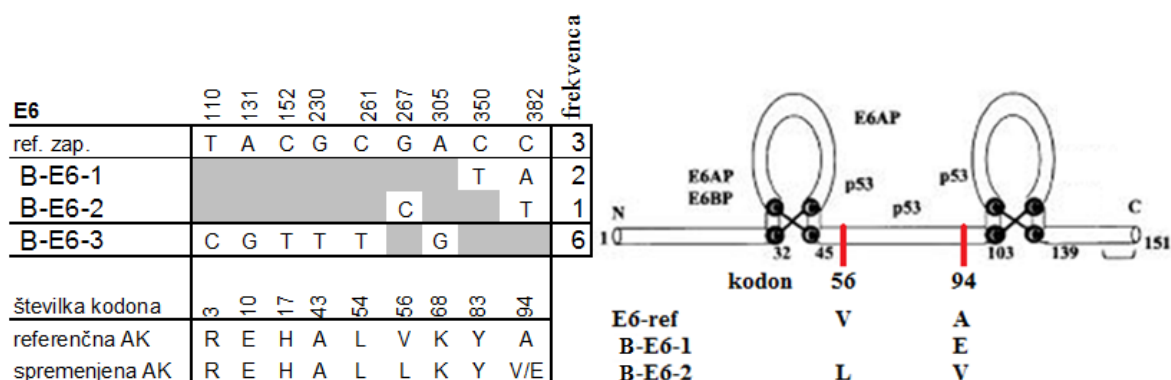
*7724 - 7776 : GCAC TTTAGT G TTTTGG C TTGCAGCA TACG T TCTG C TAGCCAAG TATCTGTCT

Slika 7: Podtipe različice genomskega področja LCR HPV-53 opredeljene pri 12 izolatih HPV-53 iz Belgije. Zgoraj so navedena genomska mesta referenčnega zaporedja LCR, kjer je prišlo do zamenjave oz. vstavitve nukleotidov. Genomska mesta 7530 in 7776 označujeta mesti dveh nukleotidnih vstavkov; enega 4-bp (TGGG) in enega 53-bp (podan pod sliko, označen z *). Genomska mesta, kjer nismo zabeležili nobenih mutacij, glede na referenčno zaporedje, so potemnjena.

4.2.2 Podtipe različnost genov E6 in E7

Z določitvijo nukleotidnega zaporedja celotnega gena E6 smo pri 12 izolatih opredelili 4 različice gena E6, od katerih je ena ustrezala referenčnemu zaporedju gena E6. Referenčno zaporedje E6 smo dokazali pri 3 od 12 (25%) izolatov HPV-53. Različici B-E6-1 in B-E6-2 sta se od referenčnega zaporedja E6 razlikovali na dveh nukleotidnih mestih. Pri teh dveh različicah E6 je sprememba nukleotidnega zaporedja vplivala na spremembo aminokislinskega zaporedja, in sicer je pri različici B-E6-1 prišlo do razlike na enem (0,6% beljakovine E6), pri različici B-E6-2 pa na dveh (1,3% beljakovine E6) mestih znotraj 154 aminokislin dolge beljakovine E6.

Različica B-E6-3 se je od referenčnega zaporedja razlikovala na šestih nukleotidnih mestih, vendar te spremembe niso vplivale na spremembo aminokislinskega zaporedja beljakovine E6. Razporeditev podtipskih različic E6 HPV-53 opredeljenih pri belgijskih izolatih je prikazana na sliki 8.

