

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja JELEN

**GENOMSKA RAZNOLIKOST ČLOVEŠKIH
PAPILOMAVIRUSOV HPV-6 IN HPV-11**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja JELEN

**GENOMSKA RAZNOLIKOST ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV
HPV-6 IN HPV-11
DOKTORSKA DISERTACIJA**

**GENOMIC DIVERSITY OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES HPV-6
AND HPV-11
DOCTORAL DISSERTATION**

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 19.9.2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicina, s področja mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Mario Poljak, spec. klin. mikrobiol.

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

Mentor: prof. dr. Mario Poljak, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

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

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

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

Datum zagovora: 23.10.2014

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka
Mateja Jelen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK 578.5:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
 KG virusi/*Papillomaviridae*/človeški papilomavirus/HPV/genotip HPV-6/genotip HPV-11/svetovna genomska raznolikost/celotni genom/filogenetska analiza/molekularne tehnike
 AV JELEN, Mateja, univ. dipl. mikr.
 SA POLJAK, Mario (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje mikrobiologije
 LI 2014
 IN GENOMSKA RAZNOLIKOST ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV HPV-6 IN HPV-11
 TD Doktorska disertacija
 OP XIII, 108 str., 11 pregl., 16 sl., 3 pril., 192 vir.
 IJ SI
 JI sl/en
 AI Človeška papilomavirusa HPV-6/-11 sta medicinsko najbolj pomembna nizkorizična genotipa, ki povzročata več kot 90 % vseh anogenitalnih bradavic in papilomov grla in sta vključena v štirivalentno in nonavalentno cepivo proti HPV. Genomska raznolikost HPV-6/-11 je, v primerjavi z visokorizičnimi HPV, slabo raziskana. V našo raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev in 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev, pridobljenih iz različnih anatomskih področij okužbe (anogenitalnih bradavic, papilomov grla in brisov materničnega vratu), iz šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika). Pridobljenim vzorcem smo določili približno 2.800 baznih parov (bp) dolgo nukleotidno zaporedje, ki je združevalo naslednja genomska področja: E5a, E5b, L1 in LCR, na podlagi katerih smo opredelili najbolj raznolike podtipske različice obeh genotipov in jim določili celotno nukleotidno zaporedje (približno 8.000 bp). Opredelili smo 130 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 in 14 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11. Genomska raznolikost HPV-6/-11 in filogenetske povezave posameznih podtipskih različic smo opredelili z analizo 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 (130 opredeljenih v naši raziskavi in 60 pridobljenih iz genskih bank) in 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 (14 opredeljenih v naši raziskavi in 49 pridobljenih iz genskih bank). Pokazali smo, da se podtipske različice HPV-6 uvrščajo v dve genetski liniji: A in B ter pet podlinij: B1, B2, B3, B4 in B5; globalno so prevladovali različice B1. Z multivariatno logistično regresijo (na 724 HPV-6-pozitivnih vzorcih) smo potrdili, da po vsem svetu prevladujejo podtipske različice B (B1). Dodatno smo pokazali, da v Afriki, Severni in Južni Ameriki prevladujejo podtipske različice B3 in v Aziji različice A; da so podtipske različice B1 in B3 povezane z anogenitalnimi okužbami in da imajo, v primerjavi z moškimi, ženske višje obete za okužbe s podtipskimi različicami B3. Podtipske različice HPV-11 smo uvrstili v dve genetski liniji: A in B ter štiri podlinije: A1, A2, A3 in A4 (globalno so prevladovali različice A2). Pri obeh genotipih smo opredelili linijsko in podlinijsko-specifične polimorfizme posameznih nukleotidov in določili najkrajše nukleotidno zaporedje (pri HPV-6 znotraj gena L2 in pri HPV-11 znotraj področja E2-NCR2-E5a), ki je dovolj informativno za določanje vseh do sedaj opredeljenih linij in podlinij HPV-6/-11. V plašni beljakovini L1 obeh genotipov smo dokazali obstoj aminokislinskih zamenjav, ki bi teoretično lahko vplivale na učinkovitost štirivalentnega/nonavalentnega cepiva proti HPV. Izsledki naše raziskave bodo pomembno prispevali k razumevanju svetovne genomske raznolikosti HPV-6/-11, njune patogeneze, epidemiologije, evolucije in pomagali pri razvoju diagnostičnih testov za HPV-6/-11 in cepiv proti HPV.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.5:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
- CX viruses/*Papillomaviridae*/human papillomavirus/HPV/genotype HPV-6/genotype HPV-11/worldwide genomic diversity/complete genome/phylogenetic analysis/molecular techniques
- AU JELEN, Mateja
- AA POLJAK, Mario (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field Microbiology
- PY 2014
- TI GENOMIC DIVERSITY OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES HPV-6 AND HPV-11
- DT Doctoral dissertation
- NO XIII, 108 p., 11 tab., 16 fig., 3 ann., 192 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Human papillomavirus (HPV) genotypes HPV-6 and HPV-11 are the two medically most important low-risk genotypes, etiologically involved in more than 90 % of anogenital warts and laryngeal papillomas and have been included in both, the quadrivalent and nonavalent prophylactic HPV vaccines. In contrast to high-risk HPVs, the worldwide genomic diversity of HPV-6 and HPV-11 has never been clearly evaluated. In our study we included 530 HPV-6-positive samples and 207 HPV-11-positive samples, collected from different anatomical sites of infection (anogenital warts, laryngeal papillomas, cervical swabs) from six continents: Europe, Asia, North and South America, Australia and Africa. In order to select the most variable HPV-6/-11 genomic variants, a 2,800-bp fragment of E5a-E5b-L1-LCR was sequenced; variants exhibiting the highest genomic variability were sequenced in full length (approximately 8,000 bp). A total of 190 HPV-6 complete genomes (130 from our study and 60 from sequence repositories) and 63 HPV-11 complete genomes (14 from our study and 49 from sequence repositories) were (phylo)-genetically analyzed in our study. Phylogenetic analysis revealed two variant lineages for HPV-6: A and B, and five sublineages: B1, B2, B3, B4 and B5; sublineage B1 prevailed globally. Multivariate logistic regression analysis (on 724 HPV-6-positive samples) confirmed the predominance of sublineage B1 and additionally revealed that the sublineage B3 was more common in Africa and North and South America and lineage A in Asia. Sublineages B1 and B3 were associated with anogenital infections, indicating a potential lesion-specific predilection of some HPV-6 sublineages. Females had higher odds for infection with sublineage B3 than males. HPV-11 phylogenetic analysis revealed two lineages: A and B, and four sublineages: A1, A2, A3 and A4; sublineage A2 prevailed globally. HPV-6/-11 (sub)lineage-specific single nucleotide polymorphisms and representative regions for whole-genome-based phylogenetic clustering were identified within L2 ORF and E2-NCR2-E5a genomic region, respectively. We identified several novel amino acid mutations in major capsid protein L1 that could potentially impact the effectiveness of quadrivalent/nonavalent HPV vaccines. In conclusion, our study provides a valuable resource for future epidemiological, evolutionary, functional, pathogenicity, vaccination and molecular assay development studies.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	3
1.2 HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 ZGODOVINA	5
2.2 KLASIFIKACIJA PAPILOMAVIRUSOV	5
2.3 RAZVRŠČANJE GENOTIPOV HPV GLEDE NA TKIVNI TROPIZEM	8
2.4 EVOLUCIJA PAPILOMAVIRUSOV	9
2.5 ZGRADBA HPV	11
2.5.1 Struktura genoma.....	11
2.5.2 Vloga virusnih beljakovin.....	12
2.5.3 Beljakovina L1	15
2.6 NARAVNI POTEK OKUŽBE S HPV	17
2.6.1 Primarna okužba epidermisa	17
2.6.2 Produktivna okužba	18
2.6.3 Nepopolna (abortivna) okužba	19
2.6.4 Okužbe z visokorizičnimi HPV in nastanek raka.....	19
2.6.5 Razlike pri okužbi med visoko- in nizkorizičnimi genotipi HPV.....	21
2.7 KLINIČNA SLIKA IN EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z NIZKORIZIČNIMA GENOTIPOMA HPV-6/-11	21
2.7.1 Anogenitalne bradavice.....	22
2.7.2 Papilomi grla	23
2.7.3 Cervikalna intraepitelijska neoplazija	25

2.8 PATOGENETSKI POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV	26
2.8.1 Podtipske različice HPV-6	28
2.8.2 Podtipske različice HPV-11	33
3 MATERIAL IN METODE	37
3.1 MATERIAL	37
3.1.1 HPV-6-pozitivni vzorci.....	37
3.1.2 HPV-11-pozitivni vzorci.....	38
3.2 METODE	39
3.2.1 Potrjevanje okužb s HPV-6/-11	39
3.2.2 Določanje koncentracije celokupne DNA.....	40
3.2.3 Pomnoževanje DNA HPV-6.....	41
3.2.4 Pomnoževanje DNA HPV-11.....	41
3.2.5 Dokazovanje in analiza velikosti pridelkov PCR.....	43
3.2.6 Čiščenje in določanje koncentracije pridelkov PCR.....	44
3.2.7 Neposredno določanje nukleotidnega zaporedja	44
3.2.8 Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij.....	44
3.2.9 Izbira podtipskih različic za določanje celotnih nukleotidnih zaporedij	45
3.2.10 Določanje genomske raznolikosti celotnih nukleotidnih zaporedij	45
3.2.11 Filogenetske analize	46
3.2.12 Določanje linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev	46
3.2.13 Statistična obdelava podatkov	47
3.2.14 Analiza aminokislinskih zaporedij beljakovine L1	48
4 REZULTATI.....	49
4.1 HPV-6.....	49
4.1.1 Genomska raznolikost HPV-6	49
4.1.2 Genetska raznolikost gena L1 HPV-6.....	50
4.1.3 Filogenetska analiza podtipskih različic HPV-6 in opredelitev genetskih linij in podlinij.....	52
4.1.4 Opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev	56
4.1.5 Povezave genetskih (pod)linij HPV-6 z geografskim izvorom, anatomskim področjem okužbe in bolnikovim spolom.....	58
4.2 HPV-11.....	63

4.2.1 Genomska raznolikost HPV-11	63
4.2.2 Genetska raznolikost gena L1 HPV-11.....	64
4.2.3 Filogenetska analiza podtipskih različic HPV-11 in opredelitev genetskih linij in podlinij.....	65
4.2.4 Opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev	68
5 RAZPRAVA.....	71
5.1 GENOMSKA RAZNOLIKOST HPV-6/-11	72
5.1.1 Genetska raznolikost gena L1 pri HPV-6/-11-pozitivnih vzorcih	73
5.2 OPREDELITEV GENETSKIH LINIJ IN PODLINIJ TER (POD)LINIJSKO-SPECIFIČNIH SNP-JEV	74
5.3 POVEZAVE GENETSKIH (POD)LINIJ HPV-6 Z GEOGRAFSKIM IZVOROM, ANATOMSKIM PODROČJEM OKUŽBE IN BOLNIKOVIM SPOLOM	76
6 SKLEPI	78
7 POVZETEK.....	80
8 SUMMARY	82
9 VIRI	84
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija genotipov HPV iz rodu alfa glede na rakotvorni potencial (Bouvard in sod., 2009: 322).....	9
Preglednica 2: Bolezni, ki jih povezujemo z okužbami s HPV (Cubie, 2013: 22)	27
Preglednica 3: 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave	30
Preglednica 4: 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave	34
Preglednica 5: 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v raziskavo	38
Preglednica 6: 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev, vključenih v raziskavo	39
Preglednica 7: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje DNA HPV-11.....	42
Preglednica 8: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6.....	50
Preglednica 9: Kontingenčna tabela za 724 podtipskih različic HPV-6.....	59
Preglednica 10: Statistične povezave na podlagi multivariatne logistične regresije med genetskima linijama B in A (binomski model), podlinijama B1 in B3 ter linijo A (multinomski model), celine, anatomskim področjem okužbe in bolnikovim spolom	62
Preglednica 11: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetski prikaz sorodnosti 189 papilomavirusov (Bernard, 2013a: 3).....	6
Slika 2: Frekvenčna razporeditev deležev medsebojnih podobnosti nukleotidnih zaporedij gena L1 118 papilomavirusov (de Villiers in sod., 2004: 20).....	7
Slika 3: Struktura virusa HPV in organizacija genoma (Kocjan in Poljak, 2011: 43).....	12
Slika 4: Virusna sredica človeškega papilomavirusa (Kocjan in Poljak, 2011: 43).....	15
Slika 5: Kristalna struktura pentamera L1 virusa HPV-16 (Bishop in sod., 2007: 31805). 16	
Slika 6: Shematski prikaz razvoja raka materničnega vratu (Kocjan in Poljak, 2011: 47). 20	
Slika 7: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovine L1 treh genotipov HPV: HPV-16 (HPV16REF), HPV-6 (HPV6REF) in HPV-11 (HPV11REF)	52
Slika 8: Matrična mapa, izrisana na podlagi 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6. 53	
Slika 9: Filogenetsko drevo in razlike parov nukleotidnih zaporedij na podlagi 48 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6.....	55
Slika 10: Prikaz linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev na podlagi primerjave 48 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6.....	57
Slika 11: Filogenetsko drevo na podlagi 960 bp dolgega zaporedja znotraj L2 ORF.....	58
Slika 12: Geografska porazdelitev linije A in podlinij B1, B2, B3, B4 in B5, na podlagi analize 724 podtipskih različic HPV-6.....	60
Slika 13: Matrična mapa, izrisana na podlagi 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 66	
Slika 14: Filogenetsko drevo in razlike parov nukleotidnih zaporedij na podlagi 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11	67
Slika 15: Prikaz linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev na podlagi primerjave 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11	69
Slika 16: Filogenetsko drevo na podlagi 270 bp dolgega zaporedja znotraj genomskega področja E2-NCR2-E5a.....	70

KAZALO PRILOG

- Priloga A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji
- Priloga B: 63 HPV-11-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji
- Priloga C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASCUS	atipične spremembe ploščatoceličnega epitelija materničnega vratu (angl. <i>atypical squamous cells of undetermined significance</i>)
CI	interval zaupanja (angl. <i>confidence interval</i>)
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija (predrakava sprememba materničnega vratu), (angl. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CIN1	cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje
CIN2	cervikalna intraepitelijska neoplazija 2. stopnje
CIN3	cervikalna intraepitelijska neoplazija 3. stopnje
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
HPV	človeški papilomavirus (angl. <i>human papillomavirus</i>)
HSIL	intraepitelijske spremembe ploščatoceličnega epitelija visoke stopnje (angl. <i>high-risk squamous intraepithelial lesions</i>) (CIN3)
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (angl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LCR	nekodirajoče, kontrolno področje genoma HPV (angl. <i>long control region</i>)
LSIL	intraepitelijske spremembe ploščatoceličnega epitelija nizke stopnje (angl. <i>low-risk squamous intraepithelial lesions</i>) (CIN1)
OR	razmerje obetov (angl. <i>odds ratio</i>)
ORF	odprti bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
OZ	oligonukleotidni začetnik
p53	tumor zavirajoča beljakovina (angl. <i>tumour suppressor protein</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PIL-NS	ploščatocelična intraepitelijska lezija nizke stopnje (CIN1)
PIL-VS	ploščatocelična intraepitelijska lezija visoke stopnje (CIN2, CIN3)
pRb	retinoblastomska beljakovina (angl. <i>retinoblastoma protein</i>)
RRP	rekurentna respiratorna papilomatoza (angl. <i>recurrent respiratory papillomatosis</i>)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)

SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
VLP	virusu podoben delec (angl. <i>virus-like particle</i>)

1 UVOD

Papilomaviruse uvrščamo v družino *Papillomaviridae*. Njihov genom predstavlja krožna dvojnovijačna DNA, dolga približno 8.000 baznih parov (bp). Na podlagi raznolikosti nukleotidnega zaporedja delimo PV v rodove, vrste in genotipe. Za človeka je pomembnih pet rodov: alfa, beta, gama, mu in nu. Genotipi predstavljajo osnovno taksonomsko enoto v klasifikaciji papilomavirusov. Papilomaviruse, katerih gostitelj je človek, imenujemo človeški papilomavirusi (angl. *human papillomavirus*, HPV). Razširjeni so po vsem svetu in so povzročitelji različnih benignih in malignih sprememb kože in sluznic (de Villiers in sod., 2004; de Villiers, 2013).

Do aprila 2013 je bilo dokončno opredeljenih že več kot 170 različnih genotipov HPV. Kot nov genotip HPV opredelimo vsak izolat, ki se v nukleotidnem zaporedju gena L1, od uradno priznanega, referenčnega, najbolj sorodnega genotipa HPV, razlikuje za več kot 10 %. Kadar je odstopanje od zaporedja gena L1 istega genotipa HPV med 2 % in 10 %, govorimo o novem podtipu HPV. Kot podtipsko različico HPV opredelimo vsak izolat, pri katerem je odstopanje od zaporedja referenčnega izolata istega genotipa HPV v genu L1 manjše od 2 %, ali v zaporedju LCR manjše od 5 % (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2006; Bernard in sod., 2010; de Villiers, 2013).

Glede na vrsto novotvorb, ki jih povzročajo genotipi HPV iz rodu alfa, jih delimo na visokorizične, verjetno visokorizične in nizkorizične genotipe (Bouvard in sod., 2009). HPV-6/-11 sta najpomembnejša nizkorizična genotipa HPV, saj sta povzročitelja več kot 90 % anogenitalnih bradavic in skoraj vseh primerov papilomov grla. Odgovorna sta tudi za nastanek približno 12 % cervikalnih intraepitelijskih neoplazij 1. stopnje (CIN1) in 47,1 % vulvarnih intraepitelijskih neoplazij 1. stopnje (Gale in sod., 1994; Clifford in sod., 2005; Potočnik in sod., 2007; Aubin in sod., 2008; Insinga in sod., 2008). Skupaj z visokorizičnima genotipoma HPV-16/-18 sta vključena v štirivalentno in nonavalentno profilaktično cepivo proti HPV (Stanley in sod., 2006; Kiatpongsan in sod., 2012; Garland, 2014).

Papilomavirusi so genetsko izredno heterogeni in povzročajo različne novotvorbe pri ljudeh in živalih. Evolucija papilomavirusov je potekala vzporedno z njihovimi gostitelji. HPV najverjetneje izvirajo iz Afrike, od koder izvira tudi človeška vrsta. Koevolucija HPV in človeka predstavlja pomemben, vendar ne edini dejavnik, ki je pripeljal do nastanka novih različic znotraj genotipov HPV. Le-te so se namreč razvile v času nastajanja poglobitnih

etničnih skupin (Bernard in sod., 2010). Te ugotovitve podpirajo filogenetske raziskave visokorizičnih genotipov HPV-16/-18, ki so pokazale, da različice omenjenih genotipov izkazujejo pripadnost določenim etničnim skupinam oz. so značilne za določena geografska področja (Ho in sod., 1993; Ong in sod., 1993; Bernard in sod., 2006; Smith in sod., 2011). Za razliko od omenjenih visokorizičnih genotipov je celotno nukleotidno zaporedje (genom) genotipov HPV-6/-11 precej ohranjeno; do začetka izvajanja naše raziskave združevanje podtipskih različic v geografsko značilne skupine ni bilo dokazano. Glede na to, da so predhodne filogenetske analize, ki so vključevale podtipske različice HPV-6/-11, temeljile le na posameznih odsekih celotnega nukleotidnega zaporedja, obstaja možnost, da bi s filogenetsko analizo na celotnih nukleotidnih zaporedjih HPV-6/-11 iz celega sveta, to delitev lahko dokazali (Heinzel in sod., 1995; Kocjan in sod., 2009; Maver in sod., 2011; Burk in sod., 2011; Danielewski in sod., 2013; de Matos in sod., 2013; Godinez in sod., 2014).

Raziskave genetske raznolikosti visokorizičnih genotipov HPV (predvsem HPV-16/-18) so pokazale, da obstaja povezava med stopnjo patogenosti podtipskih različic HPV-16/-18 in njihovim geografskim poreklom. Tako so, na primer, okužbe z ne-evropskimi podtipskimi različicami HPV-16 povezane z večjo perzistenco virusa in večjim tveganjem za nastanek raka materničnega vratu kot okužbe z evropskimi različicami (Sichero in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010). Z doktorsko nalogo smo želeli na do sedaj največjem številu HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev, pridobljenih iz različnih geografskih področij sveta, prvič opredeliti svetovno genomsko raznolikost HPV-6/-11.

1.1 NAMEN

Z doktorsko nalogo smo želeli pridobiti do sedaj največje število klinično pomembnih HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev iz celega sveta in z določitvijo delnega nukleotidnega zaporedja (približno 2.800 bp) izbrati najbolj raznolike podtipske različice, katerim bi določili celotno nukleotidno zaporedje (približno 8.000 bp). Celotna nukleotidna zaporedja najbolj raznolikih podtipskih različic HPV-6/-11 na svetovnem nivoju smo želeli uporabiti za naslednje namene:

- Pomembno povečati število celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6/-11, ki so dostopna v genskih bankah.
- Raziskati povezave med genomsko raznolikostjo in geografsko razporeditvijo podtipskih različic HPV-6/-11 iz šestih celin: Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika.
- Dokazati nove genetske linije in podlinije ter nove, še neopisane nukleotidne in aminokislinske zamenjave.
- Dokazati, nukleotidne zamenjave, ki so značilne za specifične genetske linije in podlinije.
- Določiti aminokislinske zamenjave (v veliki plaščni beljakovini L1), ki bi lahko vplivale na učinkovitost štirivalentnega in nonavalentnega cepiva proti HPV.

1.2 HIPOTEZE

V sklopu doktorske disertacije smo želeli potrditi naslednje delovne hipoteze:

- Predpostavljamo, da bomo na velikem številu HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev iz različnih koncev sveta prvič nedvomno dokazali, da podtipske različice HPV-6/-11 niso omejene na določeno geografsko področje, kot je to značilno za nekatere visokorizične genotipe HPV.
- Svetovna genomska raznolikost HPV-6/-11 bo bistveno manjša v primerjavi z genomsko raznolikostjo visokorizičnih genotipov HPV; HPV-6 bo pomembno bolj raznolik kot HPV-11.
- Predpostavljamo, da bomo med vsemi HPV-6/-11-pozitivnimi vzorci, ki jih bomo vključili v raziskavo, z določitvijo nukleotidnih zaporedij E5a, E5b, L1 in LCR, lahko izbrali najbolj raznolike vzorce, ki jim bomo v nadaljevanju določili celotno nukleotidno zaporedje.
- Predpostavljamo, da bomo na osnovi filogenetskih analiz na celotnih nukleotidnih zaporedjih, ugotovili obstoj novih genetskih linij in podlinij.
- Predpostavljamo, da bomo s primerjavo novoopisanih nukleotidnih zamenjav v celotnih nukleotidnih zaporedjih ugotovili, katere nukleotidne zamenjave so značilne za specifične genetske linije in podlinije.
- Predpostavljamo, da bomo v nukleotidnih zaporedjih gena L1 opisali aminokislinske zamenjave, ki bi lahko vplivale na učinkovitost štirivalentnega in nonavalentnega cepiva proti HPV.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Papilomavirusi so DNA virusi in jih taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*. Papilomavirusi so izredno heterogena skupina virusov, ki okužujejo človeka in različne živalske vrste vretenčarjev ter so vrstno-specifični.

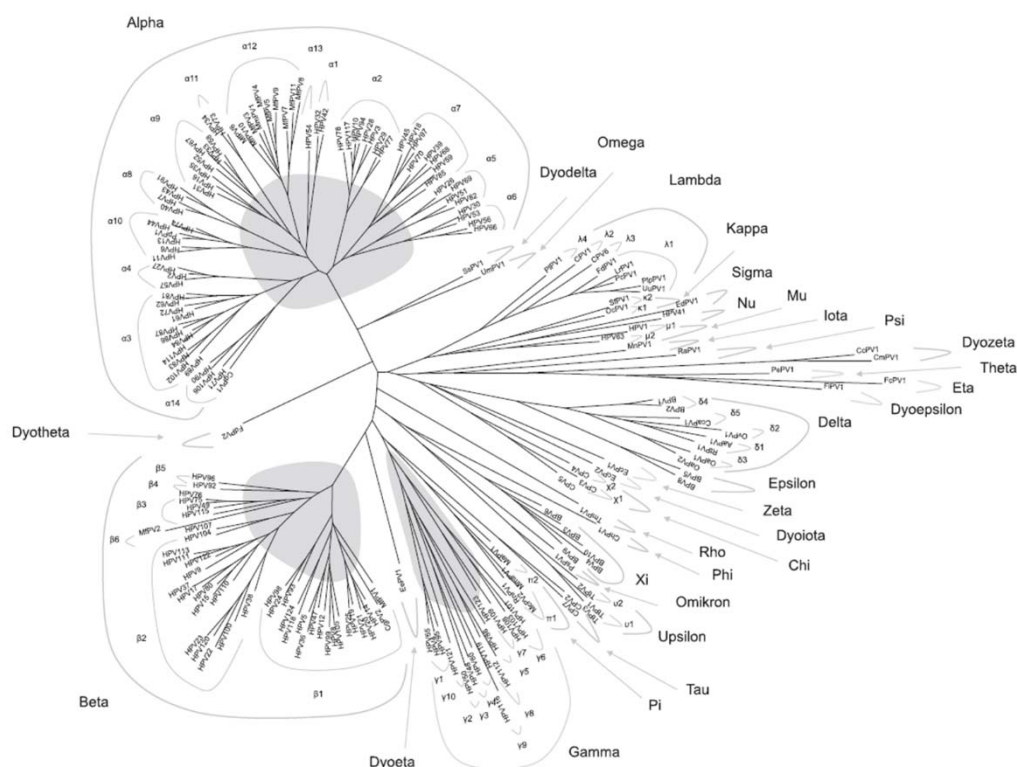
Kožne in genitalne bradavice so poznali že Stari Rimljani in Grki (Bafverstedt, 1967). Zaradi nenadnega pojavljanja in izginjanja so pojav bradavic povezovali z magijo in spolno promiskuiteto (zur Hausen 2009; Cubie, 2013).

Prvi nedvoumen dokaz, da je za pojav bradavic kriv virusni povzročitelj, je objavil italijanski znanstvenik Ciuffo, ko je po intradermalni inokulaciji svojega prsta z brezceličnim filtratom iz kožne bradavice poročal o prenosu bolezni (Ciuffo, 1907). Številnim podobnim opazovanjem je leta 1949 sledil prvi dokaz virusnih delcev v kožni bradavici z elektronskim mikroskopom (Strauss in sod., 1949).

Prvi papilomavirusi so bili opredeljeni pred približno 40 leti (Orth in sod., 1977; Gissmann in sod., 1977), kamor segajo tudi prve raziskave o človeških papilomavirusih v povezavi z razvojem raka materničnega vratu (zur Hausen in sod., 1974a; zur Hausen in sod., 1974b) in raka ustnega predela žrela (Löning in sod., 1985; de Villiers in sod., 1985). Za odkritje vzročne povezave med HPV in rakom materničnega vratu je leta 2008 nemški znanstvenik Harald zur Hausen prejel Nobelovo nagrado za medicino in fiziologijo.

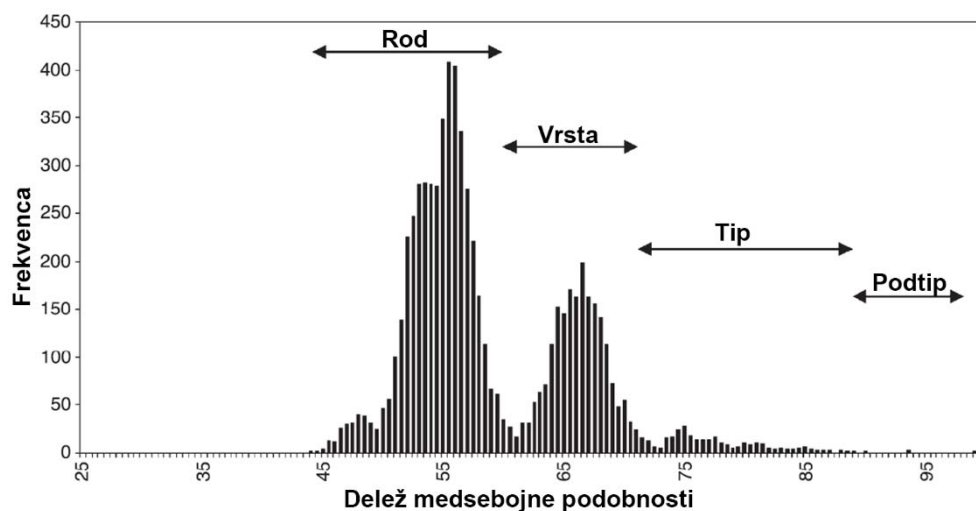
2.2 KLASIFIKACIJA PAPILOMAVIRUSOV

Papilomaviruse uvrščamo v družino *Papillomaviridae*. Na podlagi raznolikosti oz. skladnosti celotnih nukleotidnih zaporedij gena L1 in topologije filogenetskih dreves, ki izhajajo iz poravnave omenjenega nukleotidnega zaporedja, delimo papilomaviruse v rodove, vrste, genotipe, podtipe in podtipske različice. Trenutno je opisanih 38 rodov in več kot 240 genotipov papilomavirusov. Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi nukleotidnih zaporedij gena L1 189 genotipov papilomavirusov, je prikazano na sliki 1 (Bernard, 2013a). Posamezni rodovi in vrste so razvrščeni v večje in manjše filogenetske veje.



Slika 1: Filogenetski prikaz sorodnosti 189 papilomavirusov (Bernard, 2013a: 3). Z grškimi črkami so označeni rodovi papilomavirusov. S številkami so označene vrste papilomavirusov
Figure 1: Phylogeny of 189 papillomavirus genotypes (Bernard, 2013a: 3). Greek letters refer to papillomavirus genera, while numbers refer to papillomavirus species

Na podlagi podobnosti celotnega nukleotidnega zaporedja gena L1 uvrščamo v isti rod tiste viruse, ki izkazujejo več kot 40 % raznolikost, in v isto vrsto viruse, ki izkazujejo raznolikost med 30 % in 40 % (Slika 2).



Slika 2: Frekvenčna razporeditev deležev medsebojnih podobnosti nukleotidnih zaporedij gena L1 118 papilomavirusov (de Villiers in sod., 2004: 20)
Figure 2: Frequency distribution of pairwise identity percentages from L1 nucleotide sequence comparison of 118 papillomavirus genotypes (de Villiers et al., 2004: 20)

Poznamo 16 rodov papilomavirusov, ki jih označujemo z grškimi črkami. Za človeka je pomembnih pet rodov: *Alphapapillomavirus* (alfa), *Betapapillomavirus* (beta), *Gammapapillomavirus* (gama), *Mupapillomavirus* (mu) in *Nupapillomavirus* (nu). Osnovno taksonomsko enoto v klasifikaciji papilomavirusov predstavljajo genotipi (de Villiers in sod., 2004; Bernard in sod., 2013a). Kot nov genotip HPV opredelimo vsak izolat, ki se v nukleotidnem zaporedju gena L1, od uradno priznanega, najbolj sorodnega genotipa HPV, razlikuje v več kot 10 %. Kadar je odstopanje od zaporedja istega genotipa HPV med 2 % in 10 %, govorimo o novem podtipu HPV. Odkrivanje novih genotipov HPV spremljajo v Referenčnem centru za HPV: International Human papillomavirus Reference Center, Karolinska Institutet, v Stockholmu na Švedskem. Do aprila 2013 je bilo dokončno opredeljenih že več kot 170 različnih genotipov HPV (de Villiers, 2013).

Vsak genotip HPV je v kliničnih vzorcih zastopan v majhnem številu (do 100) zelo sorodnih različic, ki se v izbranih genomskih področjih med seboj razlikujejo v točkastih mutacijah in v nekodirajočem področju LCR (angl. *long control region*) tudi v nukleotidnih vstavkih oz. insercijah (angl. *insertion*), ali izpadih oz. delecijah (angl. *deletion*) (Ho in sod., 1991; Yamada in sod., 1995; Kurvinen in sod., 2000; Bernard, 2013a). Omenjene različice znotraj taksonomsko opredeljenega genotipa HPV imenujemo podtipske različice HPV. Kot

podtipsko različico HPV opredelimo vsak izolat HPV, pri katerem je odstopanje od nukleotidnega zaporedja referenčnega izolata istega genotipa v genu L1 manjše od 2 %, ali v zaporedju LCR manjše od 5 % (de Villiers in sod., 2004; Bernard, 2013a).

2.3 RAZVRŠČANJE GENOTIPOV HPV GLEDE NA TKIVNI TROPIZEM

HPV povzročajo produktivne in latentne okužbe kože in sluznic. Glede na njihov tropizem za določeno vrsto epitelija jih delimo v tri glavne skupine: (1) kožni genotipi HPV, ki okužujejo predvsem poroženevajoč večskladen ploščatocelični epitelij, (2) sluznični genotipi HPV, ki okužujejo predvsem ploščatocelični epitelij anogenitalnega predela, (3) genotipi HPV, povezani z redko dedno boleznijo, bradavičasto epidermodisplazijo (*epidermodysplasia verruciformis*) (Cubie, 2013).

Za posamezne rodove HPV je značilno, da izkazujejo dokaj značilen tropizem za določeno vrsto epitelija. Na primer, HPV iz rodu alfa okužujejo predvsem ploščatocelični epitel sluznic anogenitalnega področja in področja glave in vratu, medtem ko HPV iz rodov beta, gama, mu in nu okužujejo predvsem ploščatocelični epitel kože. Nekateri genotipi HPV iz rodov beta in gama izkazujejo dvojni oz. kožno-sluznični tropizem (de Villiers in sod., 2004; Cubie, 2013; de Villiers, 2013; Poljak in sod., 2014). Bradavičasto epidermodisplazijo povzročajo genotipi HPV iz rodu beta. Bolezen je redka in se razvije najverjetneje kot posledica dolgotrajne imunske pomanjkljivosti in posledične aktivacije virusa (Cubie, 2013).

HPV iz rodu alfa so medicinsko najbolj pomembni, saj povzročajo številne benigne in maligne novotvorbe ploščatoceličnega epitelija kože in sluznic. Po najnovejši, trenutno veljavni klasifikaciji bioloških rakotvornih agensov Mednarodne agencije za raziskave raka (angl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) delimo alfa HPV v štiri skupine: (1) genotipi z rakotvornim potencialom, (2) verjetno rakotvorni genotipi, (3) genotipi z nejasnim rakotvornim potencialom in (4) genotipi brez rakotvornega potenciala (Bouvard in sod., 2009) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Klasifikacija genotipov HPV iz rodu alfa glede na rakotvorni potencial (Bouvard in sod., 2009: 322)

Table 1: Classification of alpha HPV genotypes according to their cancerogenic potential (Bouvard et al., 2009: 322)

Skupina po IARC	Rakotvorni potencial	Genotip HPV
1	rakotvorni genotipi	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
2A	verjetno rakotvorni genotipi	68
2B	genotipi z nejasnim rakotvornim potencialom	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
3	genotipi brez rakotvornega potenciala	6,11

Legenda: IARC: Mednarodna agencija za raziskave raka (angl. *International Agency for Research on Cancer*)

Visokorizične genotipe HPV (najpogosteje HPV-16) so dokazali v več kot 99 % primerov raka materničnega vratu, 70 % do 90 % raka zadnjika in nožnice, 40 % raka vulve, 47 % raka penisa ter 25 % do 30 % raka ustnega dela žrela (Kreimer in sod., 2005; Giuliano in sod., 2008). Nizkorizični genotipi HPV povzročajo benigne spremembe ploščatoceličnega epitelija. Najpomembnejša nizkorizična genotipa HPV sta HPV-6/-11 in sta odgovorna za nastanek več kot 90 % primerov anogenitalnih bradavic in papilomov grla (Gale in sod., 1994; Clifford in sod., 2005; Potočnik in sod., 2007; Aubin in sod., 2008; Insinga in sod., 2008).

2.4 EVOLUCIJA PAPILOMAVIRUSOV

Papilomavirusi so vrstno specifični, kar pomeni, da lahko okužujejo le eno vrsto gostitelja in da prenos papilomavirusov med različnimi vrstami gostiteljev ni možen. Iz omenjenega dejstva se je izoblikovala teorija o sočasni evoluciji papilomavirusov in njihovih gostiteljev - koevoluciji (Bernard in sod., 2006; Van Doorslaer, 2013). Razvejitev filogenetskega drevesa papilomavirusov podpira teorijo koevolucije: (1) glavna filogenetska veja rodu alfa združuje tako klinično najpomembnejše genotipe HPV kot tudi večino znanih papilomavirusov primatov in opic, iz česar lahko sklepamo, da je bil skupni prednik človeka in primatov tudi primarni gostitelj HPV in živalskih papilomavirusov; (2) rod *Deltapapillomavirus* združuje večino papilomavirusov, ki okužujejo parkljarje, medtem ko rod *Lambdapapillomavirus* združuje papilomaviruse, ki povzročajo okužbe pri zvereh; (3)

tri filogenetske veje, ki predstavljajo rodove *Etapapillomavirus*, *Thetapapillomavirus* in *Dyoepsilonpapillomavirus*, združujejo ptičje papilomaviruse, ki okužujejo med seboj oddaljene vrste ptičev. Filogenetske veje ptičjih papilomavirusov se nahajajo v bližini korenine filogenetskega drevesa (de Villiers in sod., 2004; Bernard, 2013a). Kljub naštetim dejstvom obstajajo v filogenetskem drevesu papilomavirusov primeri, ki kršijo pogoje stroge koevolucije z njihovimi gostitelji; na primer: opičji papilomavirusi bi se v primeru stroge koevolucije z gostitelji morali uvrstiti v ločeno skupino in ne med človeške papilomaviruse; razvejitev filogenetskega drevesa papilomavirusnih gostiteljev bi se morala popolnoma ujemati s filogenetsko razvejitvijo papilomavirusov (Bravo in Alonso, 2007; Gottschling in sod., 2007; Shah in sod., 2010; Gottschling in sod., 2011). Številne filogenetske raziskave, ki so primerjale evolucijo papilomavirusov in njihovih gostiteljev so nakazale obstoj in vpliv dodatnih, alternativnih dogodkov, ki jih moramo upoštevati, ko opisujemo evolucijo papilomavirusov. Eden izmed takih dogodkov je na primer nastanek novih ekoloških niš (prisotnost/odsotnost dlake in razvoj žlez znojnic pri gostitelju), na katere so se morali papilomavirusi tekom evolucije prilagoditi (ko-speciacija) (Shah in sod., 2010; Gottschling in sod., 2011; Van Doorslaer, 2013).

Znotraj posameznih genotipov HPV obstajajo podtipske različice, ki se med seboj razlikujejo v točkastih mutacijah, delecijah in insercijah. Te mutacije so se tekom milijon let trajajoče evolucije akumulirale, fiksirale in vodile v nastanek genetskih linij. Postopno akumuliranje teh mutacij je pripeljalo do povečanega števila linijsko-specifičnih razlik in končno do virusne speciacije oz. nastanka genotipov. Podtipske različice genotipov HPV, ki jih lahko dokažemo z molekularnimi metodami, so se razvile v času nastajanja poglavitnih etničnih skupin, ko je moderni človek pred približno 50.000 leti zapustil Afriko, (Bernard in sod., 2010; Bernard, 2013a), in izkazujejo pripadnost določenim etničnim skupinam oz. so značilne za določena geografska področja. Te ugotovitve podpirajo filogenetske raziskave visokorizičnih genotipov HPV-16/-18, ki so pokazale, da podtipske različice omenjenih genotipov izkazujejo pripadnost določenim etničnim skupinam oz. so značilne za določena geografska področja; različice HPV-16 delimo na evropske, azijske, afriške in azijsko-ameriške (Ho in sod., 1993; Ong in sod., 1993, Bernard in sod., 2006; Smith in sod., 2011). Kljub temu da so povezave med podtipskimi različicami HPV-16/-18 in geografskim izvorom in/ali posameznimi etničnimi skupinami dobro podprte, ostajajo geografske in etnološke povezave med različicami drugih genotipov HPV slabo raziskane (Burk in sod.,

2013). Raziskave, ki so opredeljevale genetsko raznolikost podtipskih različic HPV-6/-11 (Heinzel in sod., 1995; Burk in sod., 2011), HPV-16/-18/-31/-35 (Calleja-Macias in sod., 2004), HPV-53/-56/-66 (Prado in sod., 2005), HPV-52/-58 (Chang in sod., 2011), HPV-58 (Chan in sod., 2013), HPV-33 (Chen in sod., 2014a) in HPV-45 (Chen in sod., 2014b), so potrdile, da posamezni genotipi HPV tvorijo taksonomsko ločene skupine ter da nekateri od omenjenih genotipov obstajajo v obliki evropskih, afriških in azijskih različic, kljub temu pa povezava med različicami teh genotipov in etničnimi skupinami ni tako močna kot v primerih HPV-16/-18.

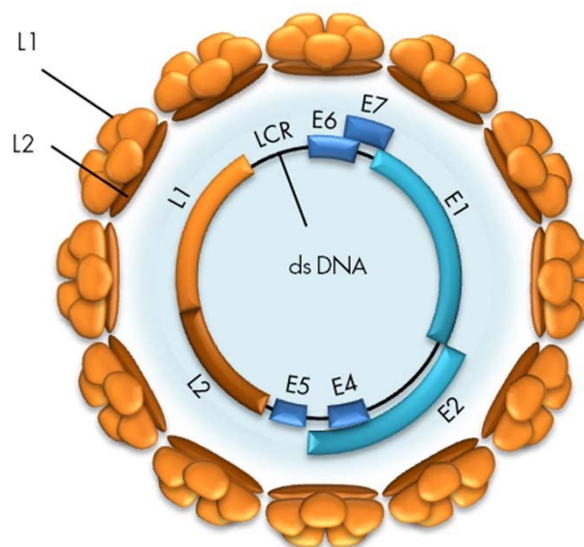
2.5 ZGRADBA HPV

HPV so približno 55 nm veliki virusi brez ovojnice, z dvojnovijačno DNA. Virusno sredico, ki obdaja virusno DNA, sestavlja 72 morfoloških enot (kapsomer) in je ikozaedrično somerna. Kapsomero sestavlja pet velikih plaščnih beljakovin L1 (57 kDa) in ena mala plaščna beljakovina L2 (78 kDa) (Slika 3) (Doorbar in Gallimore, 1987; Modis in sod., 2002; Buck in sod., 2013).

2.5.1 Struktura genoma

Genom HPV predstavlja krožna, zaprta, dvojnovijačna molekula DNA, velikosti 7.500-8.000 bp in se nahaja v virusni sredici. DNA HPV delimo na tri glavna področja: (1) zgodnje področje E (angl. *early*), ki pokriva približno 50 % virusnega genoma, (2) pozno področje L (angl. *late*), ki pokriva približno 40 % virusnega genoma in (3) nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*), ki pokriva približno 10 % virusnega genoma (Zheng in Baker, 2006) (Slika 3). Zgodnje in pozno področje sestavlja do 10 odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*, ORF) oz. genov. Večina do sedaj opredeljenih genotipov HPV nosi zapise za najmanj šest genov (ORF) v zgodnjem kodirajočem področju: E1, E2, E4, E5, E6 in E7 ter za dva gena v poznem kodirajočem področju: L1 in L2. Zgodnje kodirajoče področje genotipov HPV-6/-11 vsebuje zapisa za dve različni beljakovini E5: E5a in E5b. Večina HPV iz rodov beta in gama nima zapisa za beljakovino E5. Nekodirajoče področje LCR se nahaja med genoma L1 in E6 (Zheng in Baker, 2006; Van Doorslaer, 2013).

Zgodnje kodirajoče področje E vsebuje zapise za beljakovine, ki sodelujejo pri prepisovanju in podvajanju virusnega genoma (E1 in E2), ter gene za zapis beljakovin, ki sodelujejo pri preobrazbi okuženih celic (E4, E5, E6 in E7). Pozno kodirajoče področje L vsebuje zapise za dve strukturalni beljakovini kapside (plaščni beljakovini) (L1 in L2) (de Villiers in sod., 2004; Zheng in Baker, 2006). Nekodirajoče področje LCR je zaporedje DNA, ki je pomembno za uravnavanje virusnega razmnoževanja in prepisovanja virusnih genov. LCR vsebuje na 5'-koncu terminacijski kodon gena L1, osrednji del LCR predstavljajo ojačevalna (angl. *enhancer*) in utiševalna zaporedja (angl. *silencer*), kjer se nahajajo tudi vezavna mesta za dejavnike prepisovanja, mesto začetka podvojevanja virusnega genoma: *ori* (angl. *origin of replication*) ter na 3'-koncu promotor gena E6 (Bernard, 2013b). Vloga ostalih, krajših nekodirajočih področij (zavzemajo manj kot 1 % virusnega genoma), ki se pri nekaterih HPV (npr. HPV-6/-11) nahajajo med geni E7 in E1 (NCR1), E2 in E5 (NCR2) ter E5 in L2 (NCR3), še ni pojasnjena.



Slika 3: Struktura virusa HPV in organizacija genoma (Kocjan in Poljak, 2011: 43)
 Figure 3: HPV structure and genome organization (Kocjan and Poljak, 2011: 43)

2.5.2 Vloga virusnih beljakovin

Beljakovini E1 in E2 imata ključno vlogo pri podvojevanju virusne DNA in virusnem razmnoževanju. Beljakovina E1 je od ATP-odvisna helikaza in je edini encim, ki ga kodira HPV genom. E1 se veže na mesto *ori* v LCR, odvijje dvojnovijačno DNA in skupaj z

beljakovino E2 ter ostalimi celičnimi dejavniki podvojevanja sodeluje pri začetku podvojevanja virusne DNA (Ustav in Stenlund, 1991; Bergvall in sod., 2013).

Beljakovina E2 je glavni regulator prepisovanja genov, sodeluje tudi pri podvojevanju virusnega genoma in pakiranju virusne DNA v novonastale virusne kapside (Chin in sod., 1988; Zhao in sod., 2000; McBride, 2013). Veže se na vezavna mesta v področju LCR, pri čemer je njena vezava nujna za vezavo beljakovine E1 na mesto *ori*, kar omogoča začetek virusnega podvojevanja (Sanders in Stenlund, 2000). E2 je nujna tudi za pravilno segregacijo virusne DNA med celično delitvijo (Bastien in McBride, 2000). Njena koncentracija vpliva na izražanje genov E6 in E7, saj v nizkih koncentracijah njuno izražanje spodbuja, medtem ko v visokih koncentracijah njuno izražanje zavira. Mutacije v področju E2 ali integracija virusnega genoma v gostiteljev genom povzroči prekinitev tega gena in s tem neuravnvano izražanje genov E6 in E7, kar predstavlja pomemben dogodek pri maligni preobrazbi celic, okuženih z visokorizičnimi HPV (Desaintes in sod., 1997; Dowhanick in sod., 1995; Hwang in sod., 1993).

Zapis za beljakovino E4 se nahaja znotraj zapisa za beljakovino E2. Vloga beljakovine E4 še ni povsem pojasnjena. Raziskave so pokazale, da v povezavi z beljakovino E2 sodeluje pri podvojevanju DNA, pri sestavljanju virusnih delcev in povzroči razpad celičnega citoskeleta, s čimer olajša izstopanje virusnih delcev iz okužene celice (Davy in sod., 2009; Bryan in Brown, 2001; Doorbar, 2013).

Beljakovini E5 so do sedaj pripisali več bioloških vlog, čeprav enotna teorija o aktivnosti oz. vlogi beljakovine ni poznana. Med pripisanimi biološkimi vlogami je najbolj raziskana sposobnost preobrazbe celic, in sicer v *in vitro* sistemih (Nath in sod., 2006; DiMaio in Petti, 2013) ter v transgenih miših po okužbi z visokorizičnimi HPV (Genther Williams in sod., 2005). Beljakovina E5 najverjetneje sodeluje v začetnih stopnjah onkogeneze (Genther Williams in sod., 2005; Schiffman in sod., 2005). Glavna biološka značilnost beljakovine E5 je sposobnost uravnavanja celičnega prenosa membranskih beljakovin, s čimer povzroča spremembe v količini in aktivnosti različnih receptorskih beljakovin na površini okužene celice. Na ta način spodbuja celično proliferacijo. Spodbuja lahko receptorje celičnih rastnih dejavnikov (npr. epidermalnega rastnega faktorja; angl. *epidermal growth factor*, EGF). E5 lahko uravnava tudi molekule poglobitnega histokompatibilnega kompleksa razreda I, s čimer omogoča virusu izmikanje imunskemu odzivu gostitelja (Ashrafi in sod., 2005;

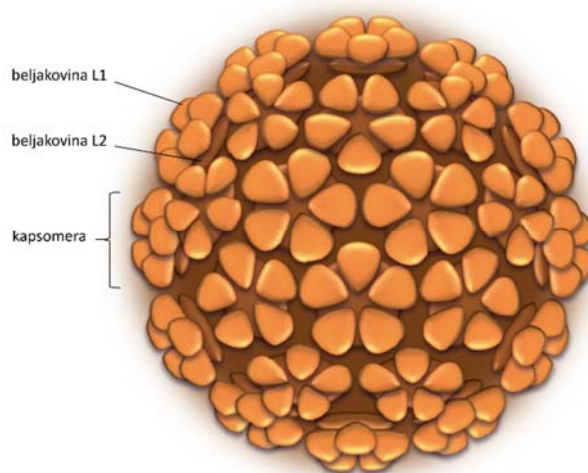
Ashrafi in sod., 2006). Beljakovine E5 lahko tudi spodbujajo angiogenezo (Kim in sod., 2006) in zavirajo celično apoptozo (Kabsch in Alonso, 2002; Kabsch in sod., 2004).

Virusni beljakovini E6 in E7 sta glavni onkogeni beljakovini visokorizičnih genotipov HPV in vplivata na številne celične procese, ki vodijo do maligne preobrazbe okuženih celic. Med najpomembnejšimi je spodbujanje in vzdrževanje celične proliferacije, zaviranje delovanja zaščitnih celičnih tumor-zavirajočih beljakovin (npr. p53 in pRb) in sprožitev celične nesmrtnosti (Kocjan in Poljak, 2011). Z vezavo beljakovine E6 na p53 in beljakovine E7 na pRb (angl. *retinoblastoma protein*) se zavre njuno normalno delovanje. Beljakovini p53 in pRb imata zaščitno vlogo in zavirata delitev celice, kadar pride do poškodb celične DNA (zur Hausen, 1996; Steenbergen in sod., 2005). V kolikor je delovanje p53 in pRb omejeno, je celična delitev nenadzorovana, kar vodi do kopičenja nadaljnjih mutacij in rakave preobrazbe celic (Longworth in Laimins, 2004; Steenbergen in sod., 2005).

Beljakovini L1 in L2 sta strukturni in imunogeni beljakovini, ki tvorita virusno kapsido. Beljakovina L1 se veže s celičnimi receptorji in je ključna za vstop virusa v celico (Buck in sod., 2013). Beljakovina L2 sodeluje pri vstopu virusa v celico, pomaga pri pobegu virusa iz endosoma (Richards in sod., 2006; Wang in Roden, 2013) ter pri potovanju virusa proti celičnemu jedru in virusni enkapsidaciji (Day in sod., 1998; Florin in sod., 2006). Beljakovina L1 ima sposobnost spontanega samo-sestavljanja v virusom-podobne delce (angl., *virus-like particles*, VLPs), ki so imunogeni in lahko v okuženem gostitelju izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki so specifična za posamezen genotip HPV (Kirnbauer in sod., 1992; Rose in sod., 1993; Pastrana in sod., 2001; Bishop in sod., 2007). Ugotovitev, da se lahko beljakovina L1 sama sestavi v VLP-je, ki so morfološko in antigensko skoraj identični naravnim virusnim delcem, je pripeljala do razvoja in proizvodnje rekombinantnih beljakovin L1 (ki se same sestavijo v VLP) in so glavna komponenta trenutnih cepiv proti HPV: bivalentnega cepiva proti HPV-16/-18 (Cervarix[®], ki ga proizvaja GlaxoSmithKline, Biologicals, Rixensart, Belgija), štirivalentnega cepiva proti HPV-16/-18/-6/-11 (Gardasil[®], ki ga proizvaja Merck and Co. Inc., West Point, Pensilvanija, ZDA) in novodobnih cepiv proti HPV v razvoju (angl. *second-generation vaccines*) (Stanley in sod., 2006; Kiatpongsan in sod., 2012). Beljakovina L2 ima manjši imunogeni potencial kot L1 in spodbuja nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki ščitijo proti širokemu spektru genotipov HPV (Gambhira in sod., 2007).

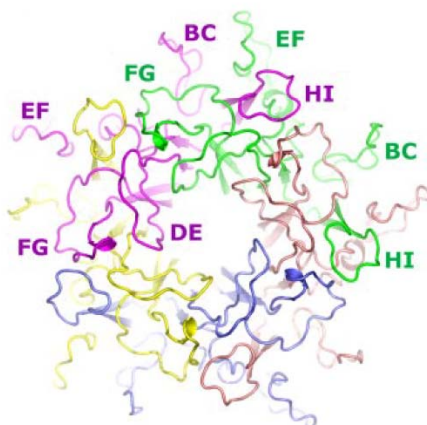
2.5.3 Beljakovina L1

Za razumevanje protitelesnega imunskega odziva na okužbe s HPV je nujno poznavanje molekularne strukture virusne sredice HPV. Kot že omenjeno, ikozaedrično sredico oz. kapsido HPV sestavlja 72 morfoloških enot oz. kapsomer (72 pentamerov L1) in za približno tridesetino manjše število beljakovin L2, ki se nahajajo v notranjosti virusne sredice (Slika 4) (Stanley in sod., 2006; Buck in sod., 2013).



Slika 4: Virusna sredica človeškega papilomavirusa (Kocjan in Poljak, 2011: 43)
Figure 4: The viral capsid of human papillomavirus (Kocjan and Poljak, 2011: 43)

Prikaz tridimenzionalne kristalne strukture posameznih kapsomer s pomočjo računalniških programov je omogočil podroben vpogled v molekularno strukturo površinskih epitopov, področij, ki so ključna za vezavo nevtralizirajočih, tipsko-specifičnih protiteles proti HPV. Epitopi se nahajajo na zunanji površini kapsomer, v obliki petih aminokislinskih zank (angl., *loops*), dolgih 10 do 30 aminokislilin in jih imenujemo površinske zanke BC, DE, EF, FG in HI (Stanley in sod., 2006; Bishop in sod., 2007) (Slika 5).



Slika 5: Kristalna struktura pentamera L1 virusa HPV-16. Monomerne enote L1 so obarvane z različnimi barvami. Označen je položaj površinskih zank: BC, DE, EF, FG in HI (Bishop in sod., 2007: 31805)
 Figure 5: The crystal structure of HPV-16 L1 pentamer. Each monomer is shown in different color. Surface loops: BC, DE, EF, FG and HI are shown (Bishop et al., 2007: 31805)

Prepoznavna mesta za vezavo tipsko-specifičnih protiteles proti HPV so odkrili tudi v približno 100 aminokislinski dolgem C-terminalnem koncu beljakovine L1 (Chen in sod., 2000; Modis in sod., 2002; Carter in sod., 2003; Stanley in sod., 2006; Orozco in sod., 2005; Bishop in sod., 2007).

Raziskave imunogenih epitopov genotipa HPV-6 so pokazale, da protitelesa s HPV-6 nedavno okuženih bolnic ne prepoznajo enega samega imunogenega epitopa in da protitelesa različnih bolnic prepoznajo različne površinske zanke v L1. Pokazali so tudi, da se vzorec prepoznavanja določenih površinskih zank s strani protiteles ne spremeni tudi po devetih letih po prvem seropozitivnem testu. V primeru HPV-11, se protitelesa, ki nastanejo po naravni okužbi s HPV-11, običajno vežejo na imunogene epitope, ki se nahajajo v C-terminalnem delu beljakovine L1 (Wang in sod., 2003). Glede na to, da protitelesa prepoznajo različne površinske zanke in niso omejena na eno določeno prepoznavno mesto, rezultati teh raziskav nakazujejo, da je možnost razvoja virusnih različic HPV, na katere cepiva proti HPV ne bi več vplivala (angl. *vaccine escape variants*), najverjetneje majhna (Orozco in sod., 2005).

Štirivalentno cepivo proti HPV, ki je trenutno v uporabi, je bilo odobreno v času, ko je bila genomska raznolikost genotipov HPV-6/-11 slabo raziskana. Trenutno so v teku klinične raziskave nonavalentnega cepiva proti HPV, v katerega sta prav tako vključena genotipa HPV-6/-11 (Kiatpongson in sod., 2012). Kljub temu da so v nedavni raziskavi Ahmed in

sodelavci (2013) pokazali, da je svetovna genetska raznolikost gena L1 genotipov HPV-6/-11 pomembno manjša v primerjavi z nekaterimi visokorizičnimi predstavniki HPV, je njihova raziskava temeljila na relativno majhnem številu HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev (136 vzorcev HPV-6 in 103 vzorci HPV-11), med katerimi je bila večina različic L1 iz Evrope (94 %) in ni bilo različic gena L1 iz afriške celine (Ahmed in sod., 2013).

2.6 NARAVNI POTEK OKUŽBE S HPV

2.6.1 Primarna okužba epidermisa

Tarčne celice pomnoževanja HPV so bazalne celice večvrstnega ploščatoceličnega epitelija, do katerih virus po navadi dostopa skozi poškodovani epitel kože ali sluznic. HPV lahko do tarčnih celic dostopajo tudi zaradi naravno bolj dostopnega bazalnega epitelija, kot je na primer baza lasnih mešičkov ali stičišče med visokoprizmatskim in ploščatoceličnim epitelijem (transformacijska cona), ki predstavlja najobčutljivejši predel za razvoj predrakavih sprememb (Doorbar, 2007; Schiller in sod., 2010). Virusi HPV se s plaščno beljakovino L1 vežejo na celične receptorje: heparan-sulfatne proteoglikane, kar sproži konformacijsko spremembo v virusni kapsidi in vodi do cepitve beljakovine L2 s celičnim furinom ali sorodnim encimom, proprotein konvertazo. Cepitev s furinom sproži izpostavitve vezavnega mesta na L1, s katerim se virus veže na drug, še neopredeljen celični receptor. Ti dogodki sprožijo endocitozo, ki je po navadi s klatrinom-posredovana endocitoza (npr. pri HPV-16), vendar se lahko razlikuje od genotipa do genotipa (npr. HPV-31 vstopa v celico s kaveotskim endocitotskim sistemom, ki je neodvisen od klatrina). Tekom internalizacije pride v poznih endosomih do razgraditve virusnih delcev in pobega virusne DNA iz endosoma, pri čemer sodeluje beljakovina L2. S pomočjo mikrotubulov se virusna DNA, skupaj z beljakovino L2, prenese v jedro okužene bazalne celice. V jedru okužene celice se virusna DNA nahaja izključno v zunajkromosomski obliki krožnih delcev (episomih). Po okužbi bazalnih celic sledi omejeno podvojevanje genoma HPV, kar poveča število kopij na približno od 100 do 200 kopij na celico. Nadaljnje podvojevanje virusnega genoma in virusno razmnoževanje je natančno uravnano in tesno povezano s celičnim ciklom gostiteljske celice (Kocjan in Poljak, 2011; Doorbar, 2006; Doorbar, 2007; Doorbar in sod., 2012).

2.6.2 Produktivna okužba

Produktivna virusna okužba je okužba, v kateri virus uspešno zaključi svoj življenjski krog in je značilna za nizkorizične in visokorizične genotipe HPV. Posledica produktivne okužbe je nastanek benignih bradavic ali intraepitelijske neoplazije 1. stopnje, ki iz svoje površine sproščajo velike količine infektivnih virusnih delcev. Izražanje virusnih beljakovin tekom produktivne okužbe je natančno uravnano in sovпада z dozorevanjem in diferenciacijo epitelnih celic. Po začetni okužbi bazalnih celic je sinteza virusnih beljakovin omejena. V večjih količinah se izražata onkogeni beljakovini E6 in E7, katerih raven narašča zaradi nizke koncentracije beljakovine E2, ki sicer v visokih koncentracijah zavira prepisovanje genov za E6 in E7. Bazalne celice, ki niso okužene s HPV, tekom naravnega življenjskega celičnega cikla vstopajo v superbazalne epitelne sloje in po določenem številu delitev izstopijo iz celičnega cikla. Sledi proces terminalne diferenciacije in nastanek zaščitnega keratinskega sloja. S HPV okužene superbazalne celice se delijo večkrat kot običajno, zaradi visokega izražanja onkogenih beljakovin E6, E7 in delno tudi E5. Ko preidejo superbazalne celice v višje sloje epitelija (*stratum spinosum*), se pričneta izražati beljakovini E1 in E2, ki sta potrebni za podvojevanje virusne DNA. Povišana koncentracija beljakovine E2 zavre izražanje virusnih onkogenih beljakovin, kar sproži zaustavitev proliferacije epitelnih celic in omogoča njihovo diferenciacijo in nastanek keratinskega sloja. V nastalih keratinocitih beljakovini E1 in E2 aktivirata celične beljakovine, ki so potrebne za podvojevanje virusne DNA, ki poteka po načinu kotalečega se kroga (angl., *rolling circle*). Zadnja stopnja virusnega življenjskega kroga je sestavljanje virusnih infektivnih delcev. Ko keratinociti vstopijo v zgornje sloje epitelija (*stratum granulosum*), se prične sinteza strukturnih virusnih beljakovin L1 in L2, ki tvorita virusno sredico oz. virusno kapsido. Podvojena virusna DNA se s pomočjo beljakovine E2 vključi v virusno kapsido. Novonastali infektivni virusni delci izstopijo iz celice s pomočjo beljakovine E4. Zaradi pomnoževanja HPV v dokončo diferenciranih epitelnih celicah, celice spremenijo svojo obliko in začnejo postopoma propadati. Opisan citopatski učinek imenujemo koilocitoza, morfološko spremenjene celice pa koilociti (Doorbar, 2006; Doorbar, 2007; Kocjan in Poljak, 2011; Doorbar in sod., 2012).

2.6.3 Nepopolna (abortivna) okužba

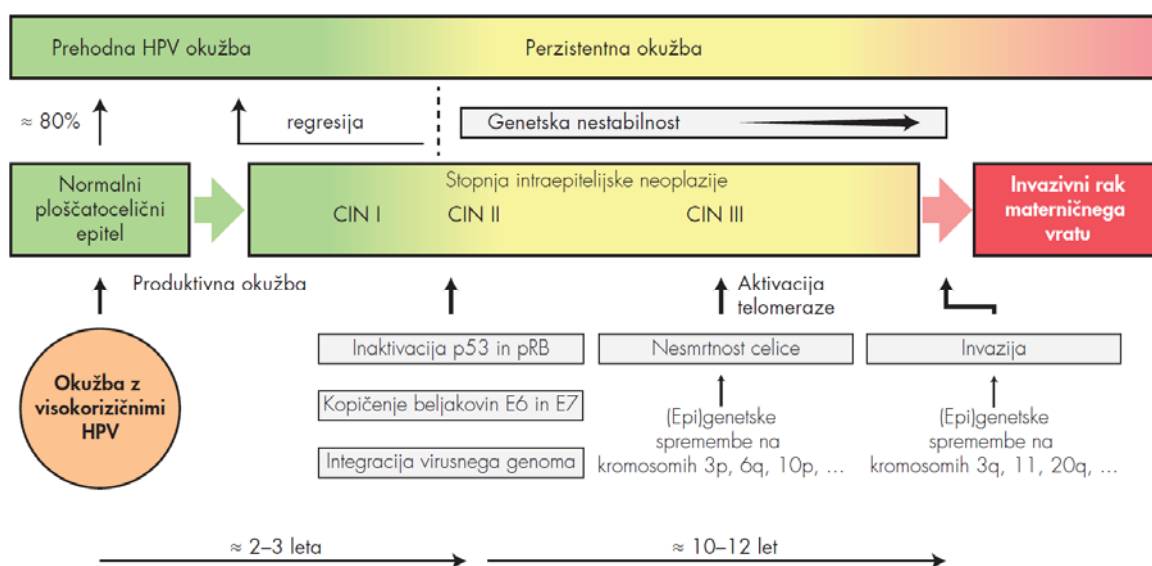
V večini primerov okužb s HPV pride po obdobju aktivnega virusnega pomnoževanja do odstranitve virusa iz gostiteljevih celic, pri čemer ima pomembno vlogo celično-posredovan imunski odziv. Sproščanje infektivnih virusov izzveni in nastale benigne lezije postopoma izginejo. Kadar virus ne zaključi svojega življenjskega kroga, govorimo o nepopolni oz. abortivni okužbi, ki lahko vodi do napredovanja v displazijo visoke stopnje ali celo do nastanka raka. Rak materničnega vratu je najhujša posledica okužbe s HPV. Kljub temu da HPV okužujejo različna mesta epitelijske anogenitalne sluznice (vulva, vagina in penis), se predrakave spremembe najpogosteje razvijejo na področju transformacijske cone, tj. npr. znotraj epitelijske sluznice materničnega vratu ali analnega kanala (Doorbar, 2006; Kocjan in Poljak, 2011).

2.6.4 Okužbe z visokorizičnimi HPV in nastanek raka

Razvoj raka materničnega vratu predstavlja vzorčni model, ki opisuje nastanek malignih novotvorb, povezanih z okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV (Slika 6). Rak materničnega vratu se razvije po različnih stopnjah predrakavih sprememb: cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje (CIN1), 2. stopnje (CIN2) in 3. stopnje (CIN3). Približno 20 % sprememb CIN1 napreduje v CIN2 in od teh 30 % napreduje v CIN3. Približno 30 % CIN3 lahko napreduje in razvije se rak materničnega vratu (Kocjan in Poljak, 2011).

Po dolgotrajni (perzistentni) okužbi bazalnih celic pride do vključevanja virusne DNA v genom gostiteljske celice, pri čemer se virusna DNA vgradi (integrira) v celični genom. Integracija virusne DNA skoraj vedno pomeni prekinitev krožnega virusnega genoma na področju zapisa za beljakovino E2, medtem ko je mesto integracije v celični genom običajno v t.i. krhkih kromosomskih lokusih (angl., *common fragile sites*) (Thorland in sod., 2003; Kocjan in Poljak, 2011). S fizično prekinitvijo gena E2 je onemogočeno uravnavanje izražanja beljakovin E6 in E7, ki se posledično izražata neprekinjeno, kar privede do neomejenega razmnoževanja epitelnih celic. Epitelne celice tako le redko zaključijo proces terminalne diferenciacije, ki je potreben za zaključitev virusnega življenjskega kroga in nastanek novih virusnih delcev. Molekularne interakcije med E6 in p53 ter E7 in pRb privedejo do razgradnje (proteolize) beljakovin p53 in pRb, s pomočjo od ubikvitina

odvisnim sistemom proteaz. Vloga beljakovine p53 je uravnavanje izražanja celičnih beljakovin, ki nadzorujejo prehod celičnega cikla iz faze G1 v fazo S ter sprožitev apoptoze ob nepopravljivi poškodbi celičnega genoma. Beljakovina pRb deluje kot zaviralec družine dejavnikov prepisovanja E2F, ki imajo ključno vlogo pri aktivaciji genov, potrebnih za sintezo DNA. Beljakovina pRb zadržuje celico v fazi G1, dokler niso izpolnjeni vsi pogoji za vstop celice v fazo S. S prekinitvijo normalnega delovanja p53 in pRb se epitelne celice neprekinjeno razmnožujejo, kar vodi do kopičenja sekundarnih mutacij v genomu celice (npr. delecije genov na kromosomih 3p in 6q) in maligne preobrazbe celic (Kocjan in Poljak, 2011, Doorbar in sod., 2012).



Slika 6: Shematski prikaz razvoja raka materničnega vratu (Kocjan in Poljak, 2011: 47)

Figure 6: A schematic presentation of cervical cancer development (Kocjan and Poljak, 2011: 47)

Beljakovini E6 in E7 se lahko vežeta tudi z drugimi celičnimi beljakovinami, ki so odgovorne za nemoteno uravnavanje celičnega razmnoževanja. Proliferacijo epitelnih celic spodbujata tudi s povzročanjem kromosomskih aberacij, z oviranjem celične adhezije, z aktivacijo telomeraz, kar privede do podaljševanja telomer, s spodbujanjem angiogeneze ali z oviranjem interferonskega protivirusnega odziva (Kocjan in Poljak, 2011; Doorbar in sod., 2012).

Na maligno preobrazbo celic, okuženih s HPV, vplivajo tudi drugi dejavniki, npr.: cigaretni dim, UV žarki, obsevanje, dolgotrajna uporaba kontracepcijske zaščite, število spolnih

partnerjev in sočasne spolno prenosljive okužbe (Kocjan in Poljak, 2011; Moscicki in sod., 2012). Povprečni čas, v katerem se pri ženski, okuženi s HPV razvije intraepitelijski karcinom, je približno 7 do 10 let (Moscicki in sod., 2012).

2.6.5 Razlike pri okužbi med visoko- in nizkorizičnimi genotipi HPV

Kljub dejstvu da so tudi nizkorizični genotipi HPV lahko prisotni v predrakavih lezijah, npr. pri rekurentni respiratorni papilomatozi (angl. *recurrent respiratory papillomatosis*, RRP), je večina raziskav na področju raziskovanja patogeneze HPV potekala na visokorizičnih genotipih HPV (Doorbar in sod., 2012). Iz predhodnih raziskav vemo, da je v primerih okužbe z nizkorizičnimi HPV možna tudi občasna integracija HPV genoma v gostiteljsko DNA in da lahko prihaja tudi do podvojitve genomskih področij HPV (Rady in sod., 1998; Yuan in sod., 2012; Huebbers in sod., 2013). Primeri integracije in podvojitve virusnega genoma so redki in tako kot pri okužbah z visokorizičnimi HPV, je dovzetnost za razvoj raka odvisna predvsem od gostiteljeve imunosti in virusne perzistence. Najočitnejše razlike v onkogenem potencialu med visokorizičnimi in nizkorizičnimi genotipi HPV so posledica manjše sposobnosti vezave nizkorizičnih E6 in E7 s celičnimi beljakovinami ter njuna nesposobnost povzročanja kromosomskih aberacij in celične nesmrtnosti (Pim in Banks, 2010).