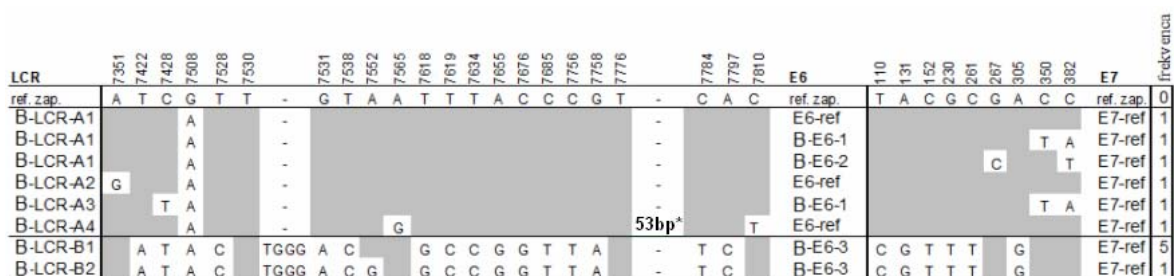


Slika 8: Podtipske spremembe gena E6 opredeljene pri 12 izolatih HPV-53 iz Belgije. Levo: Podtipske različice gena E6. Pod prikazom razlik v nukleotidnem zaporedju so navedene številke odgovarjajočih kodonov s pripadajočimi referenčnimi oz. spremenjenimi aminokislinami. AK – okrajšava za aminokislino. Pri različici B-E6-1 je vidna sprememba alanina (A) v glutaminsko kislino (E) (kodon št. 94), pri različici B-E6-2 pa sta vidni dve razliki v aminokislinskem zaporedju in sicer prisotnost leucina (L) namesto valina (V) (kodon št. 56) in valina (V) namesto alanina (A) (kodon št. 94). Desno: Shematski prikaz pozicije zamenjav aminokislin v beljakovini E6 pri različicah B-E6-1 in B-E6-2.

Z določitvijo nukleotidnega celotnega zaporedja gena E7 smo pri 12 izolatih HPV-53 dokazali le referenčno zaporedje gena E7 HPV-53.

4.2.3 Genomske različice

Na podlagi zabeleženih mutacij v vseh treh področjih genov HPV-53 (E6, E7, LCR) smo pri 12 izolatih HPV-53 opredelili 8 genomskih različic HPV-53. Razporeditev genomskih različic HPV-53 opredeljenih 12 belgijskih izolatih je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Genomske različice HPV-53 opredeljene pri 12 izolatih. Za podrobnosti o *53-bp podvojitvi glej sliko 7.

4.3 FILOGENETSKA UVRSTITEV LCR RAZLIČIC HPV-53 IZ BELGIJE

Dvanajst belgijskih izolatov HPV-53 smo filogenetsko opredelili na podlagi primerjave njihovih nukleotidnih zaporedij področja LCR (605-bp) z zaporedji 20 do sedaj opredeljenih različic LCR-HPV-53. Le-te se uvrščajo v šest podskupin (A1-A6) prototipske podtipe različice A in 14 podskupin (B1-B14) ne-prototipske različice B (Kocjan in sod., 2007). Kot predstavnike posameznih podskupin podtipskih različic LCR smo vključili referenčni izolat in 33 izolatov HPV-53 osamljenih iz različnih geografskih področjih: 13 izolatov iz Slovenije, po štiri izolate iz Brazilije, Mehike in Škotske, tri izolate iz Južne Afrike, po dva izolata iz Hongkonga in ZDA ter en izolat iz Malija.

4.3.1 Filogenetska drevesa

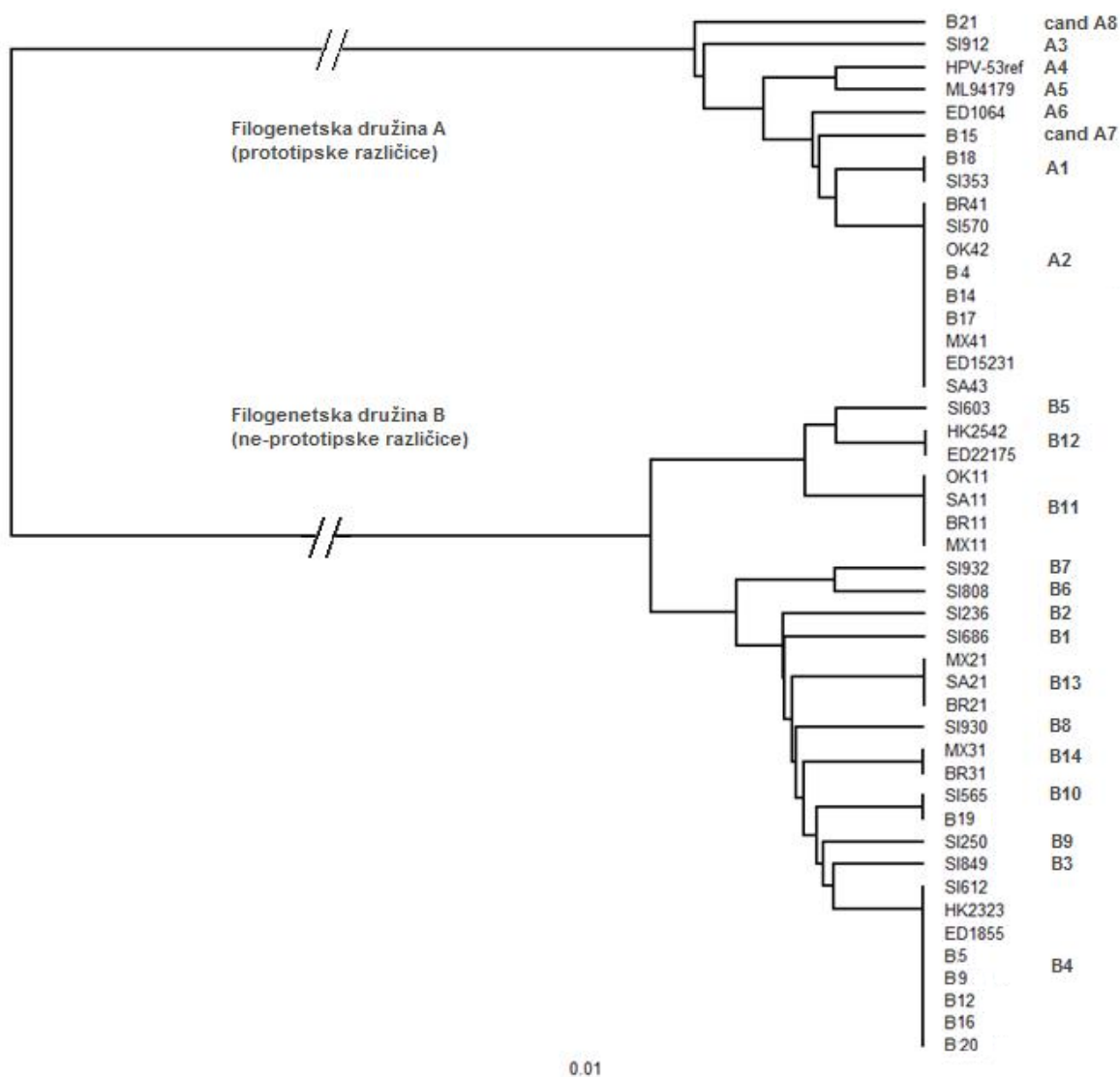
4.3.1.1 Filogenetsko drevo izrisano z pomočjo metode UPGMA