2.7 KLINIČNA SLIKA IN EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z NIZKORIZIČNIMA GENOTIPOMA HPV-6/-11

Nizkorizični genotipi HPV povzročajo tri osnovne bolezni pri obeh spolih: anogenitalne bradavice, papilome grla in intraepitelijske neoplazije nizke stopnje.

2.7.1 Anogenitalne bradavice

Anogenitalne bradavice so najpogosteje izražena klinična oblika spolno prenosljive okužbe z nizkorizičnimi genotipi HPV (Cubie, 2013). Ocenjujejo, da je v odrasli spolno aktivni populaciji prevalenca simptomatskih anogenitalnih bradavic 1 %, z letno incidenco 0,1 % do 0,2 % (Wiley in sod., 2002; Forman in sod., 2012). Incidenca in prevalenca anogenitalnih bradavic pričneta naraščati v poznih najstniških letih ali po 20. letu starosti (običajno po prvem spolnem kontaktu) in upadati po 50. letu starosti. V večini držav se po 50. letu pojavi drug porast anogenitalnih bradavic, ki je posledica virusne reaktivacije ali nove okužbe s HPV (Kjaer in sod., 2007; Forman in sod., 2012; Cubie, 2013).

Klinično anogenitalne bradavice razvrščamo v tri vrste: klasični ostri kondilomi (lat. *condylomata acuminata*), ploščati kondilomi (lat. *condylomata plana*) in gigantski kondilomi (lat. *condylomata gigantea*, t.i. Buschke-Löwensteinovi kondilomi) (Kocjan in Poljak, 2011).

Anogenitalne bradavice se lahko pojavijo na zunanem spolovilu, v perianalni regiji, lahko pa se pojavijo tudi v nožnici, analnem kanalu, sečnici ali na materničnem vratu. Pri neobrezanih moških nastajajo anogenitalne bradavice predvsem na neporoženevajočem ploščatem epiteliju v prepucijski vreči, pri obrezanih moških pa na telesu penisa, glavici penisa, korenu penisa, perianalno, osramju, modniku, v sečnici ali na analnem področju. Pri ženskah se anogenitalne bradavice razvijejo na velikih in malih sramnih ustnah, nožničnem preddvoru, v nožnici, na materničnem vratu ali perianalno (Cubie, 2013).

Za anogenitalne bradavice je značilen vnovičen zagon bolezni, kar je najverjetneje posledica dolgotrajne okužbe z eno samo podtipsko različico (Fujs Komloš in sod., 2013). Ponovni zagoni bolezni zahtevajo večkratno, dolgotrajno zdravljenje (Trottier in Franco, 2006; Wolf in Davidovici, 2010).

Prevalenca anogenitalnih bradavic se razlikuje glede na starost in spol bolnikov. Po podatkih iz ZDA je bila kumulativna incidenca anogenitalnih bradavic med leti 1999 in 2004, v starostni skupini med 18 in 59 let, 5,6 %. Prevalenca anogenitalnih bradavic je bila pri ženskah najvišja med 25. in 34. letom, pri moških pa med 35. in 44. letom. Prevalenca pri ženskah (7,2 %) je bila nekoliko višja kot pri moških (4 %). (Dinh in sod., 2008). Nedavna presečna raziskava na približno 70.000 ženskah iz Danske, Islandije, Norveške in Švedske je ocenila, da je kumulativna incidenca anogenitalnih bradavic v starostni populaciji med 18.

in 45. letom, 10,6 % (Kjaer in sod., 2007). V Sloveniji je kumulativna incidenca anogenitalnih bradavic v spolno aktivni populaciji (18 do 49 let) pri ženskah 0,3 % in pri moških 0,4 %, čeprav je ta najverjetneje pomembno podcenjena (Klavs in Grgic-Vitek, 2008). V nedavni raziskavi, ki je vključevala do sedaj največje število histološko opredeljenih in prospektivno zbranih tkivnih vzorcev anogenitalnih bradavic in papilomov grla, je bil genotip HPV-11 skoraj tri-krat pogostejši pri moških (16,5 %) kot pri ženskah (6,3 %) z anogenitalnimi bradavicami, medtem ko se razporeditev HPV-6 glede na spol ni statistično razlikovala (Komloš in sod., 2012).

Genotipa HPV-6/-11 povzročata več kot 90 % vseh anogenitalnih bradavic (Potočnik in sod., 2007; Aubin in sod., 2008; Komloš in sod., 2012; Forman in sod., 2012; Petry in sod., 2012). V anogenitalnih bradavicah najdemo kot sočasno okužbo s HPV-6 ali HPV-11 ali kot samostojno okužbo tudi druge genotipe, npr.: HPV-16, HPV-51, HPV-52, HPV-66, HPV-53, HPV-31 in HPV-18 v raziskavi Aubina in sod. (2008) in HPV-42, HPV-44, HPV-90, HPV-91 v raziskavi Petry in sod. (2012). V slovenski raziskavi sta bila v več kot 90 % anogenitalnih bradavic prisotna genotipa HPV-6/-11, ostali odkriti genotipi HPV so bili še HPV-16, HPV-31, HPV-51, HPV-53, HPV-55, HPV-62, HPV-70, HPV-73 in HPV-84 ter HPV-44 in HPV-91 kot edina odkrita genotipa v 2 vzorcih anogenitalnih bradavic (Potočnik in sod., 2007).

Pojavnost anogenitalnih bradavic v zadnjih štirih desetletjih v večini držav narašča (Lacey in sod., 2006; Kjaer in sod., 2007; Forman in sod., 2012). Kljub temu so raziskave o učinkovitosti štirivalentnega cepiva proti HPV pokazale značilen upad anogenitalnih bradavic v Avstraliji, kjer so po uvedbi cepilnega programa (leta 2007) s štirivalentnim cepivom proti HPV zabeležili 77 % upad prevalence anogenitalnih bradavic in več kot 90 % upad v incidenci anogenitalnih bradavic pri heteroseksualnih ženskah in moških, mlajših od 21 let (Ali in sod., 2013; Garland, 2014).

2.7.2 Papilomi grla

Ploščatocelični papilomi grla, znani tudi kot respiratorna papilomatoza, so najbolj pogosta benigna novotvorba grla, ki jo povzročajo nizkorizični genotipi HPV. HPV-6/-11 sta povzročitelja skoraj vseh primerov papilomov grla, v manj kot 5 % primerov sta povzročitelja lahko tudi HPV-16/-18 (Kocjan in Poljak, 2011; Gillison in sod., 2012; Komloš

in sod., 2012). V slovenski raziskavi, ki je primerjala tipsko specifično razporeditev HPV-6/-11 pri bolnikih s papilomi grla in bolnikih z anogenitalnimi bradavicami, je bil genotip HPV-11 statistično pogostejši v papilomih grla v primerjavi z anogenitalnimi bradavicami (28,9 % pri papilomih grla in 12,4 % pri anogenitalnih bradavicah) (Komloš in sod., 2012). Papilomi grla se običajno primarno pojavijo v grlu, vendar so mesta okužbe lahko tudi ustna votlina, požiralnik, traheje, bronhiji in pljučni parenhim. Papilomi grla se razširijo v spodnji respiratorni trakt v približno 17 % primerov, do rakave preobrazbe pride v približno 2 % primerov (Dedo in Yu, 2001; Wiatrak in sod., 2004; Gillison in sod., 2012). Papilomi grla, povzročeni z genotipom HPV-11 ali pojavom v otroški dobi, predstavljajo resnejšo obliko bolezni (Rady in sod., 1998; Carvalho in sod., 2009; Xue in sod., 2010; Yuan in sod., 2013). Papilomi grla so redka bolezen, ki se lahko razvije v otroštvu ali v odrasli dobi. Otroška oblika papilomov grla je najbolj pogosta benigna novotvorba na grlu pri otrocih in se pojavi v 4/100.000 primerih rojstev (Larson in Derkay, 2010). Papilomi grla pri otrocih se običajno razvijejo pred 5. letom starosti in so posledica prenosa HPV z okužene matere na otroka, med porodom ali *in utero* (Cubie, 2013). Tveganje za nastanek papilomov grla pri otrocih, katerih matere so imele anogenitalne bradavice med nosečnostjo, je 200-krat večje (Silverberg in sod., 2003). Incidenca pri odraslih je nekoliko nižja, približno 2/100.000. Pri odraslih bolnikih papilomi grla prevladujejo v moški populaciji, medtem ko v otroški populaciji ni opazne razlike v pojavnosti papilomov grla med spoloma (Abramson in sod., 1987; Gale in sod., 1994; Larson in Derkay, 2010). Razvoj papilomov grla v odrasli dobi je posledica okužbe med orogenitalnim stikom s partnerjem, okuženim s HPV in se običajno pojavi med 20. in 40. letom starosti.

Raziskava na Danskem, ki je zajemala 50 % populacije, je pokazala, da je incidenca papilomov grla 4/100.000 prebivalcev (Lindeberg in Elbrond, 1990). V Sloveniji odkrijemo 8 do 16 primerov papilomov grla na leto, najpogosteje pri otrocih, mlajših od 5 let (Kocjan in Poljak, 2011).

Za papilome grla je značilen vnovičen zagon bolezni, ki je posledica dolgotrajne okužbe z eno samo podtipsko različico HPV-6 ali HPV-11 (Kocjan in sod., 2013). Ponovni zagoni bolezni zahtevajo večkratne kirurške posege. V povprečju prestanejo bolniki v svojem življenju 20 kirurških posegov, hujši primeri zahtevajo operativne posege tudi vsake 3 tedne (Armstrong in sod., 1999; Gillison in sod., 2012).

2.7.3 Cervikalna intraepitelijska neoplazija

Visokorizična genotipa HPV-16/-18 povzročata več kot 70 % vseh primerov raka materničnega vratu na svetu. Glede na padajočo prevalenco v rakah materničnega vratu jima sledijo: HPV-58, HPV-33, HPV-45, HPV-31, HPV-52, HPV-35, HPV-59, HPV-39, HPV-51 in HPV-56 (Li in sod., 2011). V novejši raziskavi, ki je primerjala približno 36.000 vzorcev raka materničnega vratu in 33.000 HPV-pozitivnih brisov materničnega vratu z normalno citologijo, so HPV-16, HPV-18 in HPV-45 opredelili kot tri najpogostejše povzročitelje raka materničnega vratu na svetu (Guan in sod., 2012). Nizkorizični genotipi HPV so odgovorni za nastanek določenega deleža CIN1; HPV-6/-11 skupno povzročata približno 12 % vseh CIN1, ostale nizkorizične genotipe HPV najdemo v manj kot 5 % primerov (Clifford in sod., 2005).

Rak materničnega vratu se razvije v večih stopnjah predrakavih sprememb ploščatih in žlezni celic, ki jih lahko s citološkimi in histološkimi metodami dokažemo več let pred pojavom invazivnega karcinoma. Patološke spremembe ploščatoceličnega epitelija delimo v naslednje kategorije: atipične ploščate celice, atipično ploščatocelična metaplazija, blago diskariotične ploščate celice, zmerno diskariotične ploščate celice/karcinom *in situ* ter ploščatocelični karcinom (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010; Pogačnik, 2011). Ploščatocelični karcinom je najpogostejša histološka oblika raka materničnega vratu; sledita mu žlezni karcinom (adenokarcinom) in žlezno-ploščatocelični karcinom. Po vzoru klasifikacije in terminologije po Bethesda blago diskariotične ploščate celice imenujemo tudi ploščatocelična intraepitelijska lezija nizke stopnje (PIL-NS) ali LSIL (angl. *low-risk squamous intraepithelial lesion*), ki se histološko večinoma kažejo kot CIN1, zmerno in hudo diskariotične ploščate celice pa se skupno imenujejo ploščatocelične intraepitelijske lezije visoke stopnje (PIL-VS) ali HSIL (angl. *high-risk squamous intraepithelial lesions*), pri katerih je histološki ekvivalent CIN2 ali CIN3. Spremembe CIN se po stopnjah razdelijo glede na to, kolikšen del epitelija je spremenjen. Pri CIN1 obsegajo predrakave spremembe tretjino debeline epitelija, pri CIN2 dve tretjini epitelija, pri CIN3 pa celotno debelino epitelija (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010; Kocjan in Poljak, 2011).

Večina sprememb CIN1 spontano izzveni v nekaj mesecih (Moscicki in sod., 2004) in približno 20 % sprememb CIN1 napreduje v CIN2 (Doorbar, 2006). Do 68 % vseh sprememb CIN2 lahko v obdobju 3 let spontano izzveni (Moscicki in sod., 2012). Brez

ustreznega zdravljenja približno 30 % sprememb CIN2 napreduje v CIN3 (Doorbar, 2006), pri čemer je verjetnost napredovanja največja pri okužbah s HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-53 in HPV-52 in znaša 20,5 % v obdobju petih let. Verjetnost napredovanja sprememb CIN2 v CIN3 pri okužbah z ostalimi visokorizičnimi genotipi HPV je v 5-letnem obdobju 6 %, verjetnost napredovanja pri okužbi z nizkorizičnimi genotipi HPV pa le 1,7 % (Matsumoto in sod., 2011). Približno 30 % sprememb CIN3 lahko napreduje v karcinom, ki je le v izjemno redkih primerih posledica okužbe z nizkorizičnimi genotipi HPV (Wheeler in sod., 2006; Li in sod., 2011).

2.8 PATOGENETSKI POMEN PODTIPSKIH RAZLIČIC HPV

Na podlagi filogenetskih analiz se visokorizični genotipi HPV, ki povzročajo 90 % vseh rakov materničnega vratu, združujejo v rod alfa, v vrste 5, 6, 7 in 9 (de Villiers, 2013). Kljub temu vsi genotipi HPV v tej skupini niso sposobni povzročati malignih sprememb in se razlikujejo v svoji patogenosti. Znano je tudi, da lahko isti genotip HPV povzroča različne bolezni. Na primer visokorizična genotipa HPV-16/-18 povzročata benigne ali maligne novotvorbe tako na anogenitalnem področju (anogenitalne bradavice, rak materničnega vratu) kot tudi na področju glave in vratu (rak ustnega dela žrela) (Cubie, 2013) (Preglednica 2).

Preglednica 2: Bolezni, ki jih povezujemo z okužbami s HPV (Cubie, 2013: 22)
Table 2: HPV genotypes associated with particular diseases (Cubie, 2013: 22)

S HPV-povezane spremembe		Najpogostejši HPV genotipi
Navadne kožne bradavice		2, 4, 7, 75-77
Ploščate plantarne bradavice		3, 10, 26-29, 41
Planarne bradavice		1, 2, 4
Bradavičasta epidermodisplazija	Ploščate kožne bradavice	3, 10
	Pitiriazis-podobni plaki	5, 8, 9, 12-15, 17, 19, 20-25, 36-39, 47, 49
	Skvamozni celični karcinom	5, 8, 14, 17, 20, 47
Anogenitalne bradavice (kondilomi)	Zunanje bradavice	6, 11, 40, 42-44, 54, 61, 72, 81, 89
	Buschke-Lowensteinovi kondilomi	6
	Bowenoidna papuloza	16, 55
Predrakave in rakave spremembe anogenitalne sluznice	Skupina 1: rakotvorni genotipi	16, 18, 31, 33, 45, 51, 52
	Skupina 2A: verjetno rakotvorni genotipi	68
	Skupina 2B: genotipi z nejasnim rakotvornim potencialom	26, 53, 64-67, 69, 70, 73, 82
Benigne in maligne spremembe ustne votline, grla in ustnega dela žrela	Papilomi ustne votline	2, 6, 7, 11, 16, 18, 32, 57
	Papilomi grla	6, 11
	Fokalna epitelna hiperplazija ustne votline (Heckova bolezen)	13, 32
	Ustno-žrelni karcinom	16, 18

Na podlagi omenjenih dejstev se je izoblikovala domneva, da so razlike v bioloških lastnostih in patogenosti istega genotipa HPV povezane z okužbo z določenimi podtipskimi različicami posameznega genotipa HPV.

Večina raziskav v zadnjih 15 letih je proučevala patogenost in/ali svetovno geografsko razporeditev podtipskih različic visokorizičnih genotipov HPV, predvsem HPV-16, HPV-18, HPV-58, HPV-52, HPV-31 in HPV-45, večinoma samo v genomskih področjih E6, E7 in LCR (De Boer in sod., 2005; Schiffman in sod., 2005; Sichero in sod., 2007; Xi in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Chang in sod., 2011; Xi in sod., 2012; Chan in sod., 2013; Cornet in sod., 2013; Formentin in sod., 2013; Xi in sod., 2013). V prospektivnih študijah, kjer so spremljali bolnike, okužene s HPV-16 (ali HPV-18), so dokazali, da so posamezne podtipe različice visokorizičnih genotipov povezane z večjo perzistenco virusa in z večjo verjetnostjo napredovanja bolezni. Sichero in sodelavci (2007) so v raziskavi, v kateri so pet let spremljali približno 2.500 žensk iz Braziliije, pokazali, da so okužbe z ne-evropskimi

različicami HPV-16 povezane z večjim tveganjem za razvoj raka materničnega vratu in da so okužbe z evropskimi različicami HPV-18 povezane z večjo perzistenco virusa (Sichero in sod., 2007). Dodatno, so Xi in sodelavci (2007) pokazali, da so okužbe z afriškimi in azijsko-ameriškimi različicami HPV-16 povezane z večjim tveganjem za razvoj raka materničnega vratu v primerjavi z okužbami z evropskimi različicami. Obratno velja za okužbe s podtipskimi različicami HPV-18, kjer je tveganje za razvoj raka materničnega vratu večje v primeru okužbe z evropskimi ali azijsko-ameriškimi različicami v primerjavi z okužbami z afriškimi različicami HPV-18 (Xi in sod., 2007). Schiffman in sodelavci (2010) so na vzorcu približno 10.000 žensk iz Costa Rice potrdili povezavo med okužbo z ne-evropskimi različicami HPV-16 in tveganjem za napredovanje bolezni (Schiffman in sod., 2010). Medtem ko je svetovna genomska raznolikost visokorizičnih genotipov dobro raziskana in njen pomen podprt na področju razvoja cepiv v epidemioloških, filogenetskih in patogenetskih raziskavah, je poznavanje genomske raznolikosti HPV-6/-11 na svetovnem nivoju zelo omejeno.

2.8.1 Podtipske različice HPV-6

Genomsko raznolikost HPV so prvotno raziskovali s pomočjo restrikcijskih analiz celotnih nukleotidnih zaporedij (genomov) in z različnimi hibridizacijskimi tehnikami (npr. hibridizacija po Southernu) (Gissmann in zur Hausen, 1980; de Villiers in sod., 2004). Restrikcijske analize genoma HPV-6 so pokazale, da obstajajo številne podtipske različice HPV-6, ki so jih takrat opredelili kot podtipe HPV-6 (Gissmann in sod., 1983; Mounts in Kashima, 1984; Boshart in zur Hausen, 1986; Brown in sod., 1993). Z uvedbo neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja (sekveniranje) so opredelili celotno nukleotidno zaporedje t.i. prototipskega, referenčnega izolata HPV-6b (pristopna številka v genski banki GenBank X00203; pristopna številka v genski banki Papillomavirus Episteme (PaVE): HPV6REF) (Schwarz in sod., 1983) in kasneje ugotovili, da so podtipi HPV-6 pravzaprav podtipske različice prvotno osamljenega genotipa HPV-6 (Rando in sod., 1986; Kasher in Roman, 1988; Farr in sod., 1991; Icenogle in sod., 1991; Yaegashi in sod., 1993; Kitasato in sod., 1994; Heinzl in sod., 1995; Roman in Brown, 1995; Grassmann in sod., 1996; Suzuki in sod., 1997; Caparros-Wanderley in sod., 1999). Na podlagi nadaljnjih molekularnih analiz vzorcev HPV-6 so opredelili še celotna nukleotidna zaporedja dveh

novih podtipov oz. različic HPV-6: HPV-6a (pristopna številka v genski banki GenBank: L41216) in HPV-6vc (pristopna številka v genski banki GenBank: AF092932) in ju poimenovali ne-prototipski podtipski različici (Hofmann in sod., 1995; Kovelman in sod., 1999). V raziskavi, ki so jo objavili Heinzl in sodelavci (1995), je bilo prvič dokazano, da podtipe različice HPV-6 tvorijo dve ločeni filogenetski skupini: prototipsko skupino, kamor se uvrščajo podtipe različice HPV-6, ki so podobne referenčnemu izolatu in ne-prototipsko skupino, kamor se uvrščajo podtipe različice HPV-6, ki so podobne ne-prototipskima različicama HPV-6a in HPV-6vc (Heinzl in sod., 1995). To je bila tudi prva raziskava, kjer so med seboj primerjali del genomskega področja LCR (približno 300 bp) pri 62 vzorcih HPV-6, pridobljenih iz anogenitalnih bradavic, papilomov grla, brisov materničnega vratu in karcinoma ustne votline, iz osmih držav po celem svetu (Brazilija, Nemčija, Indija, Italija, Japonska, New York, Senegal in Singapur) in dokazali, da obstaja najmanj 19 različic genomskega področja LCR in da se posamezne podtipe različice HPV-6 filogenetsko ne razvrščajo v geografsko oz. etnično-značilne skupine (Heinzl in sod., 1995). V raziskavah, ki so sledile, so raziskovalci ugotavljali obstoj podtipskih različic v različnih genih HPV-6, najpogosteje na izolatih HPV-6, osamljenih iz anogenitalnih bradavic; številne molekularne raziskave so pokazale, da med različicami HPV-6 prevladujejo ne-prototipske različice HPV-6 (Krieger in sod. 1997; Caparros-Wanderley in sod., 1999; Kovelman in sod., 1999).

Prve sistematične primerjave celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, z največjim številom različnih kliničnih vzorcev do začetka izvajanja naše raziskovalne naloge, so bile opravljene v Sloveniji. S hkratno analizo nukleotidnih zaporedij L1, LCR, E6, E2, E5a in E5b (približno 50 % genoma HPV-6) 77 slovenskih vzorcev HPV-6, pridobljenih iz 45 tkivnih vzorcev genitalnih bradavic in 32 tkivnih vzorcev papilomov grla, so Kocjan in sodelavci (2009) opredelili 36 novih podtipskih različic HPV-6, med katerimi so prevladovali ne-prototipske različice (Kocjan in sod., 2009). S filogenetsko analizo dela nukleotidnega zaporedja LCR (približno 300 bp) so Kocjan in sodelavci pokazali, da je več kot 90 % slovenskih podtipskih različic HPV-6 identičnih filogenetsko različnim podtipskim različicam HPV-6 iz vseh koncev sveta (Kocjan in sod., 2009). Na podlagi izsledkov omenjene raziskave so v raziskavi, ki je sledila, opredelili 19 celotnih nukleotidnih zaporedij genetsko najbolj raznolikim podtipskim različicam HPV-6 (pristopne številke: FR751320 – FR751338) (Kocjan in sod., 2011) in opisali nekatere nove nukleotidne in

aminokislinske zamenjave ter prvič pokazali, da evolucija v kodirajočih kot tudi v nekodirajočih zaporedjih genoma HPV-6 poteka enakomerno. Raznolikost genoma je bila najbolj očitna v nekodirajočih področjih LCR in NCR3 ter virusnih genih E4, E5a in E5b (Kocjan in sod., 2011). Genske banke so do začetka izvajanja naše raziskovalne naloge vsebovale le 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, od katerih je 47 (78 %) opredelila naša raziskovalna skupina (Kocjan in sod., 2011; Kocjan in sod., 2013) (Preglednica 3).

Preglednica 3: 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave

Table 3: 60 HPV-6 complete genome sequences, available in GenBank prior to our analysis

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
HPV-6b	X00203	Nemčija	1983	Schwarz in sod., 1983
HPV-6a	L41216	ZDA	1995	Hoffman in sod., 1995
HPV-6vc	AF092932	ZDA	1999	Kovelman in sod., 1999
LP26	FR751320	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC251c	FR751321	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC26	FR751322	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP130	FR751323	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP5	FR751324	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC377	FR751325	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC56	FR751326	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC331	FR751327	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC301	FR751328	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP11	FR751329	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC23z	FR751330	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP137	FR751331	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP96(175)	FR751332	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP176	FR751333	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC11	FR751334	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC96	FR751335	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC231	FR751336	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC306	FR751337	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP98(131)	FR751338	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
PV2345	JN252314	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV0529	JN252315	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave.

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
PV1666	JN252316	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV1731	JN252317	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV1774	JN252318	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV2530	JN252319	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV1667	JN252320	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV1732	JN252321	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV1499	JN252322	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
PV2702	JN252323	Švedska	2012	Ure in Forsslund, 2012
LP22	HE599226	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP237	HE599227	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP139	HE599228	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP143	HE599229	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP148	HE599230	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP183	HE599231	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP243	HE599232	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP145	HE599233	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP231	HE599234	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP3	HE599235	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP210	HE599236	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP23	HE599237	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP230	HE599238	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP15	HE599239	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP240	HE599240	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP173	HE599241	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP178	HE599242	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP182	HE599243	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP223	HE599244	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP112	HE599245	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP244	HE599246	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX44	HE962026	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX34	HE962027	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX32	HE962028	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP211	HE962029	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave.

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
LP238	HE962030	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX29	HE962031	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX26	HE962032	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013

Večina raziskav, ki so sledile, se je osredotočala le na analizo določenih delov virusnega genoma HPV-6, predvsem genov L1, E5a, E5b, E6, E7 in nekodirajočega področja LCR (Combrinck in sod., 2012; Danielewski in sod., 2013; de Matos in sod., 2013; Fujs Komloš in sod., 2013; Godinez in sod., 2014).

Pomemben prispevek k poznavanju in raziskovanju podtipskih različic HPV-6 (in HPV-11) je ponudila tudi nedavno objavljena raziskava, v kateri so Burk in sodelavci, vključno s sodelavci iz našega laboratorija (2011), opisali predlog za opredeljevanje in poimenovanje podtipskih različic HPV-6/-11 (Burk in sod., 2011). Filogenetske analize so temeljile na celotnih nukleotidnih zaporedjih HPV-6/-11, na podlagi katerih so raziskovalci predlagali kriterij za določitev genetskih linij (1 % do 10% odstopanje v celotnem nukleotidnem zaporedju od ostalih podtipskih različic istega genotipa HPV) in genetskih podlinij (0,5 % do 1,0 % odstopanje). Po opisanem predlogu imenujemo skupino podtipskih različic HPV, ki vključuje referenčno različico, »linijo A« in njene podlinije »A1«, »A2« itd. Skupine podtipskih različic, ki ne vključujejo referenčne različice HPV, imenujemo po abecednem vrstnem redu (linija B, C itd.). Burk in sodelavci (2011) so tako pokazali, da se podtipske različice HPV-6 uvrščajo v 2 skupini: genetsko linijo A (vključuje referenčno različico HPV-6b) in genetsko linijo B, ki se naprej deli v tri podlinije: B1 (vključuje različico HPV-6vc), B2 in B3 (vključuje različico HPV-6a) (Burk in sod., 2011).

Razen preliminarnih opažanj, da v anogenitalnih bradavicah in papilomih grla prevladujejo ne-prototipske različice HPV-6 (Kocjan in sod., 2009; Burk in sod., 2011), da podtipske različice HPV-6 iz podlinije B1 prevladujejo v anogenitalnih lezijah (Danielewski in sod., 2013; Godinez in sod., 2014) in da podtipske različice HPV-6 iz podlinije B3 in linije A prevladujejo v papilomih grla (Godinez in sod., 2014), v predhodnih raziskavah niso uspeli

dokazati nobene druge povezave med različnimi podtipskimi različicami HPV-6, klinično sliko in/ali geografskim področjem.

2.8.2 Podtipske različice HPV-11

Celotno nukleotidno zaporedje virusa HPV-11 je bilo prvič opredeljeno leta 1986 (pristopna številka v genski banki GenBank: M14119; pristopna številka v genski banki PaVE: HPV11REF) (Dartmann in sod., 1986). Poleg referenčnega zaporedja HPV-11 so do leta 2010 opredelili samo še eno celotno nukleotidno zaporedje HPV-11 (pristopna številka: EU918768) (Wu in sod., 2009).

Genomsko raznolikost HPV-11 na svetovni ravni so prvič poskusili opredeliti, hkrati s HPV-6, Heinzl in sodelavci (Heinzl in sod., 1995). V ta namen so primerjali del nukleotidnega zaporedja LCR (približno 300 bp) 40 HPV-11-pozitivnih vzorcev, pridobljenih iz genitalnih bradavic, papilomov grla, brisov materničnega vratu in karcinoma ustne votline iz 8 različnih geografskih območij. Na podlagi omenjenih analiz so opredelili 10 podtipskih različic HPV-11 in pokazali, da različice HPV-11, prav tako kot HPV-6, delimo v dve filogenetski skupini: prototipsko in ne-prototipsko. S filogenetsko analizo so opredelili le eno afriško različico HPV-11, značilno samo za afriško celino, medtem ko med ostalimi podtipskimi različicami HPV-11 niso dokazali nobene značilne povezave z njihovim geografskim izvorom (Heinzl in sod., 1995).

Prve sistematične primerjave celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 so bile opravljene nedavno v Sloveniji. S hkratno analizo nukleotidnih zaporedij, ki kodirajo gene L1, E6, E5a, E5b in nekodirajočo regijo LCR (približno 40 % genoma HPV-11), so na do takrat največjem številu HPV-11-pozitivnih vzorcev (63 vzorcev HPV-11, pridobljenih iz 9 genitalnih bradavic, 42 analnih brisov, 4 brisov materničnega vratu in 8 vzorcev papilomov grla) opredelili tudi 23 novih podtipskih različic HPV-11, med katerimi so prevladovala ne-prototipske različice (Maver in sod., 2011). V omenjeni raziskavi so prav tako opredelili celotna nukleotidna zaporedja 10 genetsko najbolj raznolikim podtipskim različicam HPV-11 (pristopne številke: FN870021, FN870022 in FN907957 – FN907964). Opisali so nekatere nove nukleotidne in aminokislinske zamenjave. Analiza celotnih nukleotidnih zaporedij je pokazala, da je genom HPV-11 precej manj raznolik kot genom HPV-6.

Raznolikost podtipskih različic HPV-11 je bila največja v genih E1, L2 in L1 ter v nekodirajočem področju LCR (Maver in sod., 2011).

Večina raziskav, ki so sledile, se je osredotočala na analizo le določenih delov virusnega genoma HPV-11, predvsem genov L1, E5a, E5b, E6, E7 in nekodirajočega področja LCR (Danielewski in sod., 2013; de Matos in sod., 2013; Godinez in sod., 2014). V dveh nedavnih raziskavah, v katerih so opredeljevali patogenost podtipskih različic HPV-11 v različnih stopnjah ponavljajočih-se papilomov grla in raka pljuč, so opredelili 8 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 (Yuan in sod., 2012; Gáll in sod., 2013; Yuan in sod., 2013). Raziskava podtipskih različic HPV-11 iz Tajske je prispevala 5 dodatnih celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 iz 2 brisov materničnega vratu, 2 papilomov grla in 1 pljučnega papiloma (Chansaenroj in sod., 2012). Genske banke so do začetka izvajanja naše raziskovalne naloge vsebovale le 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, od katerih je 34 (69 %) opredelila naša raziskovalna skupina (Maver in sod., 2011; Kocjan in sod., 2013).

Preglednica 4: 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave

Table 4: 49 HPV-11 complete genome sequences, available in GenBank prior to our analysis

HPV-11 izolat	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
PPH11	M14119	Nemčija	1986	Dartmann in sod., 1986
LZod45-11	EU918768	Kitajska	2009	Wu in sod., 2009
HUNG1	FR872717	Madžarska	2011	Gáll in sod., 2011
A86	FN870021	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A346	FN870022	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
LP12	FN907957	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A260	FN907958	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A47	FN907959	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CAC246	FN907960	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A48	FN907961	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CAC86	FN907962	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CS20	FN907963	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
LP13	FN907964	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
GUMC-AJ-Lung	JN644142	ZDA	2012	Yuan in sod., 2012
CU16	JQ773408	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012
CU17	JQ773409	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012
CU18	JQ773410	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, objavljenih v genski banki GenBank do začetka izvajanja naše raziskave

HPV-11 izolat	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
CU19	JQ773411	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012
CU20	JQ773412	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012
GUMC-AJ	JN644141	ZDA	2013	Yuan in sod., 2013
LP138	HE611258	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP19	HE611259	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP6	HE611260	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP8	HE611261	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP133	HE611262	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP220	HE611263	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP126	HE611264	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP146	HE611265	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP221	HE611266	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP1	HE611267	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP16	HE611268	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP20	HE611269	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP14	HE611270	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP2	HE611271	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP27	HE611272	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP170	HE611273	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP229	HE611274	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP174	HE962023	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX35	HE962024	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX27	HE962025	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP262f	HE962365	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP224f	HE962366	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP253f	HE962367	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP255f	HE962368	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
JO-RRP_1	HE574701	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_2	HE574702	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_3	HE574703	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_4	HE574704	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_5	HE574705	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013

V nedavno objavljeni raziskavi, v kateri so Burk in sodelavci, vključno s sodelavci iz našega laboratorija (2011), opisali predlog za opredeljevanje in poimenovanje podtipskih različic HPV-6/-11, so s filogenetsko analizo 32 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 pokazali, da se podtipske različice HPV-11 delijo v dve podliniji: A1 (vključuje različice, ki so podobne referenčni različici HPV-11) in A2, ki vsebuje največ podtipskih različic HPV-11 (Burk in sod., 2011). Z analizo celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6/-11 so pokazali, da je genomska raznolikost HPV-11 približno 3 do 4-krat manjša v primerjavi s HPV-6 (Burk in sod., 2011; Godinez in sod., 2014).

Razen preliminarne opažanj, da med okužbami anogenitalnega področja in področja glave in vratu z genotipom HPV-11 prevladujejo ne-prototipske različice oz. podtipske različice iz podlinije A2 (Maver in sod., 2011; Burk in sod., 2011; Danielewski in sod., 2013; Godinez in sod., 2014), v predhodnih raziskavah niso uspeli dokazati nobene druge povezave med različnimi podtipskimi različicami HPV-11, klinično sliko in/ali geografskim področjem.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Za določanje svetovne genomske raznolikosti HPV-6/-11 smo od decembra 2011 do aprila 2013 zbirali HPV-6/-11-pozitivne vzorce iz 15 držav, ki pokrivajo vseh šest celin: Evropo, Azijo, Severno in Južno Ameriko, Avstralijo in Afriko. V raziskavi je sodelovalo 18 laboratorijev iz naslednjih držav: Nemčija, Češka, Litva, Hrvaška, Švica, Slovenija, Velika Britanija, Japonska, Hongkong, Malezija, Združene države Amerike, Kanada, Argentina, Avstralija in Južna Afrika.