Z metodo UPGMA smo izrisali filogenetsko drevo (Slika 10), kamor smo vključili 46 izolatov HPV-53. Štiri od 6 različic LCR, ki smo jih opredelili pri 12 izolatih, so se uvrstile v že obstoječe podskupine podtipskih različic HPV-53 (Kocjan in sod. 2007), dve različici pa sta bili različni od vseh do sedaj poznanih različic.

V do sedaj izključno slovensko podskupino podtipskih različic LCR A1 se je uvrstila različica B-LCR-A3, ki smo jo opredelili pri enem izolatu (B18). V skupino A2, v katero so uvrščeni izolati HPV-53 iz različnih geografskih področij (Brazilija, Južna Afrika, Mehika, Slovenija, Škotska in ZDA) se je uvrstila različica B-LCR-A1, ki smo jo opredelili pri treh izolatih (B4, B14 in B17). Različici B-LCR-A3 in B-LCR-A4 sta se razlikovali od vseh do sedaj opredeljenih različic prototipske skupine A, zato sta v filogenetskem drevesu zasedli samostojni filogenetski podskupini (candA7, candA8).

Različica B-LCR-B1, ki smo jo opredelili pri 5 belgijskih izolatih (B5, B9, B12, B16, B20) se je uvrstila v podskupino B4, kamor se poleg slovenskih izolatov HPV-53 uvrščajo še

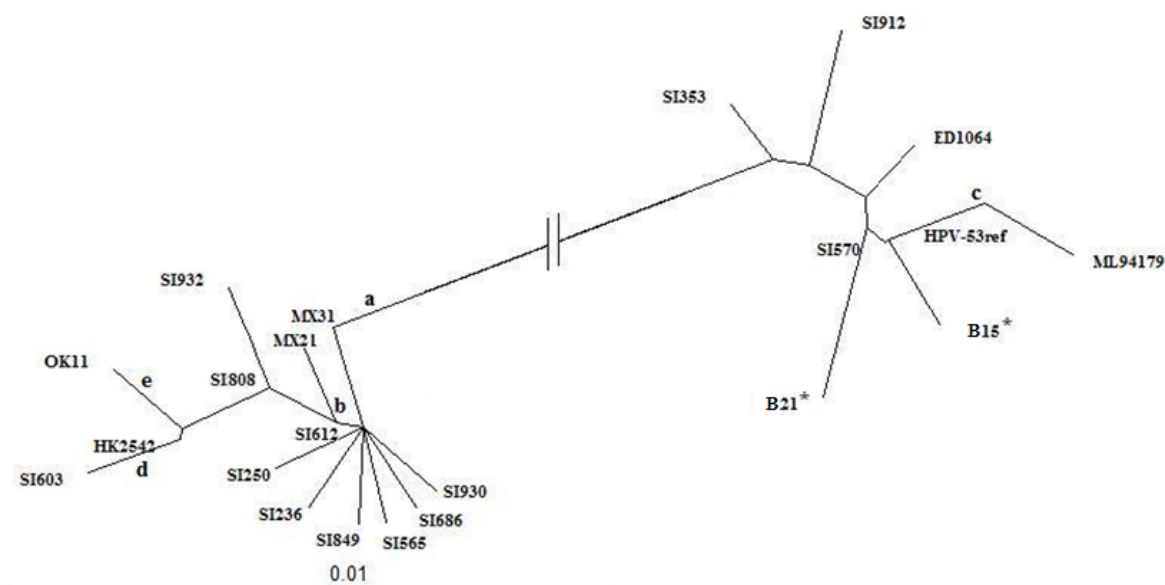
izolati iz Hongkonga in Škotske. Različica B-LCR-B2, ki smo jo opredelili pri izolatu B19, se je uvrstila v podskupino B10, kamor je uvrščen en izolat HPV-53 osamljen v Sloveniji.