3.1.1 HPV-6-pozitivni vzorci

V raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, ki so bili odvzeti ženskam in moškim iz anogenitalnega področja (400; 75,5 %), področja glave in vratu (84; 15,8 %) ter drugih in/ali neopredeljenih anatomskih področij okužbe (46; 8,7 %) (Preglednica 5).

Preglednica 5: 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v raziskavo
Table 5: 530 HPV-6-positive samples included in our study

Anatomsko področje okužbe in tip vzorca	Število vzorcev (n=530)	Delež vzorcev (%)
Anogenitalno področje	400	75,5
Brisi materničnega vratu	186	46,5
Normalna citologija	18	9,7
ASCUS	23	12,4
LSIL	30	16,1
HSIL	1	0,5
CIN1	8	4,3
CIN1/2	10	5,4
NP	96	51,6
Anogenitalne bradavice	179	44,8
Neopredeljen tip vzorca	35	8,7
Področje glave in vratu	84	15,8
Papilomi grla	83	98,8
Papilomi nosu	1	1,2
Neopredeljeno anatomsko področje	46	8,7

Legenda: ASCUS: atipične spremembe ploščatoceličnega epitelija, LSIL: intraepitelijske spremembe ploščatoceličnega epitelija nizke stopnje, HSIL: intraepitelijske spremembe ploščatoceličnega epitelija visoke stopnje, CIN1: cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje, CIN1/2: cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. ali 2. stopnje, NP: ni podatka.

Največ HPV-6-pozitivnih vzorcev je bilo iz anogenitalnega področja, med katerimi je bilo največ brisov materničnega vratu (186; 46,5 %). Sledile so anogenitalne bradavice (179; 44,8 %) in 35 vzorcev z neopredeljenim tipom vzorca (8,7 %). HPV-6 pozitivni vzorci iz področja glave in vratu so predstavljali približno šestino vseh vzorcev HPV-6 (84; 15,8 %), med katerimi je bilo 83 (98,8 %) papilomov grla in en papilom nosu (1,2 %).

3.1.2 HPV-11-pozitivni vzorci

V raziskavo smo vključili 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev, ki so bili odvzeti ženskam in moškim iz anogenitalnega področja (104; 50,2 %), področja glave in vratu (55; 26,5 %) ter drugih in/ali neopredeljenih anatomskih področij okužbe (48; 23,2 %) (Preglednica 6).

Preglednica 6: 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev, vključenih v raziskavo
Table 6: 207 HPV-11-positive samples included in our study

Anatomsko področje okužbe in tip vzorca	Število vzorcev (n=207)	Delež vzorcev (%)
Anogenitalno področje	104	50,2
Brisi materničnega vratu	22	21,1
ASCUS	2	9,1
LSIL	1	4,5
CIN1	1	4,5
NP	18	81,8
Anogenitalne bradavice	76	73,1
Neopredeljen tip vzorca	6	5,8
Področje glave in vratu	55	26,5
Papilomi grla	50	91,0
Papilomi traheje	1	1,8
Neopredeljen tip vzorca	4	7,2
Neopredeljeno anatomsko področje	48	23,2

Legenda: ASCUS: atipične spremembe ploščatoceličnega epitelija, LSIL: intraepitelijske spremembe ploščatoceličnega epitelija nizke stopnje, CIN1: cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje, NP: ni podatka.

Največ HPV-11-pozitivnih vzorcev je bilo iz anogenitalnega področja, med katerimi je bilo največ anogenitalnih bradavic (76; 73,1 %). Sledili so brisi materničnega vratu (22; 21,1 %) in 6 vzorcev, ki niso imeli opredeljenega tipa vzorca (5,8 %). Med vzorci iz področja glave in vratu (55; 26,5 %) je bilo 50 (91,0 %) papilomov grla, 4 (7,2 %) vzorci z neopredeljenim tipom vzorca in 1 papilom traheje (1,8 %).

3.2 METODE

3.2.1 Potrjevanje okužb s HPV-6/-11

Za potrjevanje prisotnosti HPV-6/-11 DNA v kliničnih vzorcih smo uporabili tipsko-specifično verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR), ki omogoča občutljivo in specifično dokazovanje genotipov HPV-6/-11 ter hkratno ločevanje prototipskih različic genotipa HPV-6 (sorodnih HPV-6b) od ne-prototipskih različic (sorodnih HPV-6a) (Kocjan in sod., 2008). Pomnoževanje HPV DNA in analizo specifičnosti pridelkov RT-PCR smo izvedli po navodilih Kocjana in sodelavcev (2008), na računalniško vodeni aparaturi LightCycler v2.0 (Roche Diagnostics, Penzberg,

Nemčija), ki omogoča zaznavanje pridelkov RT-PCR s pomočjo modificiranega sistema hibridizacijskih lovk FRET (FRET-RT-PCR) (Kocjan in sod., 2008). V sistemu FRET-RT-PCR je prejemnik emisijske svetlobe fluorescina donorske FRET-lovke s fluoroforjem LC640 označen protismerni (angl. *antisense*) oligonukleotidni začetnik (OZ) HP_iLC. HPV-6/-11 smo s FRET-RT-PCR dokazovali v eni reakcijski mešanici, ki je vsebovala 100 ng DNA, 10 μ l reagenta 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix (diagnostični komplet QuantiTect[®] Probe PCR Kit, Qiagen, Hilden, Nemčija), 5,5 mM MgCl₂, 0,5 μ M vsakega od treh OZ (HP1,3_F2, HP2_F2 in HP_iLC), 0,2 μ M fluorescentno označene lovke HP_LNA in sterilno deionizirano vodo do 20 μ l.

Pred začetkom prvega cikla pomnoževanja smo reakcijsko mešanico inkubirali 15 min pri 95 °C. Pomnoževanje je potekalo s 50-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR (angl. *polymerase chain reaction*), sestavljenega iz treh inkubacij: 0 s pri 95 °C, 40 s pri 52 °C in 30 s pri 72 °C. Pomnoževanju je sledila analiza specifičnosti pridelkov PCR z metodo analize talilne krivulje (angl. *melting curve analysis*), ki je potekala z enkratnim tristopenjskim temperaturnim ciklom: 0 s na 95 °C, 2 min na 37 °C, 0 s na 85 °C. Fluorescentni signal je bil izmerjen pri valovni dolžini 640 nm. Reakcijo smo ustavili s 30-sekundnim ohlajanjem reakcijske mešanice na 40 °C (Kocjan in sod., 2008).

3.2.2 Določanje koncentracije celokupne DNA

Koncentracijo DNA smo določali spektrofotometrično, s pomočjo aparature NanoDrop 2000c (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija), ki lahko izmeri spekter valovnih dolžin od 190 nm do 840 nm ter koncentracijo dvojnovijačne DNA med 0,4 in 15.000 ng/ μ l. Nukleinske kisline absorbirajo UV svetlobo pri valovni dolžini 260 nm, medtem ko beljakovine in fenolne spojine absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 280 nm. Vzorec osamljene DNA (1 μ l) smo odpipetirali na merilni podstavek in pri valovni dolžini 260 nm izmerili koncentracijo celokupne DNA (ng/ μ l). V kolikor je bilo razmerje A260/A280 med 1,8 in 2,1, smo sklepali, da imamo v vzorcu čisto DNA, brez ostankov beljakovin in fenola.

3.2.3 Pomnoževanje DNA HPV-6

Za pomnoževanje 4.908 bp dolgega segmenta genoma HPV-6, ki je vseboval celotne gene E5a, E5b, L2, L1, E6 in nekodirajoče področje LCR, smo uporabili predhodno opisane OZ: HPV-6-E5S in HPV-6-E6R (Kocjan in sod., 2009; Kocjan in sod., 2011). Podtipske različice HPV-6, ki so v genomskih področjih E5a, E5b, L1 in LCR vsebovale vsaj en edinstven polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), aminokislinsko zamenjavo ali vsaj eno insercijo ali delecijo v nekodirajočem področju LCR, smo izbrali za določanje celotnega nukleotidnega zaporedja. V tem primeru smo s pomočjo predhodno opisanih OZ; HPV-6-6S in HPV-6-E5R, pomnožili prekrivajoči-se 4.511 bp dolg segment genoma HPV-6, ki je vseboval celotne gene E6, E7, E1, E2, E4, E5a in E5b (Kocjan in sod., 2009; Kocjan in sod., 2011).

Pomnoževanje obeh segmentov DNA smo izvedli na aparaturi Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, ZDA), s pomočjo kompleta kemikalij Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity kit (Invitrogen, Carlsbad, ZDA). Reakcijski mešanici (25 µl) sta vsebovali: 100 ng osamljene DNA; 2,5 µl pufru 10x High Fidelity PCR Buffer, 0,1 µl vsakega OZ (50 µM), 0,5 µl (10 mM) mešanice nukleotidov (dNTP), 1 µl MgSO₄ in sterilno deionizirano vodo.

Pomnoževanje segmentov smo izvedli s 50-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 94 °C, 30 s pri 62/56 °C in 5 min pri 68 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 2 min pri 94 °C. Zadnjemu ciklu pomnoževanja je sledila 7-minutna inkubacija pri 68 °C.

3.2.4 Pomnoževanje DNA HPV-11

Izdelali smo OZ za pomnoževanje virusnega genoma HPV-11 v dveh segmentih. OZ smo izdelali na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja referenčnega izolata HPV-11 (pristopna številka v PaVE: HPV11REF), s pomočjo računalniškega programa CLC Main Workbench (CLCBio, 2011). OZ so bili izdelani v podjetju TIB MOLBIOL (Berlin, Nemčija). Specifičnost izdelanih OZ smo preverili s pomočjo internetnega programa BLAST (NCBI, 2013) in pokazali, da je z izdelanima OZ vsaj teoretično mogoče pomnoževanje le DNA HPV-11. Specifičnost in občutljivost izdelanih OZ smo preverili tudi s pomnoževanjem

HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev, z uporabo na novo izdelanega protokola, ki smo ga razvili s pomočjo navodil proizvajalca reagentov Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity kit (Invitrogen). V preglednici 7 so podana nukleotidna zaporedja OZ, mesta naleganja OZ na referenčno nukleotidno zaporedje HPV-11 in velikosti pričakovanih pridelkov PCR.

Preglednica 7: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje DNA HPV-11

Table 7: Primers used for HPV-11 DNA amplification

Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov	Genomsko področje naleganja	Velikost pridelka PCR (bp)
HPV-11-S1MS-F	5'-GGATATGAGTTTTTGGGAGGT-3'	L1	4.529
HPV-11-S1MS-R	5'-ATGCCACGTTGAAGATGCTA-3'	E2	
HPV-11-S2F	5'-TTACAACAAGCACCAAAGAAG-3'	E2	4.851
HPV-11-S2R	5'-TTCTATTTACACAACGGCT-3'	E6	

Za pomnoževanje 4.851 bp dolgega segmenta genoma HPV-11, ki je vseboval 3'-konec gena E2 ter celotne gene E5a, E5b, L2, L1, nekodirajoče področje LCR in 5'-konec gena E6, smo uporabili na novo izdelane OZ: HPV-11-S2F in HPV-11-S2R (Preglednica 7). Podtypeske različice HPV-11, ki so v genomskih področjih E5a, E5b, L1 in LCR vsebovale vsaj en edinstven SNP, aminokislinsko zamenjavo ali vsaj eno insercijo ali delecijo, smo izbrali za določanje celotnega nukleotidnega zaporedja. V tem primeru smo pomnožili prekrivajoči-se 4.529 bp dolg segment genoma HPV-11, ki je vseboval manjši del gena L1 (5' konec), nekodirajoče področje LCR, celotne gene E6, E7, E1, E4 in večji del 3'-konca gena E2. Omenjeni segment smo pomnožili s pomočjo na novo izdelanih OZ: HPV-11-S1MS-F in HPV-11-S1MS-R (Preglednica 7).

Pomnoževanje obeh segmentov DNA smo izvedli na aparaturi Veriti[™] Thermal Cycler (Applied Biosystems), s pomočjo kompleta kemikalij Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity kit (Invitrogen). Reakcijski mešanici (25 µl) sta vsebovali: 100 ng osamljene DNA, 2,5 µl pufru 10x High Fidelity PCR Buffer, 0,1 µl vsakega OZ (50 µM), 0,5 µl (10 mM) mešanice nukleotidov (dNTP), 1 µl MgSO₄ in sterilno deionizirano vodo.

Pred začetkom prvega cikla pomnoževanja smo reakcijsko mešanico inkubirali 2 min pri 94 °C. Pomnoževanje segmentov smo izvedli s 50-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 30 s pri 94 °C, 30 s pri 53/57 °C in 5 min pri 68 °C. Zadnjemu ciklu pomnoževanja je sledila 7-minutna inkubacija pri 68 °C.

3.2.5 Dokazovanje in analiza velikosti pridelkov PCR

Pridelke PCR, velikosti med 4.000 in 5.000 bp smo dokazovali z elektroforezo v 0,8 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po naslednjem postopku: 0,4 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) smo raztopili v 50 ml 1x pufra TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl₂, 2mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH=8,3) in 5 µl etidijevega bromida s koncentracijo 10 mg/ml (Promega Corporation, Madison, ZDA). Pripravljen, strjen agarozni gel smo položili v elektroforezno kad HE 33 Mini Horizontal Submarine Electrophoresis Unit (Hoeffer, San Francisco, ZDA) in prelili z 1x pufrom TAE, ki smo ga ohladili na 4 °C.

Za določanje velikosti pridelkov PCR smo pripravili mešanico nanašalnega barvila 6x MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas, Vilna, Litva) in molekularnega označevalca High DNA Mass Ladder (Invitrogen) v razmerju 1:1. Molekularni označevalec High DNA Mass Ladder je dolžinska in koncentracijska lestvica, ki vsebuje delce DNA, velikosti 1.000 bp (5 ng/µl), 2.000 bp (10 ng/µl), 3.000 bp (15 ng/µl), 4.000 bp (20 ng/µl), 6.000 bp (30 ng/µl), in 10.000 bp (50 ng/µl). Pridelke PCR smo na gel nanašali v obliki predhodno pripravljene mešanice (5 µl) iz 4 µl očiščenega pridelka PCR in 1 µl raztopine 6x MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas). Elektroforeza je potekala 25 min pri sobni temperaturi in napetosti 120 V. Gel smo nato pregledali pod UV svetlobo, ga fotografirali z digitalnim detekcijskim sistemom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael) in s pomočjo dolžinske lestvice določili velikost pridelka PCR.

3.2.6 Čiščenje in določanje koncentracije pridelkov PCR

Pridelke PCR z ustrezno velikostjo smo očistili s komercialnim kompletom kemikalij QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), po navodilih proizvajalca. Očiščen pridelek PCR smo po končanem čiščenju sprali z elucijskim pufrom EB (Qiagen). Količino pufru EB smo prilagodili glede na ocenjeno količino pridelka PCR, ki smo jo določili tako, da smo ocenili jakost obarvanega pridelka na elektroforeznem gelu. Po končanem čiščenju pridelkov PCR smo njihovo koncentracijo ocenili na 0,8 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5. Za ocenjevanje koncentracije smo uporabili mešanico 4 μ l raztopine 6x MassRuler™ Loading Dye (Fermentas) in 1 μ l molekularnega označevalca High DNA Mass Ladder (Invitrogen). Pridelek PCR smo na gel nanašali v obliki predhodno pripravljene mešanice (5 μ l) iz 4 μ l očiščenega pridelka PCR in 1 μ l raztopine 6x MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas). Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi in napetosti 120 V, 40 minut. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV svetlobo in ga fotografirali z digitalnim detekcijskim sistemom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems). Koncentracijo pridelkov PCR smo določili s primerjavo jakosti emitirane svetlobe pridelka PCR in delcev molekularnega označevalca z znano koncentracijo DNA.

3.2.7 Neposredno določanje nukleotidnega zaporedja

Neposredno določanje nukleotidnega zaporedja so izvedli v podjetju MacroGen Europe (Amsterdam, Nizozemska). V omenjen laboratorij smo poslali 20-30 μ l očiščenih pridelkov PCR in zahtevano količino ustreznega sekvenčnega OZ, s koncentracijo 5 pmol/ μ l. Za neposredno določanje nukleotidnega zaporedja HPV-6 smo uporabili predhodno opisane OZ (Kocjan in sod., 2009; Kocjan in sod., 2011).

3.2.8 Analiza pridobljenih nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja, ki smo jih pridobili iz podjetja MacroGen, smo sestavili s pomočjo računalniškega programa CLC Main Workbench (CLCBio, 2011). Sestavljena nukleotidna zaporedja smo med seboj poravnali z algoritmom ClustalW, s pomočjo računalniškega programa BioEdit (Hall, 1999) ali s programom MAFFT v6.846 (Katoh in Toh, 2010). V

poravnave nukleotidnih zaporedij smo vključili tudi vsa nukleotidna zaporedja HPV-6/-11, dostopna v genskih banki GenBank in PaVE, vključno z referenčnima nukleotidnima zaporedjema. V primeru HPV-6 smo kot primerjalno zaporedje vedno uporabili »popravljen« referenčno nukleotidno zaporedje HPV-6b (HPV6REF), ki vsebuje dodaten, 94 bp dolg odsek nukleotidnega zaporedja na genomskem mestu 7.350 (Heinzel in sod., 1995). V primeru HPV-11 smo kot primerjalno zaporedje vedno uporabili »popravljen« referenčno nukleotidno zaporedje HPV-11 (HPV11REF), ki vsebuje dodaten, 2 bp dolg odsek nukleotidnega zaporedja na genomskem mestu 7.716 (Heinzel in sod., 1995). V primeru poravnave združenih nukleotidnih zaporedij genomskih področij E5a, E5b, L1 in LCR smo vsa nukleotidna zaporedja združili in poravnali v omenjenem vrstnem redu. Združeno zaporedje se je tako vedno začelo s prvim ATG odprtega bralnega okvirja E5a. V primeru poravnave celotnih nukleotidnih zaporedij smo vsa zaporedja poravnali tako, da so se začela s prvim ATG odprtega bralnega okvirja E6.

3.2.9 Izbira podtipskih različic za določanje celotnih nukleotidnih zaporedij

Celotno nukleotidno zaporedje smo določili tistim podtipskim različicam HPV-6/-11, pri katerih smo v genomskih področjih E5a, E5b, L1 ali LCR našli nove, še neopisane nukleotidne zamenjave, delecije, insercije ali aminokislinske zamenjave. Genomske spremembe smo določali s poravnavo nukleotidnih zaporedij, dostopnih v genski banki GenBank in PaVE, in nukleotidnih zaporedij, pridobljenih v naši raziskavi. Po pridobitvi celotnih nukleotidnih zaporedij podtipskih različic HPV-6/-11, smo odprte bralne okvirje (ORF) opredelili s pomočjo računalniškega programa CLC Main Workbench (CLCBio, 2011).

3.2.10 Določanje genomske raznolikosti celotnih nukleotidnih zaporedij

Genomsko raznolikost nukleotidnih zaporedij HPV-6/-11 smo določali na podlagi poravnave vseh celotnih nukleotidnih zaporedij, pridobljenih v naši raziskavi in iz genskih bank GenBank in PaVE. Poravnavo vseh celotnih nukleotidnih zaporedij smo uporabili za izračun maksimalne razlike parov nukleotidnih zaporedij z metodo medsebojnih razdalj (angl. *pairwise distance method*; *p-distance*). Izračune smo izvedli s programom MEGA

5.05 (Tamura in sod., 2011), s pomočjo algoritma »*p-distance*«. V programu MEGA 5.05 smo določili tudi najkrajšo in najdaljšo dolžino celotnih nukleotidnih zaporedij, celokupno število aminokislin ter število nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav.

3.2.11 Filogenetske analize

Za izdelavo filogenetskih dreves in ugotavljanje evlucijskih povezav med podtipskimi različicami HPV-6/-11, smo uporabili metodo največje verjetnosti (angl. *maximum likelihood, ML*) v programu RAxML HPC2 v7.6.3 (angl. *randomized axelerated maximum likelihood*) (Stamatakis in sod., 2008). Za določevanje zanesljivosti drevesnih razvejišč smo izvedli 1000 ponovnih vzorčenj izhodiščnih podatkov (angl., *bootstrap*). Filogenetska drevesa smo prikazali s pomočjo računalniškega programa FigTree v1.3.1 (Drummond in Rambaut, 2007). Filogenetske linije in podlinije podtipskih različic HPV-6/-11 smo poimenovali po predlogu Burka in sodelavcev (Burk in sod., 2011).

3.2.12 Določanje linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev

Za določanje linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev podtipskih različic HPV-6 smo izmed vseh celotnih nukleotidnih zaporedij, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, in tistih, ki so bila do konca junija 2013 dostopna v genski banki GenBank, izbrali tiste, pri katerih je analiza parov nukleotidnih zaporedij (angl. *pairwise distance method; p-distance*) pokazala, da se v celotnem nukleotidnem zaporedju med seboj razlikujejo v več kot 0,05 %. Izbrali smo tudi celotna nukleotidna zaporedja z edinstvenim nukleotidnim zapisom. Za določanje linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev podtipskih različic HPV-11 smo izbrali vsa celotna nukleotidna zaporedja, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, in tista, ki so bila do konca junija 2013 dostopna v genski banki GenBank. Linijsko in podlinijsko-specifične SNP smo določali s programom MacClade v4.08 (Maddison in Maddison, 2005).

3.2.13 Statistična obdelava podatkov

Primarni cilj statistične analize je bil poiskati povezave med genetskimi (pod)linijami HPV-6, njihovo geografsko razporeditvijo (celina, država), anatomskim področjem okužbe (anogenitalno področje, področje glave in vratu) ter bolnikovim spolom.

V statistično analizo smo vključili 724 nukleotidnih zaporedij HPV-6, ki smo jih pridobili v naši raziskavi in v genski banki GenBank.

V statistično analizo smo vključili podtipske različice HPV-6, ki so ustrezale naslednjim kriterijem:

- Izbrali smo podtipske različice z znanim geografskim izvorom.
- V kolikor smo imeli na voljo več podtipskih različic HPV-6, ki so pripadale istemu bolniku, smo v analizo vključili le eno različico.
- Vključili smo podtipske različice HPV-6 z opredeljenimi genetskimi linijami in podlinijami.
- Ker je bilo v podlinijah B2, B4 in B5 število podtipskih različic HPV-6 manjše od 75, smo jih izključili iz statistične analize.

Statistično analizo smo izvedli v dveh delih. V prvem delu smo s pomočjo programa IBM SPSS v22.0 (IBM Corp., 2013) pregledali razporeditev 724 podtipskih različic po naslednjih spremenljivkah: genetske linije, podlinije, celine, države, anatomsko področje okužbe, vrsta benigne spremembe in spol, ter izdelali kontingenčno tabelo (Preglednica 9).

V drugem delu analize smo preverili, ali obstajajo statistično značilne povezave med omenjenimi spremenljivkami in (pod)linijami HPV-6. V ta namen smo izvedli dve statistični analizi: bivariatno logistično regresijo ter izsledke preverili še z multivariatno multinomsko logistično regresijo. Analize smo izvedli s programoma R, različico 3.0.2 (R Core Team, 2014) ter IBM SPSS 22.0 (IBM Corp., 2013). Povezave smo testirali pri stopnji značilnosti $\alpha=0,05$ (dvosmerno testiranje). Rezultate smo izrazili kot razmerja obojov (angl., *odds ratio*, OR) s 95 % intervali zaupanja (angl., *confidence interval*, CI).

3.2.14 Analiza aminokislinskih zaporedij beljakovine L1

Genetsko raznolikost gena L1 HPV-6/-11 smo določali na podlagi poravnave vseh celotnih nukleotidnih zaporedij L1, pridobljenih v naši raziskavi in iz genske banke GenBank. V analizo smo vključili 630 celotnih nukleotidnih zaporedij L1 HPV-6 in 277 celotnih nukleotidnih zaporedij L1 HPV-11. Pridobljena nukleotidna zaporedja smo s pomočjo programa MEGA 5.05 (Tamura in sod., 2011) prevedli v aminokislinska zaporedja. Položaje odkritih nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav smo izrazili glede na položaje nukleotidnih mest v referenčnih genomih HPV-6/-11 (HPV6REF in HPV11REF). Položaj vseh petih površinskih zank in C-terminalni konec beljakovine L1 smo določili glede na predhodno določen položaj površinskih zank BC, DE, EF, FG in HI pri genotipih HPV-16 in HPV-11 (Bishop in sod., 2007).

4 REZULTATI

4.1 HPV-6

Rezultate opredeljevanja genomske raznolikosti genotipa HPV-6 smo razdelili na pet delov. V prvem delu so prikazani rezultati določanja genomske raznolikosti med celotnimi nukleotidnimi zaporedji HPV-6, v drugem delu je predstavljena genetska raznolikost gena L1, v tretjem delu filogenetska analiza podtipskih različic HPV-6 in opredelitev genetskih linij in podlinij, v četrtem delu je prikazana opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev. V petem delu so predstavljeni rezultati statistične analize, s katero smo preverili povezave genetskih (pod)linij z geografskim izvorom, klinično sliko in bolnikovim spolom.

4.1.1 Genomska raznolikost HPV-6

Izmed 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, ki smo jih zbrali za namen naše raziskave, smo 492 (92,8 %) uspeli določiti celotna nukleotidna zaporedja v področjih E5a, E5b, L1 in LCR. Izmed 492 HPV-6-pozitivnih vzorcev smo pri 130 vzorcih (26,4 %) našli nove, še neopisane nukleotidne zamenjave, delecije, insercije ali aminokislinske zamenjave. Omenjenim 130 vzorcem HPV-6 smo določili celotno nukleotidno zaporedje. Vsa celotna nukleotidna zaporedja HPV-6 smo novembra 2013 predložili v evropski nukleotidni arhiv EMBL- EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Nucleotide Archive) in pridobili sledeče pristopne številke: HG793809 – HG793938. V genskih bankah je bilo tako po zaključku naše raziskave objavljenih 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 (vključno z našimi 130 celotnimi nukleotidnimi zaporedji). V prilogi A so podane pristopne številke 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, leto objave, država, kjer so celotno nukleotidno zaporedje opredelili in raziskovalna skupina, ki je celotno zaporedje opredelila.

Na podlagi poravnave 130 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 iz naše raziskave in 60 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, pridobljenih iz genske banke GenBank, smo izračunali maksimalno razliko parov celotnih nukleotidnih zaporedij: 1,58 %. Najkrajše celotno nukleotidno zaporedje je bilo dolgo 7.954 bp in najdaljše 8.051 bp. Celokupno število nukleotidnih zamenjav je bilo 471 (5,85 %) in celokupno število aminokislinskih

zamenjav 165 (6,59 %). Genomska raznolikost vseh 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 je predstavljena v preglednici 8.

Preglednica 8: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6

Table 8: Comparison of nucleotide and amino acid sequence variability within 190 HPV-6 complete genomes

ORF	Maksimalne razlike parov nukleotidnih zaporedij (%)	Število nukleotidov	Število in delež nukleotidnih zamenjav		Število aminokislin	Število in delež aminokislinskih zamenjav	
			N	%		N	%
E6	1,99	453	19	4,19	151	3	1,99
E7	1,68	297	10	3,37	99	4	4,04
NCR1	20,00	5	1	20,00			
E1	1,44	1.950	82	4,21	650	30	4,62
E2	2,26	1.107	60	5,42	396	38	10,30
E4	3,04	330	19	5,76	110	9	8,18
NCR2	3,51	57	4	7,02			
E5a	5,43	276	28	10,14	92	13	14,13
E5b	5,94	219	29	13,24	73	20	27,40
NCR3	9,09	45	7	15,56			
L2	1,52	1.380	82	5,94	460	28	6,09
L1	1,20	1.503	74	4,92	501	20	3,99
LCR	2,61	862	79	9,16			
CG	1,58	8.052	471	5,85	2.505	165	6,59

Legenda: ORF, odprti bralni okvir (angl. *open reading frame*); NCR1, nekodirajoče področje 1 (med E7 in E1 ORF); NCR2, nekodirajoče področje 2 (med E2 in E5a ORF); NCR3, nekodirajoče področje 3 (med E5b in L2 ORF); LCR, nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*); CG, celotni genom.

Iz preglednice 9 je razvidno, da je bil delež nukleotidnih zamenjav najmanjši v E7 ORF (3,37 %) in največji v E5b ORF (13,24 %). Delež aminokislinskih zamenjav je bil najmanjši v E6 ORF (1,99 %) in največji v E5b ORF (27,40 %). Insercije in delecije smo našli le v nekodirajočih področjih: LCR in NCR3, z izjemo 42 bp dolge delecije v E2 ORF pri enem vzorcu HPV-6.

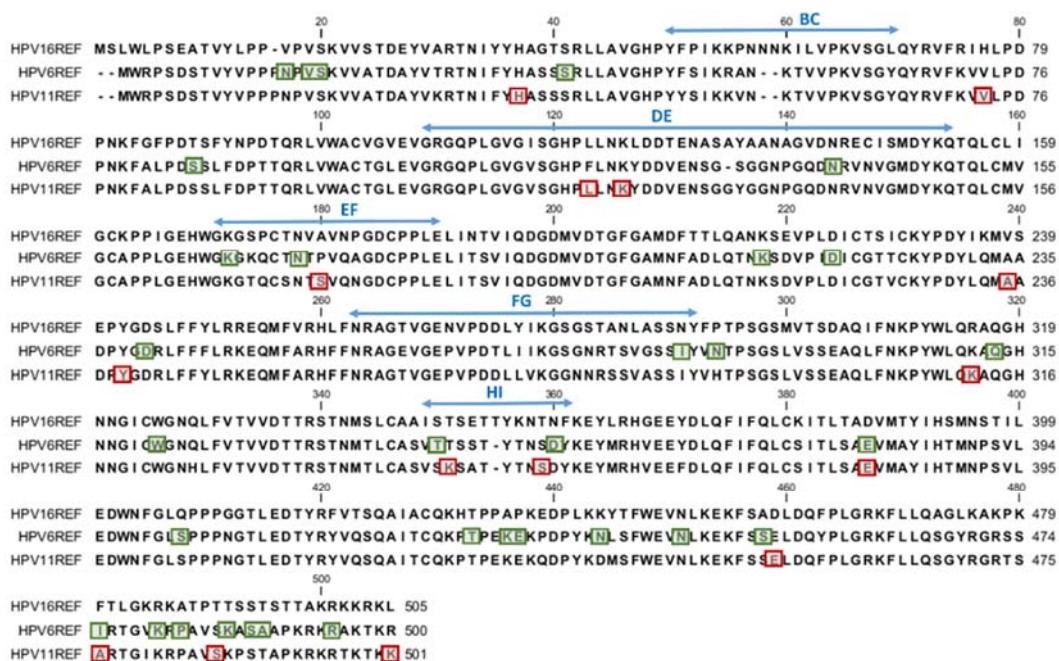
4.1.2 Genetska raznolikost gena L1 HPV-6

Na podlagi analize 190 celotnih nukleotidnih zaporedij L1 HPV-6 smo odkrili 74 (4,92 %) nukleotidnih zamenjav in 20 aminokislinskih zamenjav (3,99 %). Genetska raznolikost L1 ORF med 190 celotnimi nukleotidnimi zaporedji HPV-6 je bila višja v primerjavi z E1 ORF

(4,21 %), E6 ORF (4,19 %) in E7 ORF (3,37 %). Delež aminokislinskih zamenjav je bil, v primerjavi z L1 ORF, nižji samo v E6 ORF (1,99 %) (Preglednica 9).

Na podlagi analize 630 nukleotidnih zaporedij gena L1 podtipskih različic HPV-6, (pridobljenih iz naše raziskave in genske banke GenBank) s šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika), smo odkrili 105 nukleotidnih zamenjav (105/1.503; 6,98 %) in 33 aminokislinskih zamenjav (33/501; 6,58 %). Izmed 33 aminokislinskih zamenjav smo v naši raziskavi opredelili 17 novih aminokislinskih zamenjav (17/33; 51,51 %). Nukleotidne zamenjave smo odkrili po celotni dolžini gena L1, z večjo pojavnostjo v treh genomskih področjih, dolgih 60 do 300 bp, na naslednjih nukleotidnih mestih: 5.923-6.217, 6.598-6.661 in 7.079-7.282. Aminokislinske zamenjave smo prav tako odkrili po celotni dolžini beljakovine L1 (Slika 7). Posamezno aminokislinsko zamenjavo smo odkrili pri enem vzorcu HPV-6 ali pri največ devetih vzorcih HPV-6, z izjemo dveh aminokislinskih zamenjav, ki sta bili prisotni pri več kot devetih vzorcih: K430Q (24/630; 3,81 %) in E431Q (104/630; 16,51 %). Aminokislinska zamenjava K430Q je bila vedno prisotna sočasno z aminokislinsko zamenjavo E431Q. Najpogosteje prisotna aminokislinska zamenjava E431Q je bila prisotna v HPV-6-pozitivnih vzorcih iz vseh celin. Prevladovala je v evropskih vzorcih (54/104; 51,92 %), sledili so azijski (14/104; 13,46 %), južno-ameriški (13/104; 12,50 %), afriški (9/104; 8,65 %), severno-ameriški (8/104; 7,69 %) in avstralski vzorci (6/104; 5,77 %).

Izmed petih površinskih zank, ki predstavljajo glavna prepoznavna mesta za vezavo tipsko-specifičnih nevtralizirajočih protiteles, smo aminokislinske zamenjave našli v štirih zankah: DE (N139D), EF (K169T, N173T), FG (I286V) in HI (T345A, D354N) (Slika 7). V C-terminalnem koncu beljakovine smo zaznali 15 aminokislinskih zamenjav (S402L, T427A, K430Q, E431Q, N438D, N445D, S452A, I475L, K480R, P482S, K486R, S488P, A489V, R495H in R495S).

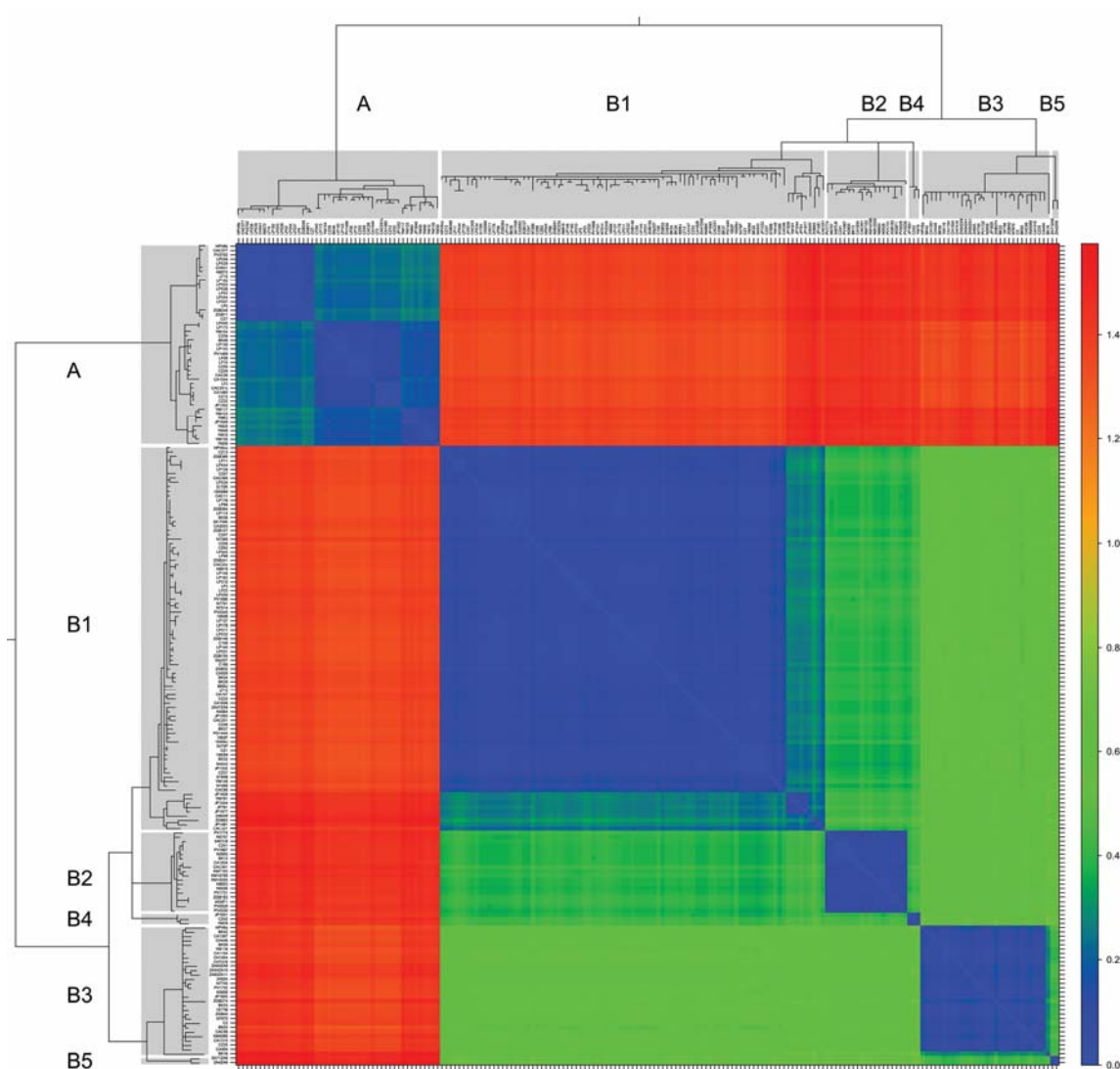


Slika 7: Poravnava aminokislinskega zaporedja beljakovine L1 treh genotipov HPV: HPV-16 (HPV16REF), HPV-6 (HPV6REF) in HPV-11 (HPV11REF). Z modro barvo so označene površinske zanke BC, DE, EF, FG in HI. Z zeleno barvo so označena aminokislinska mesta, kjer smo odkrili aminokislinske zamenjave pri HPV-6-pozitivnih vzorcih in z rdečo barvo mesta, kjer smo odkrili aminokislinske zamenjave pri HPV-11-pozitivnih vzorcih

Figure 7: Sequence alignment of L1 from the HPV genotypes HPV-16 (HPV16REF), HPV-6 (HPV6REF) and HPV-11 (HPV11REF). The surface loops BC, DE, EF, FG and HI are marked with blue, positions of mutated amino acids in HPV-6 samples are marked with green and in HPV-11 samples with red color

4.1.3 Filogenetska analiza podtipskih različic HPV-6 in opredelitev genetskih linij in podlinij

Filogenetska analiza 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 je potrdila obstoj dveh genetskih linij A in B in pokazala obstoj petih podlinij B: B1, B2, B3, B4 in B5 (Slika 8).

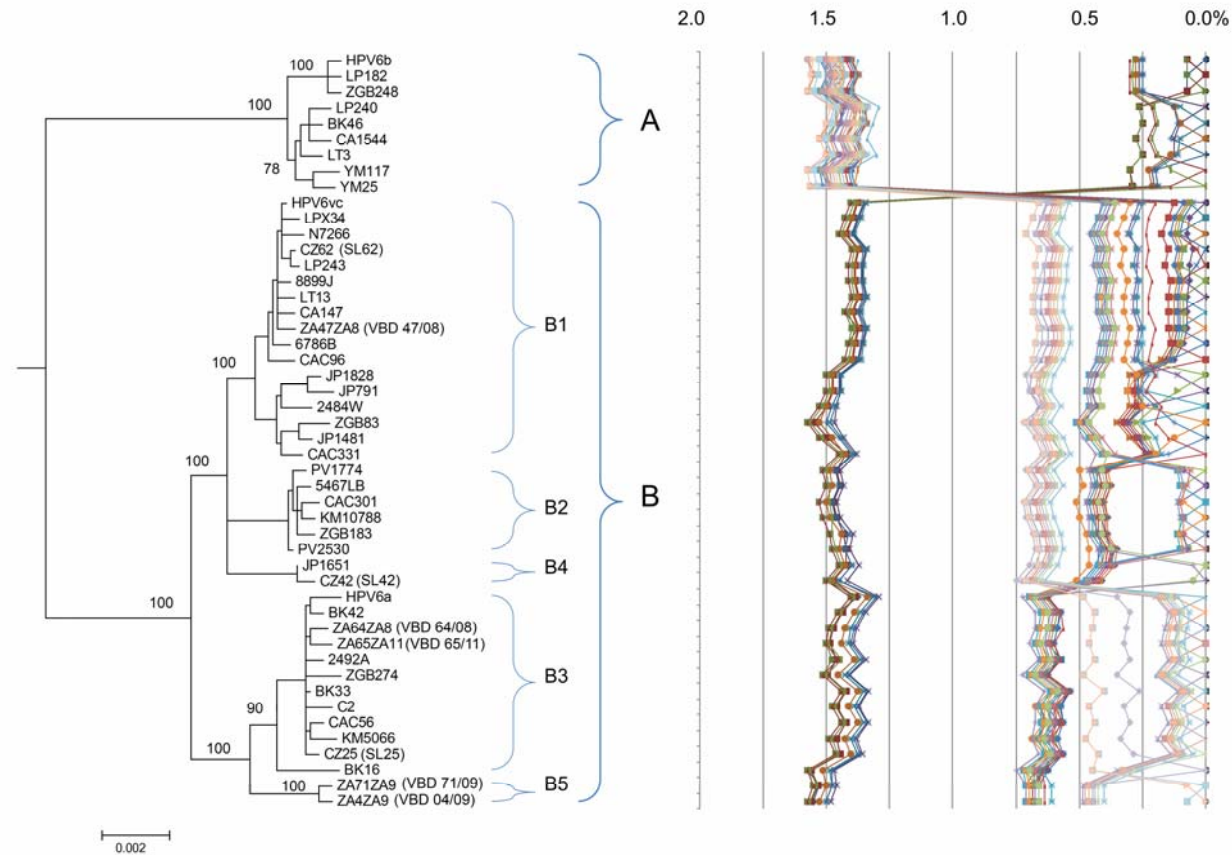


Slika 8: Matrična mapa, izrisana na podlagi 190 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, prikazuje nukleotidne razlike med genetskimi linijami in podlinijami HPV-6
Figure 8: Heatmap, based on 190 HPV-6 complete genomes, showing the nucleotide differences between HPV-6 lineages and sublineages

Slika 8 prikazuje matrično mapo (angl. *heatmap*), kjer barvna skala predstavlja delež medsebojnega nukleotidnega ujemanja oz. odstopanja med vsakim od 190 celotnih nukleotidnih zaporedij. Najmanjše nukleotidno ujemanje je označeno z rdečo barvo (1,6 %) in največje nukleotidno ujemanje z modro barvo (0 %). Genetsko linijo A so sestavljale podtipske različice, sorodne prototipski, referenčni različici HPV-6b (X00203 oz. HPV6REF), v genetsko podlinijo B1 so se uvrstile podtipske različice, sorodne ne-prototipski različici HPV-6vc, medtem ko so se v genetsko podlinijo B3 uvrstile podtipske

različice, sorodne ne-prototipski različici HPV-6a. V genetsko podlinijo B1 se je uvrstilo največ podtipskih različic (89/190, 46,8 %), sledile so: linija A (47/190, 24,7 %), podlinija B3 (30/190, 15,8 %), podlinija B2 (19/190, 10,0 %), podlinija B4 (3/190, 1,6 %) in podlinija B5 (2/190, 1,1 %).

Izmed vseh 190 celotnih nukleotidnih zaporedij smo izbrali najbolj raznolike oz. tiste, pri katerih je analiza parov nukleotidnih zaporedij pokazala, da se v celotnem nukleotidnem zaporedju med seboj razlikujejo v več kot 0,05 %, ali je bilo njihovo nukleotidno zaporedje edinstveno. Tem kriterijem je ustrezalo 48 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6, na podlagi katerih smo prav tako izrisali filogenetsko drevo (Slika 9). Iz slike 9, ki je zaradi manjšega števila vključenih nukleotidnih zaporedij preglednejša, je razvidna razvejitev filogenetskega drevesa v genetski liniji A in B ter pet podlinij B.

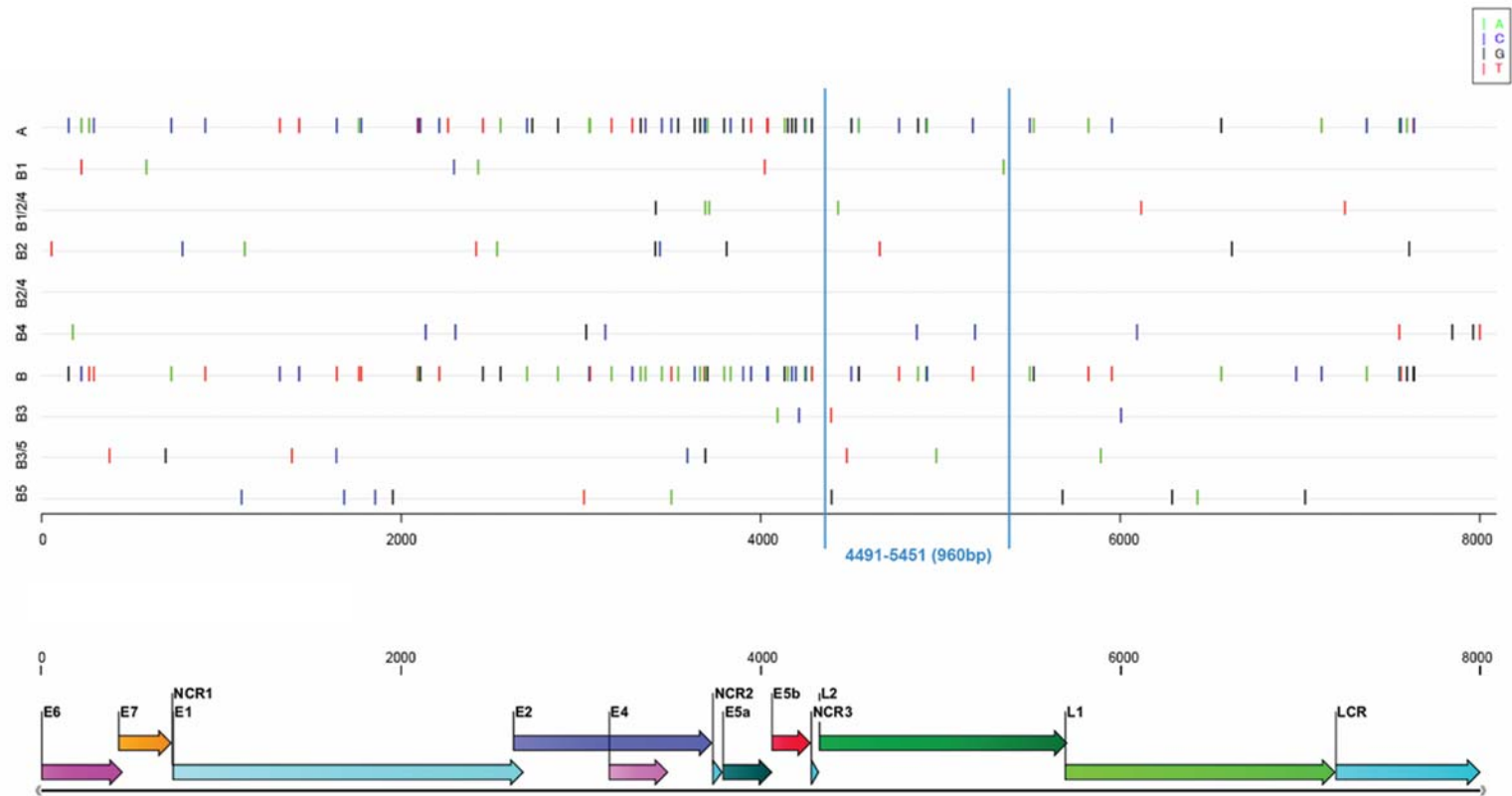


Slika 9: Filogenetsko drevo in razlike parov nukleotidnih zaporedij na podlagi 48 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti. Razlike parov nukleotidnih zaporedij so bile izračunane za vsako celotno nukleotidno zaporedje posebej, v primerjavi z vsemi ostalimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji. Izračunane razdalje za vsako primerjavo so povezane s črtami; primerjava celotnega nukleotidnega zaporedja s samim seboj predstavlja razliko 0 %
Figure 9: Phylogenetic tree and pairwise comparisons of the 48 HPV-6 complete genomes. Numbers alongside branches indicate bootstrap percentage values. The percent nucleotide sequence differences were calculated for each complete genome compared to all other complete genomes. Values for each comparison on a given complete genome are connected by lines and the comparison to self is indicated as 0 % difference point

4.1.4 Opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev

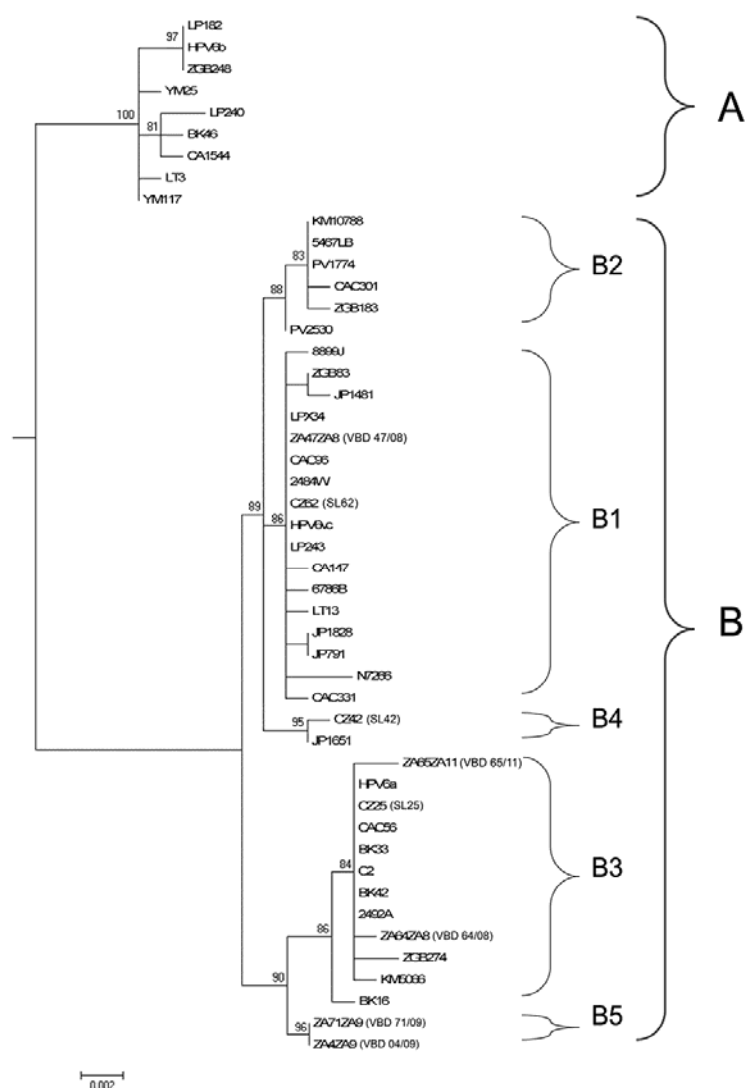
Na podlagi poravnave 48 najbolj raznolikih celotnih nukleotidnih zaporedjih HPV-6 smo določili linijsko in podlinijsko-specifične SNP-je (Slika 10). Iz slike 10 je razvidno, da so linijsko-specifični SNP-ji razporejeni po celotni dolžini nukleotidnega zaporedja in da lahko z določanjem kateregakoli nukleotidnega zaporedja, velikosti približno 500 bp, zagotovo ločimo genetski liniji A in B. Podlinijsko-specifični SNP-ji niso bili razporejeni po celotni dolžini nukleotidnega zaporedja; na primer, SNP-ji, specifični za podlinijo B3, so bili prisotni samo v določenih kodirajočih področjih (E5a, E5b, L2 in L1) in jih nismo dokazali v prvih 4.000 bp nukleotidnega zaporedja.

Na podlagi določenih linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev smo preverili tudi, katero najkrajše nukleotidno zaporedje je dovolj informativno za določanje vseh do sedaj opredeljenih linij in podlinij. Ugotovili smo, da je filogenetsko drevo, izrisano na podlagi poravnanih genov E1, E2 ali L2, prikazalo enako filogenetsko razporeditev kot drevo, izrisano na podlagi celotnih nukleotidnih zaporedij. Izmed vseh treh genov je bilo genomsko področje L2 najbolj primerno za izris filogenetskega drevesa HPV-6, s katerim lahko opredelimo vse genetske (pod)linije HPV-6. Opredelili smo tudi najkrajše možno nukleotidno zaporedje, dolgo 960 bp (nukleotidna mesta v genomu: 4.391-5.351), znotraj gena L2, ki je vsebovalo vsaj en (pod)linijsko specifičen SNP, in je primerno za filogenetsko analizo, s katero želimo določiti vse genetske (pod)linije HPV-6 (Slika 10). Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 960 bp dolgega nukleotidnega zaporedja je prikazano na sliki 11.



Slika 10: Prikaz linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev na podlagi primerjave 48 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6. Položaj SNP-jev, glede na položaj genomskih področij v genomu HPV-6, je prikazan za genetski liniji A in B in podlinije B1, B2, B3, B4 in B5. Na sliki je označeno tudi 960 bp dolgo zaporedje znotraj gena L2, s pomočjo katerega lahko podtypeske različice HPV-6 umestimo v obstoječe genetske linije in podlinije

Figure 10: Lineage and sublineage-specific SNPs identified from comparisons of the 48 HPV-6 complete genomes. SNP positions relative to the HPV-6 genomic regions are displayed across lineages A and B, and sublineages B1, B2, B3, B4 and B5. A 960-bp region for lineage/sublineage identification is marked within gene L2



Slika 11: Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 960 bp dolgega zaporedja znotraj L2 ORF. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti

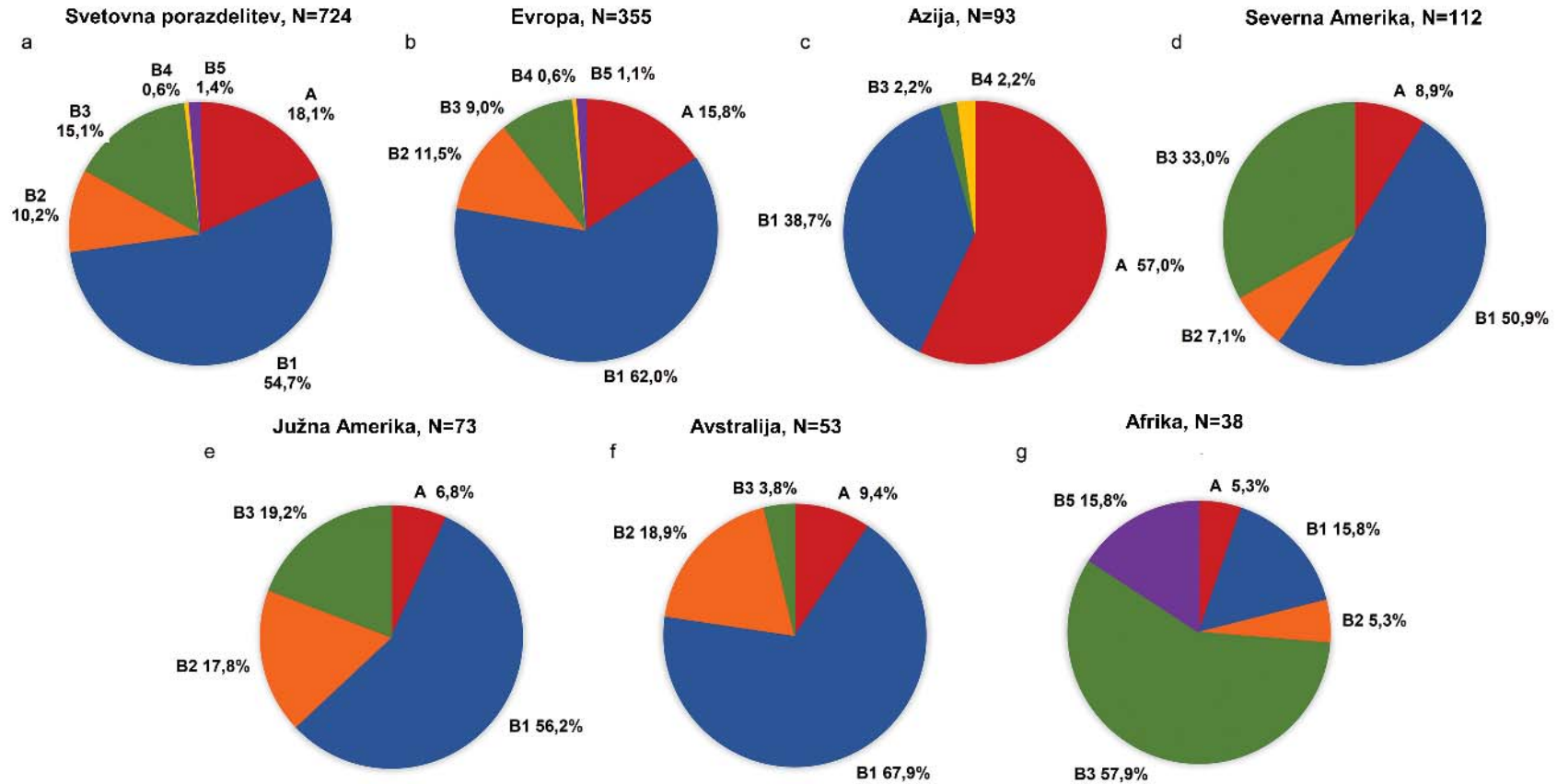
Figure 11: Phylogenetic tree based on 960-bp region within L2 ORF. Numbers alongside branches indicate bootstrap percentage values

4.1.5 Povezave genetskih (pod)linij HPV-6 z geografskim izvorom, anatomskim področjem okužbe in bolnikovim spolom

Iz preglednice 9 je razvidno, da smo v statistično analizo vključili 724 podtipskih različic HPV-6 (pridobljenih iz naše raziskave in genske banke GenBank) iz 18 držav, iz 6 celin. Podatke za posamezno podtipsko različico smo predstavili v prilogi C.

Preglednica 9: Kontingenčna tabela za 724 podtipskih različic HPV-6
Table 9: Contingency table for 724 HPV-6 variants

Celina, država	Genetska linija A in podlinije B						Skupaj (%)
	A (%)	B1 (%)	B2 (%)	B3 (%)	B4 (%)	B5 (%)	
Evropa							
Hrvaška	6 (12,8)	34 (72,3)	2 (4,3)	5 (10,6)	0 (0)	0 (0)	47 (100)
Češka	17 (32,1)	32 (60,4)	2 (3,8)	1 (1,9)	1 (1,9)	0 (0)	53 (100)
Nemčija	2 (4,2)	26 (54,2)	11 (22,9)	9 (18,8)	0 (0)	0 (0)	48 (100)
Litva	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
Srbija	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
Slovenija	16 (14,7)	81 (74,3)	11 (10,1)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	109 (100)
Švedska	2 (20)	2 (20)	5 (50)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	10 (100)
Švica	4 (7,8)	27 (52,9)	5 (9,8)	12 (23,5)	0 (0)	3 (5,9)	51 (100)
Velika Britanija	2 (7,1)	17 (60,7)	5 (17,9)	2 (7,1)	1 (3,6)	1 (3,6)	28 (100)
Azija							
Hong Kong	36 (69,2)	14 (26,9)	0 (0)	1 (1,9)	1 (1,9)	0 (0)	52 (100)
Japonska	16 (42,1)	20 (52,6)	0 (0)	1 (2,6)	1 (2,6)	0 (0)	38 (100)
Malezija	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
Severna Amerika							
Kanada	7 (10,6)	34 (51,5)	7 (10,6)	18 (27,3)	0 (0)	0 (0)	66 (100)
ZDA	3 (6,5)	23 (50)	1 (2,2)	19 (41,3)	0 (0)	0 (0)	46 (100)
Južna Amerika							
Argentina	4 (7,3)	29 (52,7)	13 (23,6)	9 (16,4)	0 (0)	0 (0)	55 (100)
Brazilija	1 (5,6)	12 (66,7)	0 (0)	5 (27,8)	0 (0)	0 (0)	18 (100)
Avstralija							
Avstralija	5 (9,4)	36 (67,9)	10 (18,9)	2 (3,8)	0 (0)	0 (0)	53 (100)
Afrika							
Južna Afrika	2 (5,3)	6 (15,8)	2 (5,3)	22 (57,9)	0 (0)	6 (15,8)	38 (100)
Skupaj	131 (18,1)	396 (54,7)	74 (10,2)	109 (15,1)	4 (0,6)	10 (1,4)	724 (100)
Anatomsko področje							
Anogenitalno področje	87 (17,4)	287 (57,3)	53 (10,6)	68 (13,6)	3 (0,6)	3 (0,6)	501 (100)
Področje glave in vratu	38 (21,5)	84 (47,5)	17 (9,6)	30 (16,9)	1 (0,6)	7 (4,0)	177 (100)
Skupaj	125 (18,4)	371 (54,7)	70 (10,3)	98 (14,5)	4 (0,6)	10 (1,5)	678 (100)
Vrsta benigne spremembe							
Anogenitalne bradavice	71 (26,2)	165 (60,9)	21 (7,7)	10 (3,7)	3 (1,1)	1 (0,4)	271 (100)
Papilomi grla	38 (21,6)	83 (47,2)	17 (9,7)	30 (17,0)	1 (0,6)	7 (4,0)	176 (100)
Skupaj	109 (24,4)	248 (55,5)	38 (8,5)	40 (8,9)	4 (0,9)	8 (1,8)	447 (100)
Spol							
Ženske	44 (14,1)	169 (54,0)	33 (10,5)	62 (19,8)	1 (0,3)	4 (1,3)	313 (100)
Moški	62 (23,9)	149 (57,5)	26 (10,0)	19 (7,3)	2 (0,8)	1 (0,4)	259 (100)
Skupaj	106 (18,5)	318 (55,6)	59 (10,3)	81 (14,2)	3 (0,5)	5 (0,9)	572 (100)



Slika 12: Geografska porazdelitev linije A in podlinij B1, B2, B3, B4 in B5, na podlagi analize 724 podtipskih različic HPV-6. Svetovna porazdelitev (a), porazdelitev v Evropi (b), v Aziji (c), v Severni Ameriki (d), v Južni Ameriki (e), v Avstraliji (f) in v Afriki (g)

Figure 12: Worldwide and continental distribution of lineage A and sublineages B1, B2, B3, B4 and B5, according to the analysis on 724 HPV-6 genetic variants. Worldwide distribution (a), distribution for Europe (b), Asia (c), North America (d), South America (e), Australia (f) and Africa (g)

Slika 12 prikazuje svetovno geografsko porazdelitev genetske linije A in podlinij B1, B2, B3, B4 in B5, na podlagi analize 724 HPV-6 podtipskih različic, ki smo jih vključili v statistično analizo. Na svetovnem nivoju so prevladovali podtipe različice iz genetske linije B (593/724; 81,9 %), z izjemo Azije, kjer so prevladovali podtipe različice iz genetske linije A (53/93; 57,0 %). Med podlinijami B je na svetovnem nivoju prevladovala podlinija B1 (396/724; 54,7 %), kateri je sledila podlinija B3 (109/724; 15,1 %), ki je bila, v primerjavi z drugimi celinami, najbolj pogosta v Afriki (22/38; 57,9 %). Podtipe različice iz podlinije B2 so bile prisotne na vseh celinah, razen v Aziji, medtem ko so bile podtipe različice iz podlinije B4 najdene samo v Evropi in Aziji ter podtipe različice iz podlinije B5 v Evropi in Afriki.

Bivariatna logistična regresija, s katero smo preverjali povezave med celinami in genetskimi (pod)linijami HPV-6, je pokazala, da obstaja statistično značilna razlika v svetovni razporeditvi genetskih linij A in B: (1) podtipe različice HPV-6 iz Azije so imele v primerjavi s podtipskimi različicami iz Evrope nižje obete za genetsko linijo B kot za genetsko linijo A ($p < 0,001$); (2) podtipe različice HPV-6 iz Afrike in Severne ter Južne Amerike so imele v primerjavi z Evropo višje obete za podlinijo B3 kot za genetsko linijo A ($p < 0,05$ za vsako primerjavo posebej). Z multivariatno multinomsko logistično regresijo smo potrdili vse rezultate bivariatne logistične regresije (Preglednica 10).

Preglednica 10: Statistične povezave na podlagi multivariatne logistične regresije med genetskima linijama B in A (binomski model), podlinijama B1 in B3 ter linijo A (multinomski model), celinami, anatomskim področjem okužbe in bolnikovim spolom

Table 10: Multivariate logistic regression associations among continents anatomical location of infection and gender for lineages A and B (binomial model) and sublineages B1, B3 and lineage A (multinomial model)

	Binomski model		Multinomski model			
	B / A		B1 / A		B3 / A	
Lastnosti (referenčna kategorija)	OR (95 % CI)	<i>p</i>	OR (95 % CI)	<i>p</i>	OR (95 % CI)	<i>p</i>
Celina (Evropa)						
Afrika	2,18 (0,45–10,47)	0,331	0,19 (0,02–2,25)	0,189	29,84 (4,73–188,36)	<0,001
Azija	0,09 (0,05–0,17)	<0,001	0,12 (0,06–0,22)	<0,001	0,04 (0,01–0,19)	<0,001
Avstralija	5,5 (0,72–42,28)	0,101	6,23 (0,81–48,21)	0,080	2,81 (0,23–33,88)	0,416
Severna Amerika	1,34 (0,43–4,12)	0,614	0,9 (0,28–2,89)	0,856	4,39 (1,28–15,04)	0,018
Južna Amerika	2,29 (0,86–6,11)	0,098	1,99 (0,73–5,47)	0,180	5,76 (1,77–18,76)	0,004
Spol (moški)						
Ženske	1,57 (0,95–2,60)	0,080	1,49 (0,88–2,50)	0,134	2,89 (1,30–6,41)	0,009
Anatomsko področje okužbe (področje glave in vratu)						
Anogenitalno področje	2,51 (1,30–4,83)	0,006	2,12 (1,09–4,14)	0,027	4,77 (1,61–14,18)	0,005

Legenda: Rezultati so podani z razmerji obetov (OR), pripadajočimi 95 % intervali zaupanja (95 % CI) ter *p*-vrednostjo (*p*)

Iz preglednice 10 je razvidno, da so imele podtipske različice HPV-6 iz Azije, v primerjavi z Evropo, nižje obete za genetsko linijo B, kot za genetsko linijo A ($p < 0,001$). Dodatno smo pokazali, da so imele podtipske različice iz podlinije B3 več kot 4-krat višje obete ($p < 0,05$ za vse primerjave) kot podtipske različice iz linije A, da jih dokažemo v afriških in ameriških vzorcih, v primerjavi z evropskimi vzorci (Preglednica 10).

Bivariatna logistična regresija, s katero smo primerjali povezave med anatomskim področjem okužbe (anogenitalno področje in področje glave in vratu) in genetskimi (pod)linijami HPV-6, je pokazala, da so imele podtipske različice iz genetske linije B sicer višje obete za anogenitalne okužbe kot podtipske različice iz genetske linije A, vendar povezava v bivariatnem modelu ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). V multivariatnem multinomskem logističnem modelu se je omenjena povezava izkazala za statistično značilno ($p < 0,05$). Multivariatna analiza je dodatno pokazala, da obstaja statistično značilna povezava med anogenitalnimi okužbami s podtipskimi različicami iz podlinij B1 in B3

($p < 0,05$ za obe primerjavi), v primerjavi s podtipskimi različicami iz linije A (Preglednica 10).

Nazadnje smo preverili tudi povezave med bolnikovim spolom in posameznimi (pod)linij HPV-6 in pokazali, tako z bivariatno, kot tudi z multivariatno analizo, da imajo ženske približno 3-krat višje obete za okužbo s podtipskimi različicami iz podlinije B3 kot moški ($p < 0,05$) (Preglednica 10).

4.2 HPV-11

Rezultate opredeljevanja genomske raznolikosti genotipa HPV-11 smo razdelili na štiri dele. V prvem delu so prikazani rezultati določanja genomske raznolikosti med celotnimi nukleotidnimi zaporedji HPV-11, v drugem delu je predstavljena genetska raznolikost gena L1, v tretjem delu filogenetska analiza podtipskih različic HPV-11 in opredelitev genetskih linij in podlinij ter v četrtem delu opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev.

4.2.1 Genomska raznolikost HPV-11

Izmed 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev, ki smo jih zbrali za namen naše raziskave, smo 181 (87,4 %) uspeli določiti celotna nukleotidna zaporedja v področjih E5a, E5b, L1 in LCR. Izmed 181 HPV-11-pozitivnih vzorcev smo pri 14 vzorcih (7,7 %) našli nove, še neopisane nukleotidne zamenjave, delecije, insercije ali aminokislinske zamenjave. Omenjenim 14 vzorcem HPV-11 smo določili celotno nukleotidno zaporedje. V prilogi B so podane pristopne številke 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, imena 14 HPV-11-pozitivnih vzorcev, katerim smo v naši raziskavi opredelili celotno nukleotidno zaporedje (še niso objavljena), leto objave, država, kjer so celotno nukleotidno zaporedje opredelili in raziskovalna skupina, ki je celotno zaporedje opredelila.

Na podlagi poravnave 14 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 iz naše raziskave in 49 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, pridobljenih iz genske banke GenBank, smo izračunali maksimalno razliko parov celotnih nukleotidnih zaporedij: 1,40 %. Najkrajše celotno nukleotidno zaporedje je bilo dolgo 7.930 bp in najdaljše 10.424 bp. Celokupno število nukleotidnih zamenjav je bilo 227 (2,86 %) in celokupno število aminokislinskih

zamenjav 67 (2,80 %). Genomska raznolikost vseh 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 je predstavljena v preglednici 11.