Slika 10: Z metodo UPGMA izrisano filogenetsko drevo vseh do sedaj opredeljenih različic LCR HPV-53 iz različnih geografskih področij. V filogenetsko drevo je vključenih 12 belgijskih izolatov HPV-53 (4B, 5B, 9B, 2B, 14B, 15B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 21B); referenčni izolat HPV-53 (X74482) in skupno 33 izolatov HPV-53 iz Slovenije (SI 353, SI 570, SI912, SI 686, SI K236, SI 849, SI 612, SI 603, SI 808, SI 932, SI 930, SI 250 in SI 565); Brazilije (BR41, BR21, BR31, BR11); Hong Konga (HK2323, HK2542); Malija (ML94179); Mehike (MX41, MX21, MX31, MX11); Južne Afrike (SA43, SA21, SA11); Škotske (ED1064, ED15231, ED1855, ED22175); in Združenih Držav Amerike (OK42, OK11). Skrajno desno so navedene podskupine podtipskih različic HPV-53. Različice LCR HPV-53, ki so bile v tej raziskavi opredeljene prvič, so označene s predpono 'cand'. Veja drevesa, ki povezuje obe skupini podtipskih različic HPV-53 je zaradi večje preglednosti skrajšana. Merilo izraža genetsko razdaljo v zamenjavah baz na nukleotidno mesto.

4.3.1.2 Filogenetsko drevo izrisano z metodo najbližjega soseda (NJ)

Filogenetsko drevo smo izrisali tudi z metodo NJ (Slika 11). Vanj smo zaradi večje preglednosti vključili po enega predstavnika iz vsake podskupine podtipskih različic LCR HPV-53, oz. 22 izolatov HPV-53.



Slika 11: Z metodo najbližjega soseda izrisano filogenetsko drevo predstavnikov posameznih podskupin (SI353, SI912, ED1063, HPV-53ref - X74482, ML94179, B15, B21, SI570, SI930, SI686, SI565, SI849, SI236, SI250, SI612, SI603, HK2542, OK11, SI808, SI932, MX21 in MX31) znotraj prototipske in neprototipske različice HPV-53. Statistična zanesljivost postavljenih vej je podana v odstotkih (%): a (100,0), b (68,5), c (66,6), d (53, 1), e (51,3). Veja drevesa, ki povezuje obe skupini podtipskih različic HPV-53 je skrajšana zaradi večje preglednosti. Merilo izraža genetsko razdaljo v zamenjavah baz na nukleotidno mesto. Novi različici področja LCR sta označeni z zvezdico (*).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Material in pomnoževanje genomskih področij LCR, E6 in E7

V raziskavi, ki po dosegljivih podatkih iz literature predstavlja prvo molekularno opredelitev podtipskih različic HPV-53 iz Belgije, smo nukleotidno zaporedje določali trem področjem genoma, in sicer področju LCR (605-bp), genu E6 (465-bp) in genu E7 (318-bp).

Vsa tri področja genoma smo uspešno opredelili pri le 12 (57, 1%) od začetnih 21 izolatov brisov MV, ki naj bi vsebovali DNA genotipa HPV-53, oziroma pri 12 (85,7%) od 14 vzorcev v katerih smo, z tipsko specifičnim RT-PCR, dokazali prisotnost HPV-53. Verjetne razloge za slabo kvaliteto vzorcev gre iskati v majhni količini poslanega izhodiščnega materiala (10-20% izhodiščnega materiala) in v njegovem dolgem transportu (tri tedne pri sobni temperaturi). Ob preverjanju kakovosti DNA osamljene iz vzorcev, se je pokazalo tudi, da je imelo 8 od 21 vzorcev (38%) zelo nizke koncentracije DNA (pod 8 ng/ μ l, glej preglednico 3). Med njimi sta bila tudi oba vzorca, v katerih smo sicer dokazali prisotnost DNA HPV-53, vendar pa nam pomnoževanje področij LCR, E6 in E7 ni uspelo. Glede na dolžino transporta je tudi možno, da je bila DNA v omenjenih vzorcih fragmentirana in je sicer dovoljevala pomnoževanje kratkega (66-bp) področja znotraj gena E6, posamezni fragmenti pa niso bili ustrezno dolgi, da bi dovoljevali pomnoževanje daljših področij genoma.

5.1.2 Opredelitev podtipskih različic HPV-53

Pri 12 izolatih HPV-53, kjer nam je uspelo opredeliti vse tri preiskovane regije genoma, smo opredelili 6 različic LCR, 4 različice E6 in 1 različico E7.

Štiri različice LCR so se uvrstile med predhodno opisane različice LCR HPV-53, pri dveh različicah iz prototipske skupine pa je šlo za prvo opredelitev. Od obeh prvič opredeljenih

različic LCR je bila zanimiva predvsem različica B-LCR-A4 (izolat B21), ki je imela med pozicijami 7775 in 7776 referenčne sekvence 53-bp dolgo duplikacijo sosednje ležečega območja.

Od 4 različic E6 je pri dveh različicah E6 spremenjeno nukleotidno zaporedje vplivalo na aminokislinsko zaporedje beljakovine E6. Pri različici B-E6-1 je prišlo do spremembe alanina (A) v glutaminsko kislino (E) v kodonu št. 94, pri različici B-E6-2 pa je prišlo v aminokislinskem zaporedju do dveh sprememb, in sicer do zamenjave valina (V) za leucin (L) v kodonu št. 56, ter alanina (A) za valin (V) v kodonu št. 94. Ker so aminokislina alanin, valin in leucin podobne po svojih biokemičnih lastnostih (pri vseh treh gre za t.i. nepolarne alifatske aminokislina) je malo verjetno, da bi medsebojne zamenjave teh aminokislina bistveno vplivale na strukturo beljakovine E6. Večji vpliv na strukturo beljakovine E6 bi lahko imela zamenjava alanina z glutaminsko kislino (pri različici B-E6-1), saj je slednja negativno nabita. Vendar pa samo iz tega ni mogoče sklepati na spremembo v biološki funkciji beljakovine E6, oziroma na povečano / zmanjšano patogenost podtipске različice z omenjeno mutacijo, glede na druge različice HPV-53.

5.1.3 Filogenetske analize

Dvanajst belgijskih izolatov HPV-53 smo na podlagi primerjave 605-bp področja LCR z zaporedji vseh do sedaj opredeljenih različic LCR HPV-53 filogenetsko uvrstili v dve novi in 4 že obstoječe podskupine podtipskih različic HPV-53 .

Polovica izolatov HPV-53 se je uvrstila v prototipsko skupino A, druga polovica pa v ne-prototipsko skupino B podtipskih različic HPV-53, kar smo glede na predhodne raziskave (Prado in sod., 2005, Kocjan in sod., 2007), ki so ugotovile dihotomno razdelitev podtipskih različic HPV-53, tudi pričakovali. Tako v prototipski, kot v ne-prototipski skupini podtipskih različic, so se nekatere belgijske različice uvrstile v podskupine v katere so uvrščeni izolati HPV-53 iz več različnih geografskih področij. Dve belgijski različici sta se uvrstili v podskupini v katerih so se do sedaj nahajale izključno slovenske različice LCR. Prvič opredeljeni belgijski različici B-LCR-A3 in B-LCR-A4 sta zasedli samostojni filogenetski podskupini znotraj prototipske skupine A.