Preglednica 11: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zamenjav 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11

Table 11: Comparison of nucleotide and amino acid sequence variability within 63 HPV-11 complete genomes

ORF	Maksimalne razlike parov nukleotidnih zaporedij (%)	Število nukleotidov	Število in delež nukleotidnih zamenjav		Število aminokislin	Število in delež aminokislinskih zamenjav	
			N	%		N	%
E6	1,98	453	15	3,31	151	7	4,64
E7	1,01	297	4	1,34	99	3	3,03
NCR1	0	5	0	0			
E1	0,87	1.950	34	1,74	650	10	1,54
E2	1,72	1.104	32	2,90	368	12	3,26
E4	2,14	327	10	3,06	109	9	8,26
NCR2	4,55	44	3	6,82			
E5a	2,17	276	11	3,99	92	8	8,70
E5b	2,67	225	11	4,89	75	5	6,67
NCR3	4,34	46	2	4,35			
L2	1,46	1.368	35	2,56	456	10	2,19
L1	0,86	1.506	33	2,19	502	13	2,59
LCR	4,38	759	47	6,19			
CG	1,40	7.933	227	2,86	2.392	67	2,80

Legenda: ORF, odprti bralni okvir (angl. *open reading frame*); NCR1, nekodirajoče področje 1 (med E7 in E1 ORF); NCR2, nekodirajoče področje 2 (med E2 in E5a ORF); NCR3, nekodirajoče področje 3 (med E5b in L2 ORF); LCR, nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*); CG, celotni genom.

Iz preglednice 11 je razvidno, da je bil delež nukleotidnih zamenjav najmanjši v E7 ORF (1,34 %) in največji v E5b ORF (4,89 %). Delež aminokislinskih zamenjav je bil najmanjši v E1 ORF (1,54 %) in največji v E5a ORF (8,70 %). Insercije in delecije smo našli v nekodirajočem področju LCR, z izjemo delecije 1 bp v E6 ORF pri enem vzorcu HPV-11 in insercije 9 bp v L2 ORF pri enem vzorcu.

4.2.2 Genetska raznolikost gena L1 HPV-11

Na podlagi analize 63 celotnih nukleotidnih zaporedij L1 HPV-11 smo odkrili 33 (2,19 %) nukleotidnih zamenjav in 13 aminokislinskih zamenjav (2,59 %). Genetska raznolikost L1 ORF med 63 celotnimi nukleotidnimi zaporedji HPV-11 je bila višja v primerjavi z E1 ORF

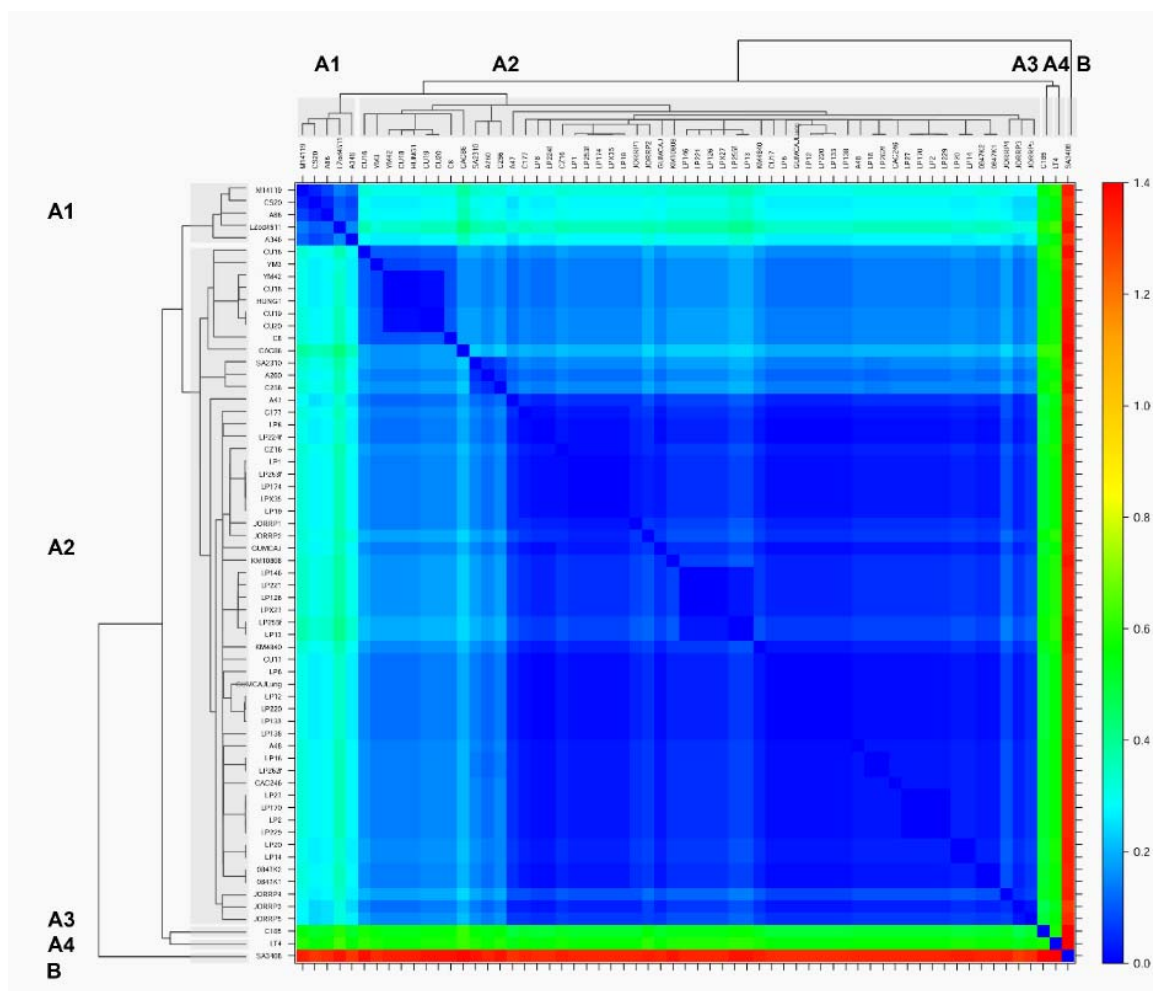
(1,74 %) in E7 ORF (1,34 %). Delež aminokislinskih zamenjav je bil v primerjavi z L1 ORF nižji v L2 ORF (2,19 %) in E1 ORF (1,54 %) (Preglednica 11).

Na podlagi analize 277 nukleotidnih zaporedij gena L1 podtipskih različic HPV-11 (pridobljenih iz naše raziskave in genske banke GenBank) s šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika), smo odkrili 48 nukleotidnih zamenjav (48/1.506; 3,18 %) in 16 aminokislinskih zamenjav (16/502; 3,18 %). Izmed 16 odkritih aminokislinskih zamenjav smo v naši raziskavi opredelili 10 novih aminokislinskih zamenjav (10/16; 62,50 %). Nukleotidne zamenjave smo odkrili po celotni dolžini gena L1, z večjo pojavnostjo v dveh področjih, na naslednjih nukleotidnih mestih: 6.028 in 6.484-6.607. Aminokislinske zamenjave smo prav tako odkrili po celotni dolžini beljakovine L1 (Slika 7). Posamezno aminokislinsko zamenjavo smo odkrili le pri enem vzorcu HPV-11 ali pri največ štirih vzorcih HPV-11, z izjemo ene aminokislinske zamenjave, ki je bila prisotna pri več kot štirih vzorcih: A235S (7/277; 2,52 %). Najpogosteje prisotna aminokislinska zamenjava A235S je bila prisotna samo pri vzorcih HPV-11 iz Evrope (iz Slovenije).

Izmed petih površinskih zank, ki predstavljajo glavna prepoznavna mesta za vezavo tipsko-specifičnih nevtralizirajočih protiteles, smo aminokislinske zamenjave našli v treh zankah: DE (L119V, K122R), EF (S176T) in HI (K347T, S354L, S354A) (Slika 7). V C-terminalnem koncu beljakovine L1 smo zaznali 4 aminokislinske zamenjave (E454A, A476V, S486F in K501T).

4.2.3 Filogenetska analiza podtipskih različic HPV-11 in opredelitev genetskih linij in podlinij

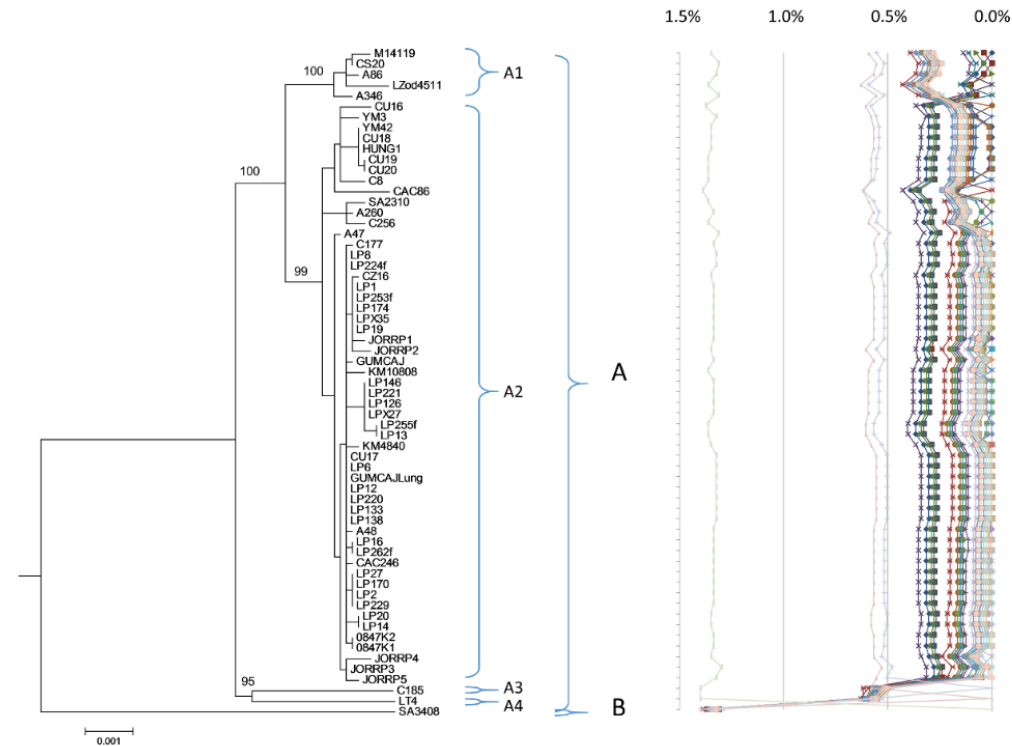
Filogenetska analiza 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 je potrdila obstoj dveh genetskih linij A in B in pokazala obstoj štirih podlinij A: A1, A2, A3 in A4 (Slika 13). Slika 13 prikazuje filogenetsko drevo in matrično mapo (angl. *heatmap*), kjer barvna skala predstavlja delež medsebojnega nukleotidnega ujemanja oz. odstopanja med vsakim od 63 celotnih nukleotidnih zaporedij. Najmanjše nukleotidno ujemanje je označeno z rdečo barvo (1,4 %) in največje nukleotidno ujemanje z modro barvo (0 %).



Slika 13: Matrična mapa, izrisana na podlagi 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, prikazuje nukleotidne razlike med genetskimi linijami in podlinijami HPV-11

Figure 13: Heatmap, based on 63 HPV-11 complete genomes, showing the nucleotide differences between HPV-11 lineages and sublineages

V genetsko podlinijo A1 se je uvrstilo 5 (5/63; 7,94 %) podtiskih različic, ki so sorodne prototipski, referenčni različici HPV-11 (M14119 oz. HPV11REF), v genetsko podlinijo A2 se je uvrstilo največ podtiskih različic HPV-11, (55/63, 87,30 %), medtem ko so se 3 različne podtiske različice HPV-11 uvrstile v podliniji A3 in A4 ter linijo B (Slika 14).



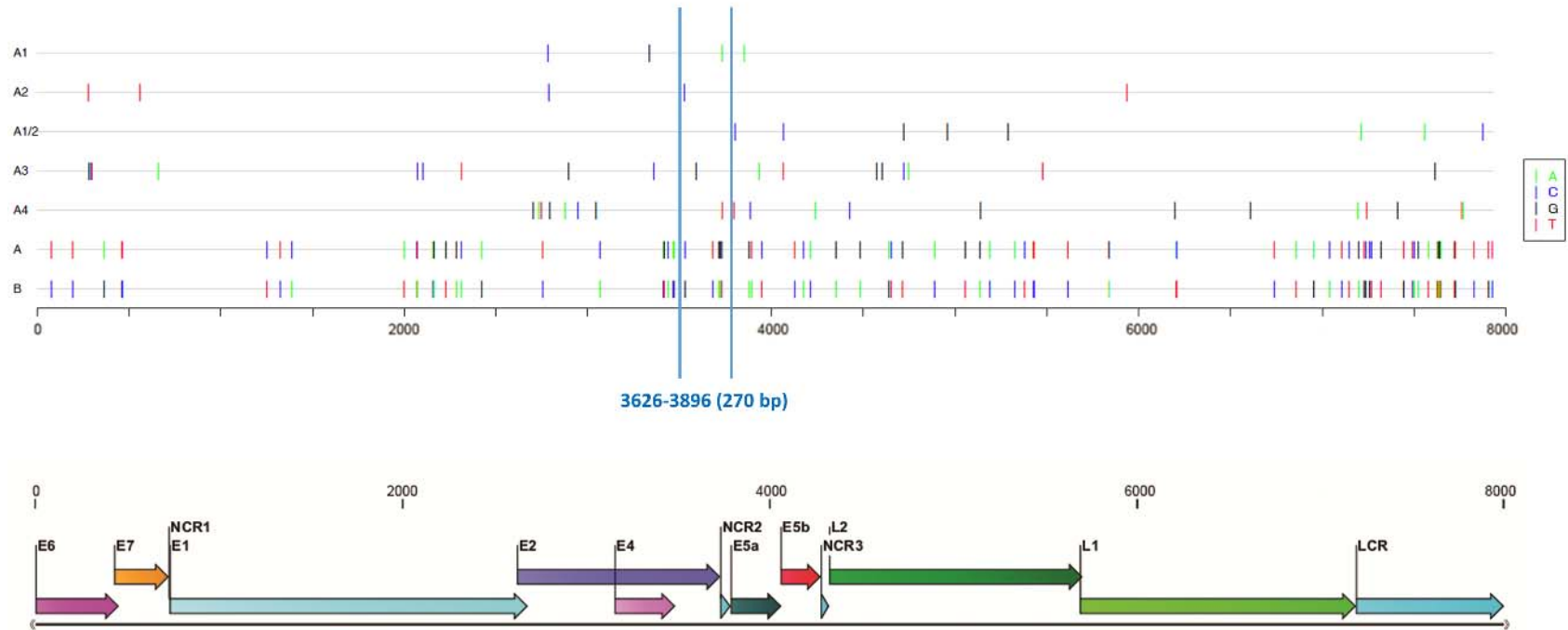
Slika 14: Filogenetsko drevo in razlike parov nukeotidnih zaporedij na podlagi 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti. Razlike parov nukleotidnih zaporedij so bile izračunane za vsako celotno nukleotidno zaporedje posebej, v primerjavi z vsemi ostalimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji. Izračunane razdalje za vsako primerjavo so povezane s črtami; primerjava celotnega nukleotidnega zaporedja s samim seboj predstavlja razliko 0 %

Figure 14: Phylogenetic tree and pairwise comparisons of the 63 HPV-11 complete genomes. Numbers alongside branches indicate bootstrap percentage values. The percent nucleotide sequence differences were calculated for each complete genome compared to all other complete genomes. Values for each comparison on a given complete genome are connected by lines and the comparison to self is indicated as 0 % difference point

4.2.4 Opredelitev linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev

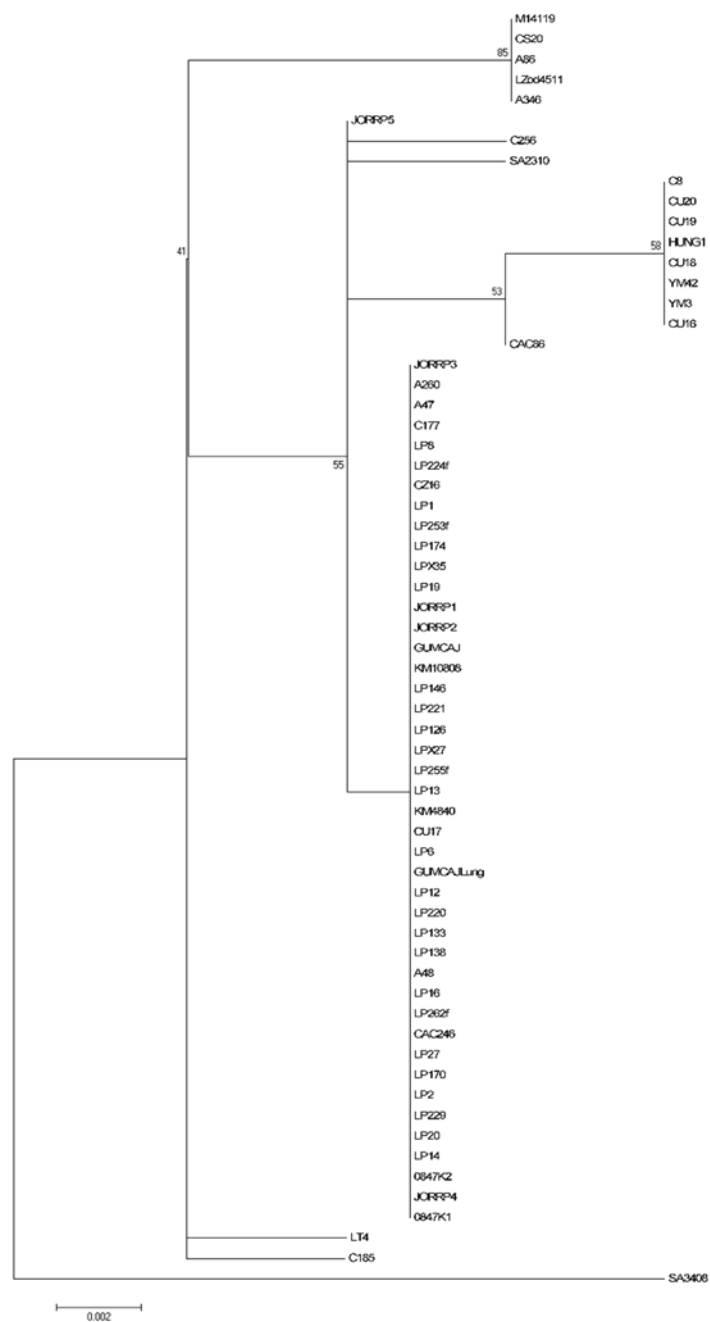
Na podlagi poravnave 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 smo določili linijsko in podlinijsko-specifične SNP-je (Slika 15). Iz slike 15 je razvidno, da so linijsko-specifični SNP-ji razporejeni po celotni dolžini nukleotidnega zaporedja in da lahko z določanjem kateregakoli nukleotidnega zaporedja, velikosti približno 500-1.000 bp, zagotovo ločimo genetski liniji A in B. Podlinijsko-specifični SNP-ji niso bili razporejeni po celotni dolžini nukleotidnega zaporedja; na primer, SNP-ji, specifični za podlinijo A1, so bili prisotni samo v določenih kodirajočih področjih in jih nismo dokazali v prvih 2.500 bp nukleotidnega zaporedja.

Na podlagi določenih linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev smo preverili tudi, katero najkrajše nukleotidno zaporedje je dovolj informativno za določanje vseh do sedaj opredeljenih linij in podlinij HPV-11. Ugotovili smo, da je filogenetsko drevo, izrisano na podlagi poravnanih nukleotidnih zaporedij E2, L2 ali LCR, prikazalo enako filogenetsko razporeditev kot drevo, izrisano na podlagi celotnih nukleotidnih zaporedij. Izmed vseh treh zaporedij sta bila gen L2 in nekodirajoče področje LCR najbolj primerna za izris filogenetskega drevesa HPV-11, s katerim lahko opredelimo vse genetske (pod)linije HPV-11. Opredelili smo tudi najkrajše možno nukleotidno zaporedje: 270 bp (nukleotidna mesta v genomu: 3.626-3.896) znotraj 3'-konca gena E2, nekodirajočega področja 2 (NCR2) in 5'-konca gena E5a, ki je vsebovalo vsaj en (pod)linijsko specifičen SNP in je primerno za filogenetsko analizo, s katero želimo določiti vse genetske (pod)linije HPV-11 (Slika 15). Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 270 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, je prikazano na sliki 16.



Slika 15: Prikaz linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev na podlagi primerjave 63 celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11. Položaj SNP-jev, glede na položaj genomskih področij v genomu HPV-11, je prikazan za genetski liniji A in B in podlinije A1, A2, A3 in A4. Na sliki je označeno tudi 270 bp dolgo zaporedje znotraj področja E2-NCR2-E5a, s pomočjo katerega lahko podtipske različice HPV-11 umestimo v obstoječe genetske linije in podlinije

Figure 15: Lineage and sublineage-specific SNPs identified from comparisons of the 63 HPV-11 complete genomes. SNP positions relative to the HPV-11 genomic regions are displayed across lineages A and B, and sublineages A1, A2, A3 and A4. A 270-bp region for lineage/sublineage identification is marked within E2-NCR2-E5a region



Slika 16: Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 270 bp dolgega zaporedja znotraj genomskega področja E2-NCR2-E5a. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti
Figure 16: Phylogenetic tree based on 270-bp region within E2-NCR2-E5a genomic region. Numbers alongside branches indicate bootstrap percentage values

5 RAZPRAVA

HPV-6/-11 povzročata več kot 90 % vseh anogenitalnih bradavic in papilomov grla na svetu. Skupaj z visokorizičnima genotipoma HPV-16/-18 sta vključena v štirivalentno in nonavalentno cepivo proti HPV. Večina predhodnih raziskav genetske raznolikosti cepilnih genotipov je bila usmerjena v proučevanje visokorizičnih genotipov HPV-16/-18 (De Boer in sod., 2005; Schiffman in sod., 2005; Sichero in sod., 2007; Xi in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Cornet in sod., 2013). Številne raziskave so pokazale, da se virusne podtipe različice obeh genotipov filogenetsko združujejo glede na njihov geografski izvor in jih v primeru HPV-16 delimo v: evropske, azijske, azijsko-ameriške in afriške podtipe različice HPV-16 in v primeru HPV-18: evropske, afriške in azijsko-ameriške podtipe različice HPV-18 (Ho in sod., 1993; Ong in sod., 1993; Bernard in sod., 2006; Smith in sod., 2011). Raziskave genetske raznolikosti visokorizičnih genotipov HPV so pokazale, da obstajajo povezave med stopnjo patogenosti podtiskih različic ter njihovim geografskim poreklom (Sichero in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Xi in sod., 2007). V primerjavi z visokorizičnimi genotipi HPV je poznavanje genetske raznolikosti nizkorizičnih HPV-6/-11 zelo omejeno. Leta 1995 so Heinzl in sodelavci (1995) objavili prvo raziskavo, v kateri so poskusili opredeliti genetsko raznolikost HPV-6/-11 na svetovnem nivoju. Raziskava je temeljila na manjšem odseku genoma (manj kot 300 bp) (Heinzl in sod., 1995). V zadnjih petih letih so k poznavanju genomske raznolikosti HPV-6/-11 pomembno prispevale tri dodatne, obsežnejše raziskave, v katerih je naša raziskovalna skupina prvič opredelila genomsko raznolikost obeh genotipov na podlagi analize celotnega nukleotidnega zaporedja (Kocjan in sod., 2011; Maver in sod., 2011; Kocjan in sod., 2013). Celokupen prispevek vseh treh raziskav je bila opredelitev 47 (47/60; 78 %) celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 in 34 (34/49; 69 %) celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11, kar predstavlja več kot polovico vseh do takrat opredeljenih celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6/-11. V raziskavah, ki so sledile, je genetska analiza temeljila le na določenih odsekih virusnega genoma (L1, E5a, E5b, E6, E7 in LCR) (Combrinck in sod., 2012; Danielewski in sod., 2013; de Matos in sod., 2013; Fujs Komloš in sod., 2013; Godinez in sod., 2014).

5.1 GENOMSKA RAZNOLIKOST HPV-6/-11

V našo raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev iz 15 držav in 207 HPV-11-pozitivnih vzorcev iz 13 držav, ki so pokrivalo šest celin: Evropo, Azijo, Severno in Južno Ameriko, Avstralijo in Afriko. HPV-6/-11-pozitivni vzorci so bili odvzeti ženskam in moškim iz anogenitalnega področja, področja glave in vratu ter drugih in/ali neopredeljenih anatomskih področij okužbe.

Na podlagi analize celotnih, združenih nukleotidnih zaporedij E5a, E5b, L1 in LCR HPV-6/-11 smo izbrali tiste vzorce HPV-6/-11, ki so v omenjenih genomskih področjih vsebovali nove, še neopisane nukleotidne zamenjave, delecije, insercije ali aminokislinske zamenjave in jim določili celotno nukleotidno zaporedje.

Celotno nukleotidno zaporedje smo določili 130 podtipskim različicam HPV-6 in 14 podtipskim različicam HPV-11. Vsa celotna nukleotidna zaporedja iz naše raziskave in genske banke GenBank smo združili in opredelili genomsko raznolikost 190 celotnim nukleotidnim zaporedjem HPV-6 in 63 celotnim nukleotidnim zaporedjem HPV-11. V predhodno objavljenih raziskavah so pokazali, da je genomska raznolikost HPV-6, v primerjavi s HPV-11, približno tri- do štiri-krat večja (Burk in sod., 2011; Godinez in sod., 2014). V naši raziskavi, v kateri smo med seboj primerjali do sedaj največje število celotnih nukleotidnih zaporedij podtipskih različic HPV-6/-11, pridobljenih iz držav po vsem svetu, smo pokazali, da genomska raznolikost HPV-6 (1,6 %) ni bistveno večja, v primerjavi s HPV-11 (1,4 %). V primerjavi z genomsko raznolikostjo najpomembnejših visokorizičnih genotipov HPV-16 (2,3 %) in HPV-18 (2,1 %) je bila genomska raznolikost HPV-6 (1,6 %) in HPV-11 (1,4 %) znatno manjša (Smith in sod., 2011; Chen in sod., 2013). V primerjavi z genotipi HPV, ki so sorodni HPV-16/-18, je bila genomska raznolikost HPV-6 in HPV-11 primerljiva z genomsko raznolikostjo genotipov: HPV-45 (1,5 %), HPV-70 (1,6 %), HPV-31 (1,4 %) in HPV-58 (1,7 %) (Chen in sod., 2011; Chen in sod., 2013).

Genetska raznolikost v posameznih kodirajočih in nekodirajočih področjih je bila prav tako večja pri HPV-6 kot pri HPV-11. V primerjavi s predhodnimi raziskavami je bila genetska raznolikost obeh genotipov tudi v naši raziskavi največja v nekodirajočih zaporedjih in genih E5a in E5b (Kocjan in sod., 2009; Kocjan in sod., 2011; Maver in sod., 2011). Delež aminokislinskih zamenjav v posameznih ORF-jih se je med genotipoma razlikoval: pri HPV-6 smo največji delež aminokislinskih zamenjav opredelili v E5b ORF (14,13 %) in

najmanjši v E6 ORF (1,99 %), medtem ko smo pri HPV-11 največji delež aminokislinskih zamenjav opredelili v E5a ORF (8,70 %) in najmanjši v E1 ORF (1,54 %). V naši raziskavi smo pokazali, da je genetska raznolikost HPV-6 v posameznih kodirajočih in nekodirajočih področjih približno dva-krat večja v primerjavi s HPV-11.

5.1.1 Genetska raznolikost gena L1 pri HPV-6/-11-pozitivnih vzorcih

Na podlagi medsebojne primerjave 630 nukleotidnih zaporedij L1, pridobljenih iz podtipskih različic HPV-6 iz celega sveta, smo največ nukleotidnih zamenjav odkrili v treh področjih, dolgih približno 60 do 300 bp, in potrdili izsledke predhodnih raziskav (Caparros-Wanderley in sod., 1999; Ahmed in sod., 2013). Na podlagi medsebojne primerjave 277 nukleotidnih zaporedij L1, pridobljenih iz podtipskih različic HPV-11 iz celega sveta, smo odkrili največ nukleotidnih zamenjav v dveh področjih, dolgih do 100 bp, in prav tako potrdili izsledke predhodnih raziskav (Maver in sod., 2011; Ahmed in sod., 2013).

V naši raziskavi smo opredelili tudi razporeditev aminokislinskih zamenjav v beljakovini L1 ter pokazali, da so aminokislinske zamenjave prisotne v površinskih, imunogenih zankah, ki so pomembne za vezavo tipsko-specifičnih nevtralizirajočih protiteles proti HPV-6/-11 (Ahmed in sod., 2013). Izmed 33 aminokislinskih zamenjav, ki smo jih odkrili pri HPV-6, je bilo 11 prisotnih v štirih površinskih zankah DE, EF, FG, HI in C-terminalnem koncu beljakovine. V primerjavi z izsledki predhodnih raziskav je bila aminokislinska zamenjava E431Q tudi v naši raziskavi najpogostejša in je prevladovala v evropskih različicah HPV-6 (Kocjan in sod., 2009; Ahmed in sod., 2013). Aminokislinska zamenjava E431Q naj ne bi vplivala na stabilnost VLP-jev, ki predstavljajo glavno komponento cepiv proti HPV (Caparros-Wanderley in sod., 1999). Med aminokislinskimi zaporedji L1 različic HPV-11 smo odkrili 16 aminokislinskih zamenjav, med katerimi je bilo pet prisotnih v treh površinskih zankah DE, EF, HI in C-terminalnem koncu beljakovine. V primerjavi z izsledki predhodnih raziskav smo tudi mi opredelili aminokislinsko zamenjavo A235S kot najpogostejšo in prisotno le v evropskih različicah HPV-11 (Maver in sod., 2011; Ahmed in sod., 2013). Vse aminokislinske zamenjave, ki smo jih odkrili v površinskih zankah beljakovine L1 pri HPV-6/-11-pozitivnih vzorcih, so bile prisotne v majhnem številu vzorcev (od 1 do 9). Naši rezultati nakazujejo, da sicer v naravi obstajajo podtypeske različice L1 genotipov HPV-6/-11, ki bi lahko vplivale na spremembo strukture virusne sredice in

posledično na učinkovitost štirivalentnega in nonavalentnega cepiva proti HPV, vendar glede na to, da smo omenjene aminokislinske zamenjave odkrili le pri manjšem številu HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev, in glede na to, da protitelesa različnih bolnikov, okuženih s HPV-6 ali HPV-11, prepoznajo različne imunogene epitope (površinske zanke) v L1, je možnost razvoja virusnih različic, ki bi se lahko izognile prepoznavi nevtralizirajočih protiteles proti HPV, najverjetneje majhna (McClements in sod., 2001; Wang in sod., 2003; Orozco in sod., 2005; Stanley in sod., 2006; Ahmed in sod., 2013). Kljub temu je spremljanje genetske raznolikosti različic L1 cepilnih genotipov HPV, pred in po uvedbi cepljenja proti HPV, izredno pomembno. Rezultati naše raziskave predstavljajo pomemben vir informacij za nadaljnje raziskave genetske raznolikosti L1 genotipov HPV-6/-11.

5.2 OPREDELITEV GENETSKIH LINIJ IN PODLINIJ TER (POD)LINIJSKO-SPECIFIČNIH SNP-JEV

V naši raziskavi smo prvič opredelili celotna nukleotidna zaporedja najbolj raznolikim podtipskim različicam HPV-6/-11 iz celega sveta. S filogenetsko analizo, ki je vsebovala do sedaj največje število celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 (190), smo potrdili obstoj dveh genetskih linij HPV-6: A in B (Burk in sod. 2011) in prvič pokazali obstoj petih genetskih podlinij B: B1, B2, B3, B4 in B5. Podliniji B4 in B5 smo prvič opredelili v naši raziskavi. V primerjavi s predhodnimi raziskavami je bila tudi v naši raziskavi genetska podlinija B1 najpogostejša (Kocjan in sod., 2009; Kocjan in sod., 2011; Burk in sod., 2011; Danielewski in sod., 2013; Godinez in sod., 2014).

S filogenetsko analizo, ki je vsebovala do sedaj največje število celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 (63), smo prvič pokazali obstoj dveh genetskih linij HPV-11: A in B ter štirih podlinij A: A1, A2, A3 in A4. Linijo B ter podliniji A3 in A4 smo prvič opredelili v naši raziskavi. V primerjavi s predhodnimi raziskavami je bila tudi v naši raziskavi genetska podlinija A2 najpogostejša (Maver in sod., 2011; Burk in sod., 2011; Danielewski in sod., 2013; Godinez in sod., 2014).

Glede na to, da smo novoodkrite genetske linije in podlinije v večini primerov odkrili le pri posameznih HPV-6/-11-pozitivnih vzorcih, bi bilo potrebno prevalenco in epidemiološki ter klinični pomen novoodkritih linij in podlinij dodatno potrditi na še večjem številu HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev, predvsem iz Afrike, Avstralije, Južne Amerike in Azije.

Poznavanje (pod)linijsko-specifičnih SNP-jev omogoča hitro in zanesljivo filogenetsko umestitev podtipskih različic v obstoječe (pod)linije. V naši raziskavi smo prvič opredelili linijsko in podlinijsko-specifične SNP-je genotipov HPV-6/-11 in pokazali, da le-ti niso enakomerno razporejeni v celotnem nukleotidnem zaporedju. S pomočjo filogenetske analize in analize SNP-jev smo pokazali, da so v primeru HPV-6, za izris filogenetskega drevesa z vsemi obstoječimi linijami in podlinijami, najprimernejša genomska področja E1, E2 in L2. V zaporedju L2 smo določili tudi najkrajše nukleotidno zaporedje (960 bp), ki je dovolj informativno za določanje vseh do sedaj opredeljenih linij in podlinij HPV-6. V primeru HPV-11 smo pokazali, da so za izris filogenetskega drevesa z vsemi obstoječimi linijami in podlinijami, najprimernejša genomska področja E2, L2 in LCR. V genomskem področju E2-NCR2-E5a smo določili tudi najkrajše nukleotidno zaporedje (270 bp), ki je dovolj informativno za določanje vseh do sedaj opredeljenih linij in podlinij HPV-11. Naši rezultati dopolnjujejo izsledke nedavno objavljene raziskave, v kateri so Godinez in sodelavci (2014) opredelili zaporedje LCR in zaporedje med genoma E2 in L2 ORF, kot najprimernejša nukleotidna področja za izris filogenetskih dreves (Godinez in sod., 2014). S prospektivnim spremljanjem bolnikov, okuženih z visokorizičnimi HPV in specifično klinično sliko, so v nedavno objavljenih raziskavah dokazali statistično značilne povezave med določenimi genetskimi (pod)linijami (ali celo posameznimi SNP-ji) in tveganjem za razvoj predrakavih ali rakavih sprememb (Grodzki in sod., 2006; Sichero in sod., 2007; Schiffman in sod., 2010; Gheit in sod., 2011; Smith in sod., 2011; Burk in sod., 2013; Cornet in sod., 2013; Formentin in sod., 2013). V naši raziskavi bolnikov nismo spremljali prospektivno, zato smo statistično značilne povezave med (pod)linijami in anatomskim področjem okužbe poskusili opredeliti s pomočjo podatkov iz naše raziskave in podatkov zbranih v predhodnih raziskavah. Glede na to, da smo do zaključka naše raziskave zbrali približno dva-krat večje število HPV-6-pozitivnih vzorcev kot HPV-11-pozitivnih vzorcev, smo se v naši raziskavi omejili le na statistično analizo HPV-6-pozitivnih vzorcev.