5.2 SKLEPI

- V naši raziskavi, ki je zajela 21 izolatov genotipa HPV-53 iz Belgije, smo pri 12 izolatih opredelili 6 različic področja LCR, 4 različice gena E6 in 1 različico gena E7.
- Z raziskavo smo potrdili domnevo o filogenetski uvrstitvi belgijskih različic HPV-53, saj so se le-te uvrstile tako med že opisane slovenske podskupine, kot tudi med podskupine podtipskih različic HPV-53, ki so bile izolirane z več geografskih področij po svetu. Po pričakovanjih smo odkrili tudi dve novi podskupini podtipskih različic HPV-53.
- Z filogenetsko uvrstitvijo vseh 12 opredeljenih izolatov iz Belgije, med prototipsko in ne-prototipsko podtipsko različico HPV-53, smo dodatno potrdili dihonomijo filogenetskega drevesa podtipskih različic HPV-53. Tako, kot v raziskavi Kocjana in sod. (2007), smo tudi v naši raziskavi ugotovili zvezdasto porazdelitev podskupin podtipskih različic genotipa HPV-53.
- Iz izsledkov raziskave ni bilo mogoče sklepati na povečano / zmanjšano patogenost podtipskih različic HPV-53. Da bi lahko to domnevo potrdili, bi bile potrebne podrobnejše raziskave konformacijskih različic onkogenih beljakovin E6 in E7, ter nadaljne raziskave polimorfizma še drugih genomskega področij genotipa HPV-53. Predvsem pa bi bila potrebna opredelitev podtipskih različic genotipa HPV-53 osamljenih pri ženskah z RMV.

6 POVZETEK

Dolgotrajna okužba z viskorizičnimi humanimi virusi papiloma (HPV) predstavlja glavni rizični dejavnik za razvoj raka materničnega vratu (RMV). Humani virus papiloma genotip HPV-53 so v določenem nizkem deležu odkrili v predrakavih spremembah visoke stopnje in pri posameznih primerih RMV, zato ga uvrščamo med verjetno visokorizične genotipe HPV.

Ena od možnih razlag, zakaj le pri redkih ženskah okuženih s HPV-53 pride do razvoja premalignih in malignih sprememb na materničnem vratu, je, da so okužene z značilno, domnevno bolj patogeno, podtipsko različico HPV-53, vendar tega dosedanje raziskave niso potrdile.

V diplomski nalogi smo zato želeli opredeliti podtypeske različice HPV-53 na podlagi treh, za onkogenezo pomembnih področij virusnega genoma, in jih na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij uvrstiti v obstoječe filogenetske skupine. V nalogi smo vključili 21 izolatov iz Belgije, od katerih smo dvanajstim uspešno pomnožili vsa tri preiskovana področja genoma (LCR, E6 in E7). Pridelke PCR smo očistili z komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) in jim z uporabo komercialno dostopnega kompleta BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) določili zaporedje regije LCR (605-bp), ter genov E6 (465-bp) in E7 (318-bp). Določanje nukleotidnega zaporedja je bilo izvedeno na aparaturi za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Iz elektroferograma pridobljeno nukleotidno zaporedje smo analizirali in obdelali z uporabo računalniškega programa BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University). Kot novo različico posameznega področja genotipa HPV-53 smo opredelili vsak izolat HPV-53, ki se je od referenčnega izolata HPV-53 (X74482) razlikoval za najmanj eno točkasto mutacijo v 605-bp, 465-bp oz. 318-bp dolgem področju LCR, E6 oz. E7. Pri 12 izolatih HPV-53 smo tako opredelili 6 različic področja LCR, 4 različice gena E6 in 1 različico gena E7.

Belgijske različice HPV-53 smo na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja področja LCR z vsemi dosedaj poznanimi različicami LCR HPV-53 filogenetsko opredelili z uporabo programskega paketa Phylip v3.6. Ugotovili smo, da so se, po pričakovanjih, belgijske različice HPV-53 uvrstile v že opisane podskupine podtipskih različic HPV-53, ki so bile izolirane iz več geografskih področij po svetu, kot tudi v do sedaj izključno slovenske podskupine.

V raziskavi smo dve različici področja LCR opredelili prvič. Pri eni od novih različic smo našli na 53-bp dolgo podvojitev področja znotraj LCR. Pri dveh različicah gena E6 smo odkrili mutacije, ki so vplivale na spremenjeno aminokislinsko sestavo beljakovine E6, vendar iz teh sprememb ni bilo mogoče sklepati na spremembo biološke funkcije beljakovine E6, oz. na povečan / zmanjšan patogeni vpliv takih podtipskih različic. Da bi lahko prišli do ustreznih zaključkov glede vpliva polimorfizmov na patogenezo pri podtipskih različicah HPV-53, bi bile potrebne nadaljne raziskave polimorfizma še drugih genomskih področij, podrobnejše raziskave konformacijskih različic onkogenih beljakovin E6 in E7, in molekularna opredelitev podtipskih različic genotipa HPV-53 osamljenih pri ženskah z RMV.

7 VIRI

Bernard H.-U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32: 1-6

Bhattacharjee B., Sengupta S. 2006. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*, 354: 280-285

Blachon S., Demeret C. 2003. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, 85: 813-819

Bosch F. X., Manos M. M., Munoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M. H., Moreno V., Kurman R., Shah K. V., Alihonou E., Bayo S., Mokhtar H. C., Chicareon S., Daudt A., Delosrios E., Ghadirian P., Kitinya J. N., Koulibaly M., Ngelangel C., Tintore L. M. P., Riosdalen J. L., Sarjadi, Schneider A., Tafur L., Teyssie A. R., Rolon P. A., Torroella M., Tapia A. V., Wasinga H. R., Zatonski W., Sylla B., Vizcaino P., Magnin D., Kaldor J., Greer C., Wheeler C. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, 87: 796-802

Bosch F. X., Rohan T., Schneider A., Frazer I., Pfister H., Castellsague X., se Sanjose S., Moreno V., Puig-Tintore L. M., Smith P. G., Munoz N., zur Hausen H. 2001. Papilloma research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 163-175

Bravo I. G., Alonso A. 2004. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *Journal of Virology*, 78: 13613-13626

Broccolo F., Cocuzza C. E. 2007. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by a real-time PCR-based system. *Journal of Virological Methods*, 148: 48-57

Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. 2004. *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology*. 23rd ed. New York, McGraw-Hill Companies: 818 str.

Calleja-Macias I. E., Kalantari M., Allan B. 2005. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *Journal of Virology*, 79: 6565-6569

Cerqueira, D. M., de Lima Camara G. N., da Cruz M. R., Silva E. O., de Macedo Brigido M., de Souza Carvalho L. G., Martins C. R. F. 2003. Variants of human papillomavirus types 53, 58, and 66 in central Brazil. *Virus Genes*, 26: 83-87

Chakrabarti O., Krishna S. 2003. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *Journal of Biosciences*, 28: 337-348

Clifford G. M., Rana R. K., Franceschi S., Smith J. S., Gough G., Pimenta J. M. 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14: 1157-1164

Coutlée F., Gravitt P., Kornegay J., Hankins C., Richardson H., Lapointe N., Voyer H., The Canadian Women's HIV Study Group, Franco E. 2002. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 902-907

de Sanjose S., Diaz M., Castellsague X., Clifford G., Bruni L., Munoz N., Bosch F. X. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 7: 453-459

de Roda Husman A. M., Walboomers J. M., van den Brule A. J., Meijer C. J., Snijders P. J. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76: 1057-1062

de Villiers E.-M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H.-U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27

de Villiers E.-M. 2001. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 12: 57-64

Delius H., Hofmann B. 1994. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 186: 13-31

Dillner J., Brown D. R. 2004. Can genital-tract human papillomavirus infection and cervical cancer be prevented with a vaccine? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 6: 1-21

Duensing S., Lee L. Y., Duensing A., Basile J., Piboonniyom S.-o., Gonzalez S., Crum C. P., Munger K. 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 10002-10007

Ellis J. R. M., Keating P.J., Baird J., Hounsell E. F., Renouf D. V., Rowe M., Hopkins D., Duggan-Keen M.F., Bartholomew J.S., Young L.S., Stern P.L. 1995. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Medicine*, 1: 464-470

Gallahan D., Muller M., Schneider A., Delius H., Kahn T., de Villiers E.-M., Gissmann L. 1989. Human papillomavirus type 53. *Journal of Virology*, 63: 4911-4912

Grassmann K., Wilczynski S. P., Cook N., Rapp B., Iftner T. 1996. HPV6 variants from malignant tumors with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. *Virology*, 223: 185-197

Gravitt P. E., Peyton C. L., Alessi T. Q., Wheeler C. M., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M. H., Scott D. R., Apple R. J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 357-361

Hagiwara M., Sasaki H., Matsuo K., Honda M., Kawase M., Nakagawa H. 2007. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus Type 6, 11, 16 and 18. *Journal of Medical Virology*, 79: 605-615

Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98

Hubert W. G. 2005. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *Journal of Virology*, 79: 5914-5922

Kämmer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C.M., Pfister H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *Journal of General Virology*, 81: 1975-1981

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

Kocjan B. J., Seme K., Močilnik T., Jančar N., Vrtačnik-Bokal E., Poljak M. 2007. Genomic diversity of human papillomavirus genotype 53 in an ethnogeographically closed cohort of white european women. *Journal of Medical Virology*, 79: 431-438

Kocjan B. 2007. Molekularna opredelitev podtipskih različic humanih virusov papiloma HPV-6, HPV-53 in HPV-38 in njihov patogenetski pomen. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 156 str.