5.3 POVEZAVE GENETSKIH (POD)LINIJ HPV-6 Z GEOGRAFSKIM IZVOROM, ANATOMSKIM PODROČJEM OKUŽBE IN BOLNIKOVIM SPLOMOM

Povezave genetskih (pod)linij HPV-6 z geografskim izvorom, anatomskim področjem okužbe in bolnikovim spolom smo preverili na 724 podtipskih različicah HPV-6. Rezultati statistične analize so pokazali, da so podtipe različice B1 prevladovali po vsem svetu, in potrdili izsledke predhodnih raziskav (Kocjan in sod., 2009; Burk in sod., 2011; Danielewski in sod., 2013; Godinez in sod., 2014). Predpostavljamo, da je podlinija B1 najstarejša podlinija HPV-6, ki se je tekom zgodnje človeške evolucije razširila po vsem svetu. Podtipe različice B2 so bile prisotne na vseh celinah, razen v Aziji. Glede na to, da so azijske različice predstavljale manj kot 13 % vseh podtipskih različic HPV-6 vključenih v statistično analizo, in glede na to, da so v Aziji prevladovali različice iz linije A, lahko predpostavljamo, da so podtipe različice B2 prisotne v manjšem deležu tudi v Aziji, vendar jih v naši raziskavi nismo odkrili. Podtipe različice B3 so bile pomembno bolj pogoste v Afriki, Severni in Južni Ameriki. Podtipe različice B4 smo odkrili samo v Aziji in Evropi in podtipe različice B5 samo v Afriki in Evropi, iz česar lahko sklepamo, da sta se ti dve podliniji najverjetneje razvili šele nedavno in se skupaj s človekom širili med omenjenimi celinami. Po drugi strani najverjetneje podtipskih različic B4 in B5 nismo odkrili na drugih celinah zaradi relativno majhnega števila vzorcev iz Afrike, Avstralije, Južne Amerike in Azije. Kljub povezavam, ki smo jih odkrili, HPV-6, v primerjavi s HPV-16/-18, ni pokazal izrazite filogenetske razporeditve podtipskih različic glede na njihov geografski izvor. Eden izmed možnih razlogov, zakaj odseva koevolucije HPV-6 s človekom v naši raziskavi nismo uspeli dokazati, je verjetno, da je naša raziskava temeljila na premajhnem, nereprezentativnem številu HPV-6-pozitivnih vzorcev (predvsem za Afriko, Avstralijo, Južno Ameriko in Azijo). Dodatno je potrebno upoštevati tudi dejstvo, da zaradi množičnih preseljevanj prihaja do neprestanega mešanja etničnih skupin in posledično tudi do prehajanja in mešanja podtipskih različic HPV-6 med celinami in posameznimi etničnimi skupinami. Znano je tudi, da je evolucija HPV-6, v primerjavi s HPV-16/-18, počasnejša, kar vodi v kasnejšo fiksacijo linijsko in podlinijsko-specifičnih SNP-jev (Heinzel in sod., 1995; Chen in sod., 2005; Sichero in sod., 2007; Burk in sod., 2011; Chen in sod., 2011). Glede na omenjena dejstva, bi lahko pričakovali, da so glavne genetske linije HPV-6, ki jih lahko dokažemo danes, ostale nespremenjene, odkar je moderni človek zapustil afriško

celino. Evropske, afriške in azijske podtipske različice so raziskovalci dokazali tudi pri drugih genotipih HPV, vendar so bile etnogeografske povezave veliko manj izrazite kot pri HPV-16/-18, kar potrjuje dejstvo, da obstajajo velike razlike v virusni evoluciji posameznih genotipov HPV (Bernard in sod., 2006).

S statistično analizo na do sedaj največjem številu HPV-6-pozitivnih vzorcev smo pokazali, da obstaja statistično značilna povezava med linijo B, natančneje podlinijama B1 in B3 in okužbami v anogenitalnem področju. Povezava med podtipskimi različicami podlinije B1 in okužbami anogenitalnega področja je bila dokazana že v dveh predhodnih raziskavah (Danielewski in sod., 2011; Godinez in sod., 2014). Statistično značilno povezavo med podlinijo B3, in okužbami v anogenitalnem področju smo v naši raziskavi opisali prvič. V predhodni raziskavi, ki je, v primerjavi z našo raziskavo, temeljila na približno tri-krat manjšem številu HPV-6-pozitivnih vzorcev in v kateri raziskovalci niso analizirali celotnega nukleotidnega zaporedja HPV-6, so v papilomih grla opisali večji delež različic HPV-6 iz podlinije B3 in linije A (Godinez in sod., 2014). Predpostavljamo, da je povezava med podlinijo B3 in okužbami v anogenitalnem področju, ki smo jo opisali v naši raziskavi, bolj verjetna, saj je naša raziskava temeljila na pomembno večjem številu HPV-6-pozitivnih vzorcev, ki so izvirali iz vseh celin.

Dodatno smo z multivariatno logistično regresijo prvič pokazali, da imajo ženske, v primerjavi z moškimi, višje obete za okužbe s podtipskimi različicami B3. Zaradi relativno majhnega in nereprezentativnega števila HPV-6-pozitivnih vzorcev v posameznih podlinijah (predvsem B2, B4 in B5), bi bilo potrebno izsledke naše raziskave potrditi na večjem, reprezentativnem številu HPV-6-pozitivnih vzorcev.

6 SKLEPI

- Svetovna genomska raznolikost HPV-6/-11 je bistveno manjša v primerjavi z najpomembnejšima visokorizičnima genotipoma HPV-16/-18.
- Genomska raznolikost HPV-6 (1,6 %) je večja v primerjavi s HPV-11 (1,4 %).
- Podtipske različice HPV-6 smo filogenetsko uvrstili v dve genetski liniji: A in B ter pet genetskih podlinij B: B1, B2, B3, B4 in B5; globalno je prevladovala podlinija B1.
- Podtipske različice HPV-11 smo filogenetsko uvrstili v dve genetski liniji: A in B ter štiri genetske podlinije A: A1, A2, A3 in A4; globalno je prevladovala podlinija A2.
- Filogenetska analiza podtipskih različic HPV-6/-11 ni pokazala izrazite filogenetske razporeditve glede na geografski izvor HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev, kot je to značilno pri nekaterih visokorizičnih genotipih HPV.
- Dokazali smo statistično značilne povezave med genetskimi (pod)linijami in geografskim izvorom HPV-6 pozitivnih vzorcev, anatomskim področjem okužbe ter bolnikovim spolom; podtipske različice B, natančneje podlinije B1, so prevladovale po vsem svetu; podtipske različice A so prevladovale v Aziji; podtipske različice B3 so prevladovale v Afriki, Severni in Južni Ameriki; podtipske različice B1 in B3 so prevladovale v anogenitalnih okužbah; ženske so imele višje obete za okužbo s podtipskimi različicami B3 kot moški.
- S primerjavo celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6/-11 smo opredelili linijsko in podlinijsko-specifične SNP-je.
- Na podlagi analize (pod)linijsko-specifičnih SNP-jev smo opredelili najkrajše nukleotidno zaporedje, s pomočjo katerega lahko podtipske različice HPV-6 umestimo v obstoječe genetske linije in podlinije: 960 bp znotraj gena L2.
- Na podlagi analize (pod)linijsko-specifičnih SNP-jev smo opredelili najkrajše nukleotidno zaporedje, s pomočjo katerega lahko podtipske različice HPV-11 umestimo v obstoječe genetske linije in podlinije: 270 bp znotraj področja E2-NCR2-E5a.

- V nukleotidnih zaporedjih gena L1 HPV-6/-11-pozitivnih vzorcev smo opisali aminokislinske zamenjave, ki bi lahko vplivale na učinkovitost štirivalentnega in nonavalentnega cepiva proti HPV.

7 POVZETEK

Človeška papilomavirusa HPV-6/-11 sta medicinsko najbolj pomembna nizkorizična genotipa HPV, saj povzročata več kot 90 % vseh anogenitalnih bradavic in papilomov grla pri moških in ženskah po vsem svetu. Skupaj z visokorizičnima genotipoma HPV-16/-18 sta vključena v štirivalentno cepivo proti HPV, ki je trenutno v uporabi, in nonavalentno cepivo proti HPV, ki je trenutno v teku kliničnih raziskav. Večina predhodnih raziskav, ki so proučevale genetsko raznolikost genotipov HPV in njihovo povezanost z etnogeografskim poreklom ter klinično sliko, je temeljila na visokorizičnih genotipih HPV, medtem ko je raziskovanje genetske raznolikosti nizkorizičnih genotipov HPV ostalo skoraj nedotaknjeno. Kljub temu da se je število raziskav na področju genetske raznolikosti nizkorizičnih genotipov HPV v zadnjih petih letih povečalo, je do začetka izvajanja naše raziskovalne naloge, ostala svetovna geografska razporeditev podtipskih različic HPV-6/-11 in njihova povezava s specifično klinično sliko slabo raziskana.

Namen doktorske disertacije je bil opredeliti svetovno genomsko raznolikost celotnih nukleotidnih zaporedij najbolj raznolikih podtipskih različic HPV-6/-11, pridobljenih iz različnih anatomskih področij okužbe, z vseh celin.

V naši raziskavi smo opredelili 130 novih celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 in 14 novih celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11. Pokazali smo, da je genomska raznolikost HPV-11, v primerjavi s HPV-6, manjša. S filogenetsko analizo celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-6 smo opredelili dve genetski liniji A in B ter pet genetskih podlinij B1, B2, B3, B4 in B5, med katerimi je na svetovnem nivoju prevladovala podlinija B1. Povezave posameznih (pod)linij HPV-6 z geografskim izvorom, anatomskim področjem okužbe in spolom, smo statistično ovrednotili na podlagi 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev. Pokazali smo, da na svetovnem nivoju prevladujejo podtipske različice linije B, natančneje podlinije B1, medtem ko so bile podtipske različice linije A pogostejše v Aziji, ter podtipske različice B3 v Afriki, Severni in Južni Ameriki. Podtipske različice B1 in B3 so prevladovale v anogenitalnih okužbah; ženske so imele višje obete za okužbo s podtipskimi različicami B3 kot moški.

S filogenetsko analizo celotnih nukleotidnih zaporedij HPV-11 smo opredelili dve genetski liniji A in B ter štiri genetske podlinije A1, A2, A3 in A4, med katerimi je na svetovnem nivoju prevladovala podlinija A2.

Tekom raziskave smo opredelili tudi linijsko in podlinijsko-specifične SNP-je ter najkrajša nukleotidna zaporedja, ki so primerna za umestitev podtipskih različic HPV-6/-11 v obstoječe (pod)linije; pri HPV-6 smo najkrajše nukleotidno zaporedje dokazali v genu L2 (960 bp) in pri HPV-11 v področju E2-NCR2-E5a (270 bp).

Preverili smo tudi prisotnost aminokislinskih zamenjav v genskem zapisu za večjo plaščno beljakovino L1 in dokazali nove aminokislinske zamenjave, ki bi teoretično lahko vplivale na učinkovitost štirivalentnega in nonavalentnega cepiva proti HPV. Glede na to, da je bilo štirivalentno cepivo proti HPV odobreno v času, ko je bila genomska raznolikost genotipov HPV-6/-11 slabo raziskana, obstaja možnost, da trenutno dostopno cepivo proti HPV (štirivalentno) ali cepivo proti HPV, ki je v razvoju (nonavalentno cepivo), ne bo nudilo zaščite proti vsem različicam HPV-6/-11, ki krožijo v naravi.

Izsledki naše raziskave bodo pomembno prispevali k razumevanju svetovne genomske raznolikosti genotipov HPV-6/-11, njune patogeneze, epidemiologije, evolucije, razvoja diagnostičnih testov za HPV-6/-11 in cepiv proti HPV.

8 SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) genotypes HPV-6 and HPV-11 are two medically most important low-risk HPV genotypes, etiologically involved in more than 90 % of anogenital warts and laryngeal papillomas (of both genders). Together with two high-risk genotypes, HPV-16 and HPV-18, HPV-6 and HPV-11 have been included in the quadrivalent and nonavalent HPV vaccines. Extensive studies on high-risk HPV genotypes have determined the existence of correlations among specific genomic variants, ethno-geographical origin, and clinical manifestation of the infection. Although HPV-6/-11 prevaccination genomic diversity has been studied to a major extent over the last five years, the in-depth view of the global geographical distribution of HPV-6/-11 genomic variants and their correlation with specific disease outcome has never been clearly evaluated.

The aim of our study was to perform the largest global HPV-6 and HPV-11 genomic diversity study to date, by analyzing complete genome sequences of most diverse globally circulating HPV-6 and HPV-11 genomic variants, isolated from different anatomical sites of infection and covering all continents. With our study, we contributed a total of 130 novel HPV-6 and 14 novel HPV-11 complete genome sequences.

Our results showed that in comparison to HPV-6, HPV-11 exhibited lower genomic heterogeneity. Global phylogenetic analysis of HPV-6 complete genome sequences revealed the existence of two variant lineages A and B, and five variant sublineages B1, B2, B3, B4 and B5; with sublineage B1 prevailing globally. In order to explore the degree of ethnogeographic, gender and/or disease predilection among HPV-6 (sub)lineages further, we statistically evaluated 724 HPV-6-positive samples. Statistical analysis revealed that lineage B (sublineage B1) prevailed globally, lineage A prevailed in Asia and sublineage B3 in Africa and North and South America. Sublineages B1 and B3 showed an association with anogenital infections and females had higher odds for infection with genetic variants B3, in comparison to males.

Global phylogenetic analysis of HPV-11 complete genome sequences revealed the existence of two variant lineages A and B, and four variant sublineages A1, A2, A3 and A4. Sublineage A2 prevailed globally.

HPV-6 and HPV-11 (sub)lineage-specific SNPs were identified to facilitate the rapid and reliable identification of HPV-6 and HPV-11 genomic variants in cases when complete

genome sequences are unavailable. For whole-genome-based phylogenetic clustering of HPV-6 and HPV-11, a 960-bp representative region within L2 ORF and 270-bp within E2-NCR2-E5a genomic region were identified, respectively.

Furthermore, we investigated the naturally occurring amino acid mutations in HPV-6/-11 major capsid protein L1 and determined, although in rare cases, several novel amino acid mutations that could impact the effectiveness of the quadrivalent and nonavalent HPV vaccines. Since the currently used quadrivalent HPV vaccine was introduced at a time when genomic diversity studies on HPV-6 and HPV-11 were limited, there is a possibility that current and second-generation HPV vaccines will not provide protection against all HPV-6/-11 variants circulating globally.

In conclusion, our study significantly expands the current knowledge of HPV-6 and HPV-11 genomic diversity and provides a valuable resource for future epidemiological, evolutionary, functional, pathogenicity, vaccination and molecular assay development studies.

9 VIRI

- Abramson A.L., Steinberg B.M., Winkler B. 1987. Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope*, 97: 678-685
- Ahmed A.I., Bissett S.L., Beddows S. 2013. Amino acid sequence diversity of the major human papillomavirus capsid protein: implications for current and next generation vaccines. *Infection, Genetics and Evolution*, 18: 151-159
- Ali H., Donovan B., Wand H., Read T.R., Regan D.G., Grulich A.E., Fairley C.K., Guy R.J. 2013. Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data. *British Medical Journal*, 346: f2032, doi:10.1136/bmj.f2032: 9 str.
- Armstrong L.R., Derkay C.S., Reeves W.C. 1999. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 125: 743-748
- Ashrafi G.H., Haghshenas M., Marchetti B., Campo M.S. 2006. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International Journal of Cancer*, 119: 2105-2112
- Ashrafi G.H., Haghshenas M.R., Marchetti B., O'Brien P.M., Campo M.S. 2005. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *International Journal of Cancer*, 113: 276-283
- Aubin F., Pretet J.L., Jacquard A.C., Saunier M., Carcopino X., Jaroud F., Pradat P., Soubeyrand B., Leocmach Y., Mouglin C., Riethmuller D. 2008. Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV). *Clinical Infectious Diseases*, 47: 610-615

- Bafverstedt B. 1967. Condylomata acuminata—past and present. *Acta Dermatovenereologica*, 47: 376-381
- Bastien N., McBride A.A. 2000. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology*, 270: 124-134
- Bergvall M., Melendy T., Archambault J. 2013. The E1 proteins. *Virology*, 445: 35-56
- Bernard H.U. 2013a. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infection, Genetics and Evolution*, 18: 357-361
- Bernard H.U. 2013b. Regulatory elements in the viral genome. *Virology*, 445: 197-204
- Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., Van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E.M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401: 70-79
- Bernard H.U., Calleja-Macias I.E., Dunn S.T. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118: 1071-1076
- Bishop B., Dasgupta J., Klein M., Garcea R.L., Christensen N.D., Zhao R., Chen X.S. 2007. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 31803-31811
- Boshart M., zur Hausen H. 1986. Human papillomaviruses in Buschke-Löwenstein tumors: physical state of the DNA and identification of a tandem duplication in the noncoding region of a human papillomavirus 6 subtype. *Journal of Virology*, 58: 963-966

- Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Cogliano V. 2009. A review of human carcinogens–Part B: biological agents. *Lancet Oncology*, 10: 321-322
- Bravo I.G., Alonso A. 2007. Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*, 34: 249-262
- Brown D.R., Bryan J.T., Cramer H., Fife K.H. 1993. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and Southern blot techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2667-2673
- Bryan J.T., Brown D.R. 2001. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology*, 281: 35-42
- Buck C.B., Day P.M., Trus B.L. 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445: 169-174
- Burk R.D., Chen Z., Harari A., Smith B.C., Kocjan B.J., Maver P.J., Poljak M. 2011. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, 20: 113-123
- Burk R.D., Harari A., Chen Z. 2013. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445: 232-243
- Calleja-Macias I.E., Kalantari M., Huh J., Ortiz-Lopez R., Rojas-Martinez A., Gonzalez-Guerrero J.F., Williamson A.L., Hagmar B., Wiley D.J., Villarreal L., Bernard H.U., Barrera-Saldana H.A. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 319: 315-323

- Caparros-Wanderley W., Savage N., Hill-Perkins M., Layton G., Weber J., Davies D.H. 1999. Intratype sequence variation among clinical isolates of the human papillomavirus type 6 L1 ORF: clustering of mutations and identification of a frequent amino acid sequence variant. *Journal of General Virology*, 80: 1025-1033
- Carter J.J., Wipf G.C., Benki S.F., Christensen N.D., Galloway D.A. 2003. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *Journal of Virology*, 77: 11625-11632
- Carvalho C.M., Huot L., Charlois A.L., Khalfallah S.A., Chapuis F., Froehlich P. 2009. Prognostic factors of recurrent respiratory papillomatosis from a registry of 72 patients. *Acta Oto-laryngologica*, 129: 462-470
- Chan P.K., Zhang C., Park J.S., Smith-McCune K.K., Palefsky J.M., Giovannelli L., Coutlee F., Hibbitts S., Konno R., Settheetham-Ishida W., Chu T.Y., Ferrera A., Alejandra Picconi M., De Marco F., Woo Y.L., Raiol T., Pina-Sanchez P., Bae J.H., Wong M.C., Chirenje M.Z., Magure T., Moscicki A.B., Fiander A.N., Capra G., Young Ki E., Tan Y., Chen Z., Burk R.D., Chan M.C., Cheung T.H., Pim D., Banks L. 2013. Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations. *International Journal of Cancer*, 132: 2528-2536
- Chang Y.J., Chen H.C., Lee B.H., You S.L., Lin C.Y., Pan M.H., Chou Y.C., Hsieh C.Y., Chen Y.M., Cheng Y.J., Chen C.J. 2011. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *International Journal of Cancer*, 129: 965-973
- Chansaenroj J., Theamboonlers A., Junyangdikul P., Supiyaphan P., Poovorawan Y. 2012. Whole genome analysis of human papillomavirus genotype 11 from cervix, larynx and lung. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 2619-2623

- Chen A.A., Heideman D.A., Boon D., Chen Z., Burk R.D., De Vuyst H., Gheit T., Snijders P.J., Tommasino M., Franceschi S., Clifford G.M. 2014a. Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer. *Virology*, 448: 356-362
- Chen A.A., Heideman D.A., Boon D., Gheit T., Snijders P.J., Tommasino M., Franceschi S., Clifford G.M. 2014b. Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. *Journal of Virology*, 88: 4514-4521
- Chen X.S., Garcea R.L., Goldberg I., Casini G., Harrison S.C. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell*, 5: 557-567
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., Desalle R., Anastos K., Segondy M., Sahasrabudde V.V., Gravitt P.E., Hsing A.W., Burk R.D. 2011. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PloS One*, 6, 5: e20183, doi: 10.1371/journal.pone.0020183: 16 str.
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., DeSalle R., Anastos K., Segondy M., Sahasrabudde V.V., Gravitt P.E., Hsing A.W., Burk R.D. 2013. Evolution and taxonomic classification of alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PloS One*, 8, 8: e72565, doi: 10.1371/journal.pone.0072565: 15 str.
- Chen Z., Terai M., Fu L., Herrero R., DeSalle R., Burk R.D. 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *Journal of Virology*, 79: 7014-7023
- Chin M.T., Hirochika R., Hirochika H., Broker T.R., Chow L.T. 1988. Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing

- proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *Journal of Virology*, 62: 2994-3002
- Ciuffo G. 1907. Innesso positivecon filtrato di verruca volgare. *Giornale Italiano Malattie Venereologia*. 48: 12-17
- CLCBio. 2011. CLC Bio Main Workbench. Aarhus, CLC Bio: (programska oprema)
<http://www.clcbio.com/> (1.1.2011)
- 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
- Combrinck C.E., Seedat R.Y., Randall C., Roodt Y., Burt F.J. 2012. Novel HPV-6 variants of human papillomavirus causing recurrent respiratory papillomatosis in southern Africa. *Epidemiology and Infection*, 140: 1095-1101
- Cornet I., Gheit T., Clifford G.M., Combes J.D., Dalstein V., Franceschi S., Tommasino M., Clavel C. 2013. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infectious Agents and Cancer*, 8, 4: doi: 10.1186/1750-9378-8-4: 5 str.
- Cubie H.A. 2013. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445: 21-34
- Danielewski J.A., Garland S.M., McCloskey J., Hillman R.J., Tabrizi S.N. 2013. Human papillomavirus type 6 and 11 genetic variants found in 71 oral and anogenital epithelial samples from Australia. *PloS One*, 8, 5: e63892, doi: 10.1371/journal.pone.0063892: 9 str.
- Dartmann K., Schwarz E., Gissmann L., zur Hausen H. 1986. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology*, 151: 124-130

- Davy C., McIntosh P., Jackson D.J., Sorathia R., Miell M., Wang Q., Khan J., Soneji Y., Doorbar J. 2009. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1–E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology*, 394: 266-275
- Day P.M., Roden R.B., Lowy D.R., Schiller J.T. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *Journal of Virology*, 72: 142-150
- De Boer M.A., Peters L.A., Aziz M.F., Siregar B., Cornain S., Vrede M.A., Jordanova E.S., Fleuren G.J. 2005. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer*, 114: 422-425
- de Matos R.P., Sichero L., Mansur I.M., do Bonfim C.M., Bittar C., Nogueira R.L., Kupper D.S., Valera F.C., Nogueira M.L., Villa L.L., Calmon M.F., Rahal P. 2013. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 16: 282-289
- de Villiers E.M. 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445: 2-10
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- de Villiers E.M., Weidauer H., Otto H., zur Hausen H. 1985. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *International Journal of Cancer*, 36: 575-578
- Dedo H.H., Yu K.C. 2001. CO2 laser treatment in 244 patients with respiratory papillomas. *Laryngoscope*, 111: 1639-1644

- Desaintes C., Demeret C., Goyat S., Yaniv M., Thierry F. 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO Journal*, 16: 504-514
- DiMaio D., Petti L.M. 2013. The E5 proteins. *Virology*, 445: 99-114
- Dinh T.H., Sternberg M., Dunne E.F., Markowitz L.E. 2008. Genital warts among 18- to 59-year-olds in the United States, national health and nutrition examination survey, 1999–2004. *Sexually Transmitted Diseases*, 35: 357-360
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541
- Doorbar J. 2007. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers*, 23: 297-313
- Doorbar J. 2013. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445: 80-98
- Doorbar J., Gallimore P.H. 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *Journal of Virology*, 61: 2793-2799
- Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Broker T.R., Stanley M.A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, Suppl. 5: F55-F70
- Dowhanick J.J., McBride A.A., Howley P.M. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *Journal of Virology*, 69: 7791-7799
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214, doi:10.1186/1471-2148-7-214: 8 str.

- Farr A., Wang H., Kasher M.S., Roman A. 1991. Relative enhancer activity and transforming potential of authentic human papillomavirus type 6 genomes from benign and malignant lesions. *Journal of General Virology*, 72: 519-526
- Florin L., Becker K.A., Lambert C., Nowak T., Sapp C., Strand D., Streeck R.E., Sapp M. 2006. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *Journal of Virology*, 80: 6691-6696
- Forman D., de Martel C., Lacey C.J., Soerjomataram I., Lortet-Tieulent J., Bruni L., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Plummer M., Franceschi S. 2012. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30, Suppl. 5: F12-F23
- Formentin A., Archambault J., Koushik A., Richardson H., Brassard P., Franco E.L., Coutlee F. 2013. Human papillomavirus type 52 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix. *International Journal of Cancer*, 132: 1821-1830
- Fujs Komloš K., Košorok P., Kocjan B.J., Poljak M. 2013. Genetic diversity of HPV-6 in concurrent multiple anogenital warts. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, 22: 31-33
- Gale N., Poljak M., Kambič V., Ferluga D., Fischinger J. 1994. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathological, and clinical evaluation. *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, 425: 291-295
- Gall T., Kis A., Feher E., Gergely L., Szarka K. 2011. Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: complete genome comparison of sequential isolates. *Antiviral Research*, 92: 356-358
- Gáll T., Kis A., Tatar T.Z., Kardos G., Gergely L., Szarka K. 2013. Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatoses

- associated with human papillomavirus type 11. *Medical Microbiology and Immunology*, 202: 353-363
- Gambhira R., Karanam B., Jagu S., Roberts J.N., Buck C.B., Bossis I., Alphas H., Culp T., Christensen N.D., Roden R.B. 2007. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *Journal of Virology*, 81: 13927-13931
- Garland S.M. 2014. The Australian experience with the human papillomavirus vaccine. *Clinical Therapeutics*, 36: 17-23
- Genther Williams S.M., Disbrow G.L., Schlegel R., Lee D., Threadgill D.W., Lambert P.F. 2005. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Research*, 65: 6534-6542
- Gheit T., Cornet I., Clifford G.M., Iftner T., Munk C., Tommasino M., Kjaer S.K. 2011. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 20: 1315-1321
- Gillison M.L., Alemany L., Snijders P.J., Chaturvedi A., Steinberg B.M., Schwartz S., Castellsague X. 2012. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*, 30, Suppl. 5: F34-F54
- Gissmann L., Pfister H., zur Hausen H. 1977. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*, 76: 569-580
- Gissmann L., Wolnik L., Ikenberg H., Koldovsky U., Schnurch H.G., zur Hausen H. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 560-563

- Gissmann L., zur Hausen H. 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *International Journal of Cancer*, 25: 605-609
- Giuliano A.R., Tortolero-Luna G., Ferrer E., Burchell A.N., de Sanjose S., Kjaer S.K., Muñoz N., Schiffman M., Bosch F.X. 2008. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine*, 26, 10: 17-28
- Godinez J.M., Nicolas-Parraga S., Pimenoff V.N., Mengual-Chulia B., Munoz N., Bosch F.X., Sanchez G.I., McCloskey J., Bravo I.G. 2014. Phylogenetically related, clinically different: human papillomaviruses 6 and 11 variants distribution in genital warts and in laryngeal papillomatosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 6: O406-O413
- Gottschling M., Goker M., Stamatakis A., Bininda-Emonds O.R., Nindl I., Bravo I.G. 2011. Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2101-2113
- Gottschling M., Stamatakis A., Nindl I., Stockfleth E., Alonso A., Bravo I.G. 2007. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1242-1258
- 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
- Grodzki M., Besson G., Clavel C., Arslan A., Franceschi S., Birembaut P., Tommasino M., Zehbe I. 2006. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15: 820-822

- Guan P., Howell-Jones R., Li N., Bruni L., de Sanjose S., Franceschi S., Clifford G.M. 2012. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer*, 131: 2349-2359
- 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
- Heinzel P.A., Chan S.Y., Ho L., O'Connor M., Balaram P., Campo M.S., Fujinaga K., Kiviat N., Kuypers J., Pfister H., Steinberg B.M., Tay S.-K., Villa L.L., Bernard H.-U. 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1746-1754
- Ho L., Chan S.Y., Burk R.D., Das B.C., Fujinaga K., Icenogle J.P., Kahn T., Kiviat N., Lancaster W., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., Mitrani-Rosenbaum S., Norrild B., Pillai M.R., Stoerker J., Syrjaenen K., Syrjaenen S., Tay S.-K., Villa L.L., Wheeler C.M., Williamson A.L., Bernard H.-U. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*, 67: 6413-6423
- Ho L., Chan S.Y., Chow V., Chong T., Tay S.K., Villa L.L., Bernard H.U. 1991. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1765-1772
- Hofmann K.J., Cook J.C., Joyce J.G., Brown D.R., Schultz L.D., George H.A., Rosolowsky M., Fife K.H., Jansen K.U. 1995. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, 209: 506-518
- Huebbers C.U., Preuss S.F., Kolligs J., Vent J., Stenner M., Wieland U., Silling S., Drebber U., Speel E.J., Klussmann J.P. 2013. Integration of HPV6 and downregulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset

laryngeal papillomatosis. *PloS One*, 8, 2: e57207, doi: 10.1371/journal.pone.0057207: 7 str.