Lei Y.-J. Gao C., An R., Shi Q., Chen J.-M., Yuan Y.-K., Wang C., Han J. Dong X-P. 2007. Development of a multiplex PCR method for detecting and typing human papillomaviruses in verrucae vulgaris. *Journal of Virological Methods*, 147: 72-77

Lindh M., Gorander S., Andersson E., Horal P., Mattsby-Balzer I., Ryd W. 2007. Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *Journal of Clinical Virology*, 40: 321-324

Maciag P. C., Schlecht N. F., Souza P. S. A., Franco E. L., Villa L. L., Petzl-Erler M. L. 2000. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in brazilian women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9: 1183-1191

Marchetti B., Ashrafi G. H., Tsirimonaki E., O'Brien P. M., Campo M. S. 2002. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Nature*, 21: 7808-7816

McGlennen R. C. 2000. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 20: 384-405

Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32: 43-51

Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.V., Snijders P. J., Meijer C. J. L. M. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348: 518-527

Munoz N., Bosch F. X., Castellsague X., Diaz M., de Sanjose S., Hammouda D., Shah K. V., Meijer C. J. L. M. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*, 111: 278- 285

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: i-vii

Platt A. R., Woodhall R. W., George A. L. Jr. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques*, 43: 58-62

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

Poljak M., Marin I. J., Seme K., Vince A. 2002. Hybrid capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *Journal of Clinical Virology*, 25: 89-97

Poljak M., Seme K., Gale N. 1998. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 5: 216-234

Prado J. C., Calleja-Macias I. E., Bernard H.-U., Kalantari M., Macay S. A., Allan B., Williamson A.-L., Chang L.-P., Collins R. J., Zuna R. E., Dunn S. T., Ortiz-Lopez R., Barrera-Saldaña H. A., Cubie H. A., Cuschieri K., von Knebel-Doeberitz M., Sanchez G. I., Bosch F. X., Villa L. L. 2005. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56 and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*, 340: 95-104

Smith E. M., Hoffman H. T., Summersgill K. S., Kirchner H. L., Turek L. P., Haugen T. H. 1998. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*, 108: 1098-1103

Smith J. S., Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Winer R., Clifford G. M. 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of Cancer*, 121: 621-632

Syrjänen K., Syrjänen S. 2000. Papillomavirus infections in human pathology. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 630 str.

Takacs T., Jeney C., Kovacs L., Mozes J., Benczik M., Sebe A. 2008. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *Journal of Virological Methods*, 149: 153-162

Terry G., Ho L., Cuzick J. 1997. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *International Journal of Cancer*, 73: 651-655

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680

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

Tommasino M., Accardi R., Caldeira S., Dong W., Malanchi I., Smet A., Zehbe I. 2003. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human mutation*, 21: 307-312

Tornesello M. L., Duraturo M. L., Salatiello I., Buonaguro L., Losito S., Botti G., Stellato G., Greggi S., Piccoli R., Pilotti S., Stefanon B., De Palo G., Franceschi S., Buonaguro F. M. 2004. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 74: 117-126

Walboomers J. M. M., Husman A. M. D., Snijders P. J. F., Stel H. V., Risse E. K. J., Helmerhorst T. J. M., Voorhorst F. J., Meijer C. J. L. M. 1995. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 48: 728-732

Zehbe I., Mytilineos J., Wikström I., Henriksen R., Edler L., Tommasino M. 2003. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of swedish women. *Human Immunology*, 64: 538-542

Zehbe I., Voglino G., Wilander E., Delius H., Marongiu A., Edler L., Klimek F., Andersson S., Tomassino M. 2001. P53 Codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factor for cervical cancer development. *Cancer Research*, 61: 608-611

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

zur Hausen H. 1991. Viruses in human cancers. *Science*, 254: 1167-1173

8 ZAHVALA

Najprej bi se želela zahvaliti mentorju diplomske naloge prof. dr. Mariu Poljaku dr. med. ker mi je omogočil delo v svojem laboratoriju in sodelovanje pri pravem raziskovalnem delu. Somentorju dr. Boštjanu Kocjanu se iskreno zahvaljujem za ogromno količino truda in časa, predvsem pa za humor, s katerim mi je pomagal rešiti različne probleme, ki so se pojavili med izdelavo diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Katji Seme za končne popravke diplomske naloge.

Nadalje se zahvaljujem vsem v laboratoriju, ki so mi na različne načine pomagali pri praktičnem delu; Tini, Robiju, Petri, Blanki, Željki, predvsem pa Maji Lunar za veliko koristnih nasvetov in prijetnih trenutkov med delom.

Največja zahvala pa gre mojim 'glavnim sponzorjem', moji družini. Posebej hvala mami, Adica, Atek, Andrej in David.