Hwang E.S., Riese D.J., 2nd, Settleman J., Nilson L.A., Honig J., Flynn S., DiMaio D. 1993. Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *Journal of Virology*, 67: 3720-3729

IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY, IBM Corp.: (programska oprema)
<http://www.ibm.com/> (1.10.2013)

Icenogle J.P., Sathya P., Miller D.L., Tucker R.A., Rawls W.E. 1991. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology*, 184: 101-107

Insinga R.P., Liaw K.L., Johnson L.G., Madeleine M.M. 2008. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17: 1611-1622

Jančar N., Vrtačnik Bokal E. 2010. Predrakave spremembe materničnega vratu. *Medicinski razgledi*, 49: 275-284

Jelen M.M., Chen Z., Kocjan B.J., Burt F.J., Chan P.K., Chouhy D., Combrinck C.E., Coutlée F., Estrade C., Ferenczy A., Fiander A., Franco E.L., Garland S.M., Giri A.A., Gonzalez J.V., Gröning A., Heidrich K., Hibbitts S., Hošnjak L., Luk T.N., Marinic K., Matsukura T., Neumann A., Oštrbenk A., Picconi M.A., Richardson H., Sagadin M., Sahli R., Seedat R.Y., Seme K., Severini A., Sinchi J.L., Smahelova J., Tabrizi S.N., Tachezy R., Tohme S., Uloza V., Vitkauskiene A., Wong Y.W., Židovec Lepej S., Burk R.D., Poljak, M. 2014. Global genomic diversity of human papillomavirus type 6 (HPV6) based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *Journal of Virology*, 88: 7307-7316

- Kabsch K., Alonso A. 2002. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *Journal of Virology*, 76: 12162-12172
- Kabsch K., Mossadegh N., Kohl A., Komposch G., Schenkel J., Alonso A., Tomakidi P. 2004. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology*, 47: 48-56
- Kasher M.S., Roman A. 1988. Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated from an invasive squamous carcinoma of the vulva. *Virology*, 165: 225-233
- Katoh K., Toh H. 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 26: 1899-1900
- Kiatpongsan S., Campos N.G., Kim J.J. 2012. Potential benefits of second-generation human papillomavirus vaccines. *PloS One*, 7, 11: e48426, doi: 10.1371/journal.pone.0048426: 9 str.
- Kim S.H., Juhn Y.S., Kang S., Park S.W., Sung M.W., Bang Y.J., Song Y.S. 2006. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 930-938
- Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D.R., Schiller J.T. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 12180-12184
- Kitasato H., Delius H., zur Hausen H., Sorger K., Rosl F., de Villiers E.M. 1994. Sequence rearrangements in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6: are these involved in malignant transition? *Journal of General Virology*, 75: 1157-1162

- Kjaer S.K., Tran T.N., Sparen P., Tryggvadottir L., Munk C., Dasbach E., Liaw K.L., Nygard J., Nygard M. 2007. The burden of genital warts: a study of nearly 70,000 women from the general female population in the 4 Nordic countries. *Journal of Infectious Diseases*, 196: 1447-1454
- Klavs I., Grgic-Vitek M. 2008. The burden of genital warts in Slovenia: results from a national probability sample survey. *Eurosurveillance*, 13, 45: pii19032, <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19032>: 4 str.
- Kocjan B.J., Gale N., Hočevnar Boltežar I., Seme K., Fujs Komloš K., Hošnjak L., Maver P.J., Jelen M.M., Zupanič Pajnič I., Balažic J., Poljak M. 2013. Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *Journal of Infectious Diseases*, 207: 583-587
- Kocjan B.J., Jelen M.M., Maver P.J., Seme K., Poljak M. 2011. Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6): a comparative analysis of 21 full-length genome sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 1805-1810
- Kocjan B.J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41-60
- Kocjan B.J., Poljak M., Cimerman M., Gale N., Potočnik M., Bogovac Ž., Seme K. 2009. Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology*, 391: 274-283
- Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. 2008. Detection and differentiation of human papillomavirus genotypes HPV-6 and HPV-11 by FRET-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 153: 245-249
- Komloš K.F., Kocjan B.J., Košorok P., Luzar B., Meglič L., Potočnik M., Hočevnar-Boltežar I., Gale N., Seme K., Poljak M. 2012. Tumor-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts

- and laryngeal papillomas: a study on 574 tissue specimens. *Journal of Medical Virology*, 84: 1233-1241
- Kovelman R., Bilter G.K., Roman A., Brown D.R., Barbosa M.S. 1999. Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. *Journal of General Virology*, 80: 2445-2451
- Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14, 2: 467-475
- Krige D., Mills H.R., Berrie E.L., Doherty N.C., Jones D.K., Ryan C.A., Davies H., Myint S., McCance D.J., Layton G.T., French T.J. 1997. Sequence variation in the early genes E1^{E4}, E6 and E7 of human papilloma virus type 6. *Virus Research*, 49: 187-191
- Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjanen K., Syrjanen S. 2000. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *European Journal of Cancer*, 36: 1402-1410
- Lacey C.J., Lowndes C.M., Shah K.V. 2006. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*, 24, Suppl. 3: S35-S41
- Larson D.A., Derkay C.S. 2010. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 118: 450-454
- Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P.J., Clifford G.M. 2011. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer*, 128: 927-935

- Lindeberg H., Elbrond O. 1990. Laryngeal papillomas: the epidemiology in a Danish subpopulation 1965-1984. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 15: 125-131
- Longworth M.S., Laimins L.A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 362-372
- Löning T., Ikenberg H., Becker J., Gissmann L., Hoepfer I., zur Hausen H. 1985. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *Journal of Investigative Dermatology*, 84: 417-420
- Maddison D.R., Maddison W.P. 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a.: (programska oprema)
<http://macclade.org>. (14. 5. 2014)
- Matsumoto K., Oki A., Furuta R., Maeda H., Yasugi T., Takatsuka N., Mitsunashi A., Fujii T., Hirai Y., Iwasaka T., Yaegashi N., Watanabe Y., Nagai Y., Kitagawa T., Yoshikawa H. 2011. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 128: 2898-2910
- Maver P.J., Kocjan B.J., Seme K., Potočnik M., Gale N., Poljak M. 2011. Pre vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 11: a study on 63 clinical isolates and 10 full-length genome sequences. *Journal of Medical Virology*, 83: 461-470
- McBride A.A. 2013. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445: 57-79
- McClements W.L., Wang X.M., Ling J.C., Skulsky D.M., Christensen N.D., Jansen K.U., Ludmerer S.W. 2001. A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1. *Virology*, 289: 262-268

- Modis Y., Trus B.L., Harrison S.C. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO Journal*, 21: 4754-4762
- Moscicki A.B., Schiffman M., Burchell A., Albero G., Giuliano A.R., Goodman M.T., Kjaer S.K., Palefsky J. 2012. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*, 30, Suppl. 5: F24-F33
- Moscicki A.B., Shiboski S., Hills N.K., Powell K.J., Jay N., Hanson E.N., Miller S., Canjura-Clayton K.L., Farhat S., Broering J.M., Darragh T.M. 2004. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*, 364: 1678-1683
- Mounts P., Kashima H. 1984. Association of human papillomavirus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 94: 28-33
- Nath R., Mant C.A., Kell B., Cason J., Bible J.M. 2006. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell International*, 6, 19: doi: 10.1186/1475-2867-6-19: 9 str.
- NCBI. 2013. BLAST: Basic local alignment search tool. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: baza podatkov
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (1.1.2012)
- Ong C.K., Chan S.Y., Campo M.S., Fujinaga K., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., Pfister H., Tay S.K., ter Meulen J., Villa L.L., Bernard H.-U. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virology*, 67: 6424-6431
- Orozco J.J., Carter J.J., Koutsky L.A., Galloway D.A. 2005. Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6 L1 capsomers. *Journal of Virology*, 79: 9503-9514

- Orth G., Favre M., Croissant O. 1977. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *Journal of Virology*, 24: 108-120
- Pastrana D.V., Vass W.C., Lowy D.R., Schiller J.T. 2001. NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16. *Virology*, 279: 361-369
- Petry K.U., Luyten A., Justus A., Iftner A., Strehlke S., Schulze-Rath R., Iftner T. 2012. Prevalence of low-risk HPV types and genital warts in women born 1988/89 or 1983/84 -results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *BMC Infectious Diseases*, 12: 367, doi: 10.1186/1471-2334-12-367: 9 str.
- Pim D., Banks L. 2010. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 118: 471-493
- Pogačnik A. 2011. Citološki izvid - klasifikacija po Bethesda. *Onkologija*, 1: 44-46
- Poljak M., Kocjan B.J., Oštrbenk A. 2014. Okužbe s HPV. V: Obnovitveni kolposkopski tečaj s poudarkom na praktičnih veščinah, Ljubljana, 21. marec 2014. Smrkolj Š. (ur.). Ljubljana, Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD, Onkološki Inštitut: 7-26
- Potočnik M., Kocjan B., Seme K., Poljak M. 2007. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, 16: 91-98
- Prado J.C., Calleja-Macias I.E., Bernard H.U., Kalantari M., Macay S.A., Allan B., Williamson A.L., Chung L.P., Collins R.J., Zuna R.E., Dunn S.T., Ortiz-Lopez R., Barrera-Saldana 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

R Core team. 2014. A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing: (programska oprema)
<http://www.R-project.org> (10.9.2011)

Rady P.L., Schnadig V.J., Weiss R.L., Hughes T.K., Tyring S.K. 1998. Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope*, 108: 735-740

Rando R.F., Groff D.E., Chirikjian J.G., Lancaster W.D. 1986. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *Journal of Virology*, 57: 353-356

Richards R.M., Lowy D.R., Schiller J.T., Day P.M. 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 1522-1527

Roman A., Brown D. 1995. Sequence variation in the extreme 5' end of the human papillomavirus type 6a long control region. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 697-700

Rose R.C., Bonnez W., Reichman R.C., Garcea R.L. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of viruslike particles. *Journal of Virology*, 67: 1936-1944

Sanders C.M., Stenlund A. 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 3522-3534

- Schiffman M., Herrero R., Desalle R., Hildesheim A., Wacholder S., Rodriguez A.C., Bratti M.C., Sherman M.E., Morales J., Guillen D., Alfaro M., Hutchinson M., Wright T.C., Solomon D., Chen Z., Schussler J., Castle P.E., Burk R.D. 2005. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 337: 76-84
- Schiffman M., Rodriguez A.C., Chen Z., Wacholder S., Herrero R., Hildesheim A., Desalle R., Befano B., Yu K., Safaeian M., Sherman M.E., Morales J., Guillen D., Alfaro M., Hutchinson M., Solomon D., Castle P.E., Burk R.D. 2010. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Research*, 70: 3159-3169
- Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C. 2010. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, 118, Suppl. 1: S12-S17
- Schwarz E., Durst M., Demankowski C., Lattermann O., Zech R., Wolfspenger E., Suhai S., zur Hausen H. 1983. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO Journal*, 2: 2341-2348
- Shah S.D., Doorbar J., Goldstein R.A. 2010. Analysis of host-parasite incongruence in papillomavirus evolution using importance sampling. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1301-1314
- Sichero L., Ferreira S., Trottier H., Duarte-Franco E., Ferenczy A., Franco E.L., Villa L.L. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International Journal of Cancer*, 120: 1763-1768
- Silverberg M.J., Thorsen P., Lindeberg H., Grant L.A., Shah K.V. 2003. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstetrics and Gynecology*, 101: 645-652
- Smith B., Chen Z., Reimers L., Van Doorslaer K., Schiffman M., Desalle R., Herrero R., Yu K., Wacholder S., Wang T., Burk R.D. 2011. Sequence imputation of HPV16

- genomes for genetic association studies. *PloS One*, 6, 6: e21375, doi: 10.1371/journal.pone.0021375: 8 str.
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57: 758-771
- Stanley M., Lowy D.R., Frazer I. 2006. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine*, 24, Suppl. 3: S106-S113
- Steenbergen R.D., de Wilde J., Wilting S.M., Brink A.A., Snijders P.J., Meijer C.J. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of Clinical Virology*, 32, Suppl. 1: S25-S33
- Strauss M.J., Shaw E.W., Bunting H., Melnick J.L. 1949. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 72: 46-50
- Suzuki T., Tomita Y., Nagata H., Kono A., Simizu B. 1997. Nucleotide and amino acid sequence variations in the L1 open reading frame of human papillomavirus type 6. *Journal of Medical Virology*, 53: 19-24
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739
- Thorland E.C., Myers S.L., Gostout B.S., Smith D.I. 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22: 1225-1237
- Trottier H., Franco E.L. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24, Suppl. 1: S1-S15

- Ure A.E., Forslund O. 2012. Lack of methylation in the upstream region of human papillomavirus type 6 from aerodigestive tract papillomas. *Journal of Virology*, 86: 13790-13794
- Ustav M., Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO Journal*, 10: 449-457
- Van Doorslaer K. 2013. Evolution of the *Papillomaviridae*. *Virology*, 445: 11-20
- Wang J.W., Roden R.B. 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445: 175-186
- Wang X., Wang Z., Christensen N.D., Dillner J. 2003. Mapping of human serum-reactive epitopes in virus-like particles of human papillomavirus types 16 and 11. *Virology*, 311: 213-221
- Wheeler C.M., Hunt W.C., Schiffman M., Castle P.E. 2006. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *Journal of Infectious Diseases*, 194: 1291-1299
- Wiatrak B.J., Wiatrak D.W., Broker T.R., Lewis L. 2004. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope*, 114: 1-23
- Wiley D.J., Douglas J., Beutner K., Cox T., Fife K., Moscicki A.B., Fukumoto L. 2002. External genital warts: diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 35, Suppl. 2: S210-S224
- Wolf R., Davidovici B. 2010. Treatment of genital warts: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28: 546-548

- Wu X., Zhang C., Feng S., Liu C., Li Y., Yang Y., Gao J., Li H., Meng S., Li L., Zhang Y., Hu X., Lin L., Li X., Wang Y. 2009. Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. *Journal of Medical Virology*, 81: 693-702
- Xi L.F., Koutsky L.A., Hildesheim A., Galloway D.A., Wheeler C.M., Winer R.L., Ho J., Kiviat N.B. 2007. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16: 4-10
- Xi L.F., Schiffman M., Koutsky L.A., He Z., Winer R.L., Hulbert A., Lee S.K., Ke Y., Kiviat N.B. 2013. Persistence of newly detected human papillomavirus type 31 infection, stratified by variant lineage. *International Journal of Cancer*, 132: 549-555
- Xi L.F., Schiffman M., Koutsky L.A., Hulbert A., Lee S.K., Defilippis V., Shen Z., Kiviat N.B. 2012. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *International Journal of Cancer*, 131: 2300-2307
- Xue Q., Wang H., Wang J. 2010. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 1051-1054
- Yaegashi N., Xi L., Batra M., Galloway D.A. 1993. Sequence and antigenic diversity in two immunodominant regions of the L2 protein of human papillomavirus types 6 and 16. *Journal of Infectious Diseases*, 168: 743-747
- Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A.C., Hildesheim A., Jenison S.A. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *Journal of Virology*, 69: 7743-7753
- Yuan H., Myers S., Wang J., Zhou D., Woo J.A., Kallakury B., Ju A., Bazylewicz M., Carter Y.M., Albanese C., Grant N., Shad A., Dritschilo A., Liu X., Schlegel R. 2012. Use

- of reprogrammed cells to identify therapy for respiratory papillomatosis. *New England Journal of Medicine*, 367: 1220-1227
- Yuan H., Zhou D., Wang J., Schlegel R. 2013. Divergent human papillomavirus associated with recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement. *Genome Announcements*, 1, 4: e00474-13, doi: 10.1128/genomeA.00474-13: 1 str.
- Zhao K.N., Hengst K., Liu W.J., Liu Y.H., Liu X.S., McMillan N.A., Frazer I.H. 2000. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology*, 272: 382-393
- Zheng Z.M., Baker C.C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11: 2286-2302
- zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288: F55-F78
- zur Hausen H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384: 260-265
- zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. 1974a. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cancer*, 13: 650-656
- zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Wolf H., Dorries K., Egger H. 1974b. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *International Journal of Cancer*, 13: 657-664

ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti svojemu mentorju, prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., ki mi je omogočil raziskovalno delo v svojem laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa. S spoštovanjem, navdušenjem in hvaležnostjo sem prevzela vlogo Vaše mlade raziskovalke. Iskreno se Vam zahvaljujem za Vašo pomoč, Vaš trud, in podporo. Hvala Vam za Vaše izkazano zaupanje, kritiko in vzpodbudne besede, ko je bilo zame pretežno. Hvala Vam, ker ste me kot moj profesor in mentor naučili kako razmišljati s svojo glavo in kako kljub preizkušnjam ostati trdno na tleh.

Prof. dr. Katja Seme, dr. med., tudi Vi ste me spremljali od samega začetka dela v laboratoriju in mi vedno pomagali do še boljšega rezultata. Iskrena hvala za vso strokovno pomoč, pregled in recenzijo doktorske disertacije, Vašo kritiko in Vašo pohvalo. Iz Vaših predavanj in Vaših vzpodbudnih besed sem vedno črpala navdih in motivacijo za naprej.

Za pregled in recenzijo doktorske disertacije se iskreno zahvaljujem tudi članoma komisije za oceno in zagovor doktorske disertacije: prof. dr. Darji Žgur-Bertok in prof. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med. Prav tako se obema iskreno zahvaljujem za vso strokovno pomoč in podporo tekom študija na Biotehniški fakulteti.

Zahvalila bi se tudi prof. dr. Robertu Burku in dr. Zigui Chenu iz Univerze Alberta Einsteina v New Yorku, za neprecenljivo strokovno pomoč pri mojem doktoratu in bogato osebno izkušnjo.

Hvala vsem raziskovalcem in so-avtorjem objavljenega članka iz teme doktorata, ki so prispevali vzorce za raziskavo in mi pomagali pri objavi članka.

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

Zahvaljujem se tudi organizaciji ESCMID (The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) za dodatno finančno podporo pri izvedbi doktorske naloge.

Znanst. sod. dr. Boštjan Kocjan, najlepša hvala za vso strokovno pomoč, nasvete in kritiko. Hvala ti za vse odgovore na moja začetniška vprašanja, za potrpljenje in čas, ki si si ga odtrgal zame.

Draga Lea Hošnjak, najlepša hvala za vso pomoč pri strokovnem in osebnem razvoju. Hvala ti za ves čas, ki si ga namenila zame, za zaupanje in pozitivno energijo, s katero si vedno pregnala moje strahove. Hvala ti, ker si prenašala mojo trmo in mi v težkih trenutkih vedno stala ob strani.

Martin Sagadin, najlepša hvala za vso pomoč v laboratoriju, vse nasvete, ideje, razumevanje in potrpljenje. Hvala ti za tvoj humor, ki mi je vedno polepšal dan.

Anja Oštrbenk, najlepša hvala za več-mesečno nesebično pomoč pri statistiki, vse dodatne nasvete, razumevanje, potrpežljivost in prijetna druženja.

Asist. dr. Polona Maver-Vodičar, najlepša hvala za vse strokovne nasvete in podporo tekom raziskovanja.

Robi Krošelj, najlepša hvala za vso pomoč, podporo in za vedno prijazen nasmeh in tople besede.

Drage sodelavke: Maja Accetto-Kos, asist. razisk. dr. Kristina Fujs Komloš, Blanka Kušar, Maja Lunar, Petra Markočič, dr. Jana Mlakar, Daniela Petek, asist. mag. Tina Štamol, Anja Šterbenc in Sonja Vuletić - hvala vam za vse nasvete, razumevanje in vzpodbudo. Hvala tudi Anji Zagožen in Ines Kmet za vso pomoč v laboratoriju in za vedno prijetno družbo.

Uroš Žižmund, hvala za pomoč pri urejanju slikovnega materiala in ekspresno reševanje računalniških problemov.

Dr. Luka Fajs, hvala za vzpodbudo in vse nasvete, ki si jih delil z mano tekom študija in dela v laboratoriju. Vedno me je navdihovala tvoja kreativnost in način razmišljanja.

Dr. Ariana Harari, najlepša hvala za vse strokovne nasvete, pomoč, podporo in nepozabne trenutke v času mojega bivanja v New Yorku.

Mag. Vanja Erčulj, najlepša hvala za ekspresno strokovno pomoč pri statistiki in vse dodatne nasvete izven službenega okolja.

Vesna Tlaker-Žunter, dr. med., najlepša hvala za vso strokovno pomoč, podporo, vzpodbudo in zaupanje.

Hvala mojim najdražjim sorodnikom in prijateljem, ki ste mi vedno stali ob strani in verjeli vame. Z vašo pomočjo sem gradila sebe in urejala svoj mali svet.

PRILOGE

Priloga A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
HPV-6b	X00203	Nemčija	1983	Schwarz in sod., 1983
HPV-6a	L41216	ZDA	1995	Hoffman in sod., 1995
HPV-6vc	AF092932	ZDA	1999	Kovelman in sod., 1999
LP26	FR751320	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC251c	FR751321	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC26	FR751322	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP130	FR751323	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP5	FR751324	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC377	FR751325	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC56	FR751326	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC331	FR751327	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC301	FR751328	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP11	FR751329	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC23z	FR751330	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP137	FR751331	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP96(175)	FR751332	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP176	FR751333	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC11	FR751334	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC96	FR751335	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC231	FR751336	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
CAC306	FR751337	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
LP98(131)	FR751338	Slovenija	2011	Kocjan in sod., 2011
PV2345	JN252314	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV0529	JN252315	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1666	JN252316	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1731	JN252317	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1774	JN252318	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV2530	JN252319	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1667	JN252320	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1732	JN252321	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV1499	JN252322	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012
PV2702	JN252323	Švedska	2012	Ure in Forslund, 2012

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
LP22	HE599226	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP237	HE599227	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP139	HE599228	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP143	HE599229	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP148	HE599230	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP183	HE599231	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP243	HE599232	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP145	HE599233	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP231	HE599234	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP3	HE599235	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP210	HE599236	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP23	HE599237	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP230	HE599238	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP15	HE599239	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP240	HE599240	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP173	HE599241	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP178	HE599242	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP182	HE599243	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP223	HE599244	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP112	HE599245	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP244	HE599246	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX44	HE962026	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX34	HE962027	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX32	HE962028	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP211	HE962029	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP238	HE962030	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX29	HE962031	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX26	HE962032	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LT15	HG793809	Litva	2014	Jelen in sod., 2014
LT13	HG793810	Litva	2014	Jelen in sod., 2014
LT3	HG793811	Litva	2014	Jelen in sod., 2014
YM116	HG793812	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM117	HG793813	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM133	HG793814	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
YM135	HG793815	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM148	HG793816	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM15	HG793817	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM154	HG793818	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM161	HG793819	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM25	HG793820	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM39	HG793821	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM48	HG793822	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM63	HG793823	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
YM78	HG793824	Hong Kong	2014	Jelen in sod., 2014
CH541	HG793825	Švica	2014	Jelen in sod., 2014
CH446	HG793826	Švica	2014	Jelen in sod., 2014
CH1504	HG793827	Švica	2014	Jelen in sod., 2014
CH7416	HG793828	Švica	2014	Jelen in sod., 2014
BK13	HG793829	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK16	HG793830	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK32	HG793831	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK33	HG793832	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK34	HG793833	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK36	HG793834	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK37	HG793835	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK39	HG793836	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK42	HG793837	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK46	HG793838	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK55	HG793839	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
BK59	HG793840	ZDA	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB248	HG793841	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB71	HG793842	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB366	HG793843	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB364	HG793844	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB127	HG793845	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB241	HG793846	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB146	HG793847	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB155	HG793848	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
ZGB32	HG793849	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB83	HG793850	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB183	HG793851	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB274	HG793852	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
ZGB40	HG793853	Hrvaška	2014	Jelen in sod., 2014
CZ07 (SL7)	HG793854	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ39 (SL39)	HG793855	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ50 (SL50)	HG793856	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ49 (SL49)	HG793857	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ12 (SL12)	HG793858	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ32 (SL32)	HG793859	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ13 (SL13)	HG793860	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ47 (SL47)	HG793861	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ62 (SL62)	HG793862	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ33 (SL33)	HG793863	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ46 (SL46)	HG793864	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ01 (SL01)	HG793865	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ37 (SL37)	HG793866	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ41 (SL41)	HG793867	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ42 (SL42)	HG793868	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
CZ25 (SL25)	HG793869	Češka	2014	Jelen in sod., 2014
N8572	HG793870	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N7266	HG793871	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N8819	HG793872	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N7701	HG793873	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N7014	HG793874	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N4964	HG793875	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N4543	HG793876	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N1088	HG793877	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N5757	HG793878	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N2805	HG793879	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N8603	HG793880	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N0526	HG793881	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N7745	HG793882	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
N2656	HG793883	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
N7670	HG793884	Nemčija	2014	Jelen in sod., 2014
JP1352	HG793885	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1849	HG793886	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1093	HG793887	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1332	HG793888	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1828	HG793889	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1044	HG793890	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP791	HG793891	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1977	HG793892	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1481	HG793893	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1651	HG793894	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
JP1605	HG793895	Japonska	2014	Jelen in sod., 2014
ZA47ZA8 (VBD 47/08)	HG793896	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
ZA64ZA8 (VBD 64/08)	HG793897	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
ZA54ZA10 (VBD 54/10)	HG793898	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
ZA65ZA11 (VBD 65/11)	HG793899	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
ZA71ZA9 (VBD 71/09)	HG793900	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
ZA4ZA9 (VBD 04/09)	HG793901	Južna Afrika	2014	Jelen in sod., 2014
Glp227	HG793902	Argentina	2014	Jelen in sod., 2014
KM7103	HG793903	Argentina	2014	Jelen in sod., 2014
KM10788	HG793904	Argentina	2014	Jelen in sod., 2014
KM12025	HG793905	Argentina	2014	Jelen in sod., 2014
KM5066	HG793906	Argentina	2014	Jelen in sod., 2014
5170R (GW5170R)	HG793907	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
10508M(GW10508M)	HG793908	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
2817WA (GW2817WA)	HG793909	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
1960B (GW1960B)	HG793910	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
8899J (GW8899J)	HG793911	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
1962F (GW1962F)	HG793912	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
10506J (GW10506J)	HG793913	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
5475P (GW5475P)	HG793914	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
1983M (GW1983M)	HG793915	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
6786B (GW6786B)	HG793916	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: 190 HPV-6-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-6	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
2484W (GW2484W)	HG793917	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
5467LB (GW5467LB)	HG793918	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
4030F1 (GW4030F1)	HG793919	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
2492A (GW2492A)	HG793920	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
1977M (GW1977M)	HG793921	Avstralija	2014	Jelen in sod., 2014
CA1544	HG793922	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1460	HG793923	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA2053	HG793924	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA939	HG793925	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA147	HG793926	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1628	HG793927	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1834	HG793928	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1267	HG793929	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1154	HG793930	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA1315	HG793931	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
CA404	HG793932	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
C257	HG793933	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
C258	HG793934	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
C159	HG793935	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
C156	HG793936	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
C2	HG793937	Kanada	2014	Jelen in sod., 2014
PG144A	HG793938	Slovenija	2014	Jelen in sod., 2014

Priloga B: 63 HPV-11-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-11	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
PPH11	M14119	Nemčija	1986	Dartmann in sod., 1986
LZod45-11	EU918768	Kitajska	2009	Wu in sod., 2009
HUNG1	FR872717	Madžarska	2011	Gáll in sod., 2011
GUMC-AJ-Lung	JN644142	ZDA	2012	Yuan in sod., 2012
CU16	JQ773408	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2012
CU17	JQ773409	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2013
CU18	JQ773410	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2014
CU19	JQ773411	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2015
CU20	JQ773412	Tajska	2012	Chansaenroj in sod., 2016
A86	FN870021	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A346	FN870022	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
LP12	FN907957	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A260	FN907958	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A47	FN907959	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CAC246	FN907960	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
A48	FN907961	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CAC86	FN907962	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
CS20	FN907963	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
LP13	FN907964	Slovenija	2011	Maver in sod., 2011
GUMC-AJ	JN644141	ZDA	2013	Yuan in sod., 2013
LP138	HE611258	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP19	HE611259	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP6	HE611260	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP8	HE611261	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP133	HE611262	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP220	HE611263	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP126	HE611264	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP146	HE611265	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP221	HE611266	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP1	HE611267	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP16	HE611268	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP20	HE611269	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP14	HE611270	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP2	HE611271	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP27	HE611272	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: 63 HPV-11-pozitivnih vzorcev z opredeljenimi celotnimi nukleotidnimi zaporedji

Vzorec HPV-11	Pristopna številka v genski banki GenBank	Država izvora vzorca	Leto objave	Raziskovalna skupina
LP170	HE611273	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP229	HE611274	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP174	HE962023	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX35	HE962024	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LPX27	HE962025	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP262f	HE962365	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP224f	HE962366	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP253f	HE962367	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
LP255f	HE962368	Slovenija	2013	Kocjan in sod., 2013
JO-RRP_1	HE574701	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_2	HE574702	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_3	HE574703	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_4	HE574704	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
JO-RRP_5	HE574705	Madžarska	2013	Gáll in sod., 2013
AVS-0847K-1	/	Avstralija	2014	še ni objavljeno
AVS-0847K-2	/	Avstralija	2014	še ni objavljeno
LT-4	/	Litva	2014	še ni objavljeno
CZ 16	/	Češka	2014	še ni objavljeno
KM4840	/	Argentina	2014	še ni objavljeno
KM10808	/	Argentina	2014	še ni objavljeno
C 8	/	Kanada	2014	še ni objavljeno
C 177	/	Kanada	2014	še ni objavljeno
C 185	/	Kanada	2014	še ni objavljeno
C 256	/	Kanada	2014	še ni objavljeno
JAR 34/08	/	Južna Afrika	2014	še ni objavljeno
JAR 23/10	/	Južna Afrika	2014	še ni objavljeno
YM 3	/	Hong Kong	2014	še ni objavljeno
YM 42	/	Hong Kong	2014	še ni objavljeno

Priloga C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
Glp227	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM7103	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM10788	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM5066	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
GIA011	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA277	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA282	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA410	A	/	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA435	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA443	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIA478	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb111	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb124	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb132	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb154	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb259	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
Glb344	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIp030	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIp300	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIp412	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GIp433	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
KM12893	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
KM14354	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM15012	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
KM15053	A	/	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM4799	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
KM7099	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM8517	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
KM8574	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
G1b206	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
G1p388	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM5114	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
G1A429	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM9265	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	moški
G1I8C	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
G1I8D	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
G1I8E	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
G137D	B	B1	Južna Amerika	Argentina	ni podatka	ni podatka	moški
G141D	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
G149E	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
G1814	B	B1	Južna Amerika	Argentina	področje glave in vratu	ni podatka	moški
G1844	B	B1	Južna Amerika	Argentina	področje glave in vratu	papilom grla	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
KM12025	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
KM12538	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
KM13176	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
KM13196	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
KM14309	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
KM14745	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
KM4631	B	B2	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
KM4707	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
KM7141	B	B1	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
KM9674	B	B3	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
PIAR37	B	B1	Južna Amerika	Argentina	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
PIAR40	A	/	Južna Amerika	Argentina	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PIAR51	A	/	Južna Amerika	Argentina	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
0495F	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
10506J	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
10508M	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
1828M	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
1829B	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
1960B	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
1962F	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
1967E	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
1977M	B	B3	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
1982Y	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
1983M	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
2484W	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
2492A	B	B3	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
2494E	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
2817WA	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
3220E	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
3375V	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
4030F1	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
4607M2	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5170R	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5364D	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AC26	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	moški
5376P	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5464R	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5467LB	B	B2	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5470R1	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
5475P	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
6786B	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
8542H	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
8898T2	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
8899J	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
8899Ja	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
8903J	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
9056T	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
9057J	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
9066D	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AC52	A	/	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	moški
AC74	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	moški
AC93	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	moški
C176	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C228	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C284	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C760	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
GW3370M	B	B1	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
GW3372R	A	/	Avstralija	Avstralija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
RRP18270	A	/	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP21112	A	/	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP42842	B	B2	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP43315	B	B2	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP43364A	B	B2	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
RRP54322	B	B1	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP935815	B	B2	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP9453315	A	/	Avstralija	Avstralija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
NCBILP1	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP10	B	B3	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP11	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP12	A	/	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP13	B	B3	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP14	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP15	B	B3	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP16	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP17	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP18	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP2	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP3	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP4	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
NCBILP5	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP6	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP7	B	B1	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
NCBILP8	B	B3	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
NCBILP9	B	B3	Južna Amerika	Brazilija	področje glave in vratu	papilom grla	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
C266	B	B2	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
C9	B	B2	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CA1544	A	/	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1460	A	/	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C257	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
CA2053	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C258	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C159	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C156	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
CA939	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA147	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1628	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1834	B	B2	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1267	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1154	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C2	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
CA1315	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA404	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C119	A	/	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C120	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C122	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
C130	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C136	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C149	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C15	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
C157	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C158	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C160	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C161	B	B2	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C164	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C168	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C174	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C204	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C212	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C218	B	B2	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C22	B	B1	Severna Amerika	Kanada	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
C229	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C23	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C240	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C247	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C25	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C250	A	/	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
C251	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C26	B	B2	Severna Amerika	Kanada	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
C265	B	B3	Severna Amerika	Kanada	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
C27	A	/	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C3	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C41	A	/	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C44	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C60	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C61	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C72	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C77	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C83	B	B2	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C86	A	/	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C91	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
CA1277	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA1926	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA2447	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA2606	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CA2646	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C154	B	B3	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C100	B	B3	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
C236	B	B1	Severna Amerika	Kanada	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
C85	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
C47	B	B1	Severna Amerika	Kanada	ni podatka	ni podatka	ni podatka
ZGB248	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB366	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB364	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB127	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB241	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB146	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB155	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB83	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB183	B	B2	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB274	B	B3	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB40	B	B3	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB125	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB101	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB120	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB121	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB13	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB139	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB14	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
ZGB169	B	B3	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB224	B	B3	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB227	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB232	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB246	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB284	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB287	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB309	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB342	B	B2	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB348	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB362	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB367	B	B3	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB50	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB73	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB98	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB34	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
ZGB299	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB360	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB347	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	ni podatka	ni podatka
ZGB1	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
ZGB163	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
ZGB178	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
ZGB21	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
ZGB217	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
ZGB23	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
ZGB32	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
ZGB44	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
ZGB46	B	B1	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
ZGB71	A	/	Evropa	Hrvaška	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ01	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ07	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ10	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ11	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ12	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ13	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ14	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ21	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ22	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ23	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ24	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ25	B	B3	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ26	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CZ3	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ30	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ32	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ33	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ34	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ35	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ36	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ37	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ38	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ39	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ4	B	B2	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ40	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ41	B	B2	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ42	B	B4	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ43	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ45	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ46	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ47	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ48	A	/	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ49	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ5	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CZ50	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CZ51	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ54	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ55	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ56	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ57	A	/	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ58	A	/	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
CZ59	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ6	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ60	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ62	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ63	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ64	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ65	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ66	B	B1	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ67	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	moški
CZ68	A	/	Evropa	Češka	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CZ8	A	/	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CZ9	B	B1	Evropa	Češka	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
N8572	A	/	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7266	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
N8819	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7701	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7014	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N4964	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N4543	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N1088	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5757	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N2805	B	B2	Evropa	Nemčija	ni podatka	ni podatka	moški
N8603	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N0526	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7745	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N2656	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7670	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N0343	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N0486	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N1097	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N1167	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N1595	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N1745	B	B1	Evropa	Nemčija	ni podatka	ni podatka	moški
N1764	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N2430	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
N2512	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N2788	B	B3	Evropa	Nemčija	ni podatka	ni podatka	ni podatka
N2813	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N2992	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N3577	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5036	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5158	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5432	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5452	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N6006	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N6690	A	/	Evropa	Nemčija	ni podatka	ni podatka	moški
N7483	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7545	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7607	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7655	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7857	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N8902	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N9328	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N9384	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N9451	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N5070	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
N5256	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7832	B	B1	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N9129	B	B3	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
N7468	B	B2	Evropa	Nemčija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
YM112	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM116	B	B3	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM117	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM12	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM130	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM132	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM133	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM135	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM136	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM148	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM15	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM152	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM153	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM154	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM155	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM159	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM161	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
YM162	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM163	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM165	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM173	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM174	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM188	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM201	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM22	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM225	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM23	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM24	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM25	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM30	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM31	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM39	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM40	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM44	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM48	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM49	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM54	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM55	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
YM58	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM6	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM62	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM63	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM65	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM67	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM7	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM73	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM75	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM76	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM77	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM78	B	B4	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM90	A	/	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
YM92	B	B1	Azija	Hong Kong	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
JP1044	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1062	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1080	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1093	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1096	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1187	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1188	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
JP1281	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1294	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1332	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1352	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1442	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1457	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1481	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1509	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1569	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1595	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1605	B	B3	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1651	B	B4	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1661	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1828	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1847	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1848	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1849	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1853	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1914	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1936	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1940	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
JP1961	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP1977	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP2010	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP36	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP556	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP650	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP791	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP945	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP946	A	/	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
JP969	B	B1	Azija	Japonska	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
LT1	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT11	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT13	B	B1	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT15	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT3	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT5	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
LT6	A	/	Evropa	Litva	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
MY11011451	A	/	Azija	Malezija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
MY11060293	B	B1	Azija	Malezija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
MY12041494	B	B1	Azija	Malezija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
SRB131AK	A	/	Evropa	Srbija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
SRB198AK	B	B3	Evropa	Srbija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
AGB1309	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB1566	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB162	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB1621	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB1796	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB181	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB1851	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB1955	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB2162	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB2635	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB2708	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB275	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB2790	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB2869	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB2951	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB3055	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB410	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB656	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB702	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
AGB755	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
AGB887	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB950	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
AGB968	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC1	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC11	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC116X	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC21	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC21z	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC221	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC226	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC231	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC236	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC23z	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC241	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC251c	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC26	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC271	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC276	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC281	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC286	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC291	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CAC296	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC301	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC306	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC31	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC316	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC326	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC32z	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC331	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC341	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC351	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC36	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC361	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC366	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC371	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC377	A	/	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC41	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC44z	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC46	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC46z	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC51	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC56	B	B3	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CAC6	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC61	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC76	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC81	B	B2	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC91	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CAC96	B	B1	Evropa	Slovenija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
LP10	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP100	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP101	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP104	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP109	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP11	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP127	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP129	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP130	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP137	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP145	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP176	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP182	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP184	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP189	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
LP211	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP22	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP23	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP238	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP240	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP243	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP244	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP26	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP28	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP4	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP49	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP54	B	B2	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP66	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP69	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP73	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP83	B	B2	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP88	A	/	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP92	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP93	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP94	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
LP98	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
LPX34	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP148	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP210	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
LP98(131)	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
PG144A	B	B1	Evropa	Slovenija	področje glave in vratu	papilom grla	moški
SA2008	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
SA4009	A	/	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
SA4408	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
SA5708	A	/	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
VBD1209	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
VBD1910	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
VBD2210	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
VBD4608	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
VBD6108	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
ZA2ZA10	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
ZA2ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA26ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA28ZA10	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA3ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA32ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA38ZA12	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
ZA42ZA11	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA46ZA10	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA46ZA11	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA46ZA12	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA47ZA8	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA48ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA49ZA10	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA4ZA9	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
ZA5ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA54ZA10	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA55ZA11	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA58ZA9	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA60ZA11	B	B1	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA64ZA8	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
ZA65ZA8	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
ZA65ZA11	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA71ZA9	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA77ZA9	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
ZA7ZA9	B	B2	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	moški
ZA80ZA9	B	B3	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
ZA8ZA10	B	B2	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
ZA9ZA9	B	B5	Afrika	Južna Afrika	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
PV0529	B	B2	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1499	A	/	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1666	B	B1	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1667	B	B2	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1731	B	B2	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1732	B	B3	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV1774	B	B2	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV2345	B	B1	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV2530	B	B2	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	moški
PV2702	A	/	Evropa	Švedska	področje glave in vratu	papilom grla	ženska
CH11149	A	/	Evropa	Švica	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	moški
CH11335	B	B1	Evropa	Švica	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
CH11554	B	B5	Evropa	Švica	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
CH517	B	B2	Evropa	Švica	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
CH6748	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
CH9824	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
CH541	A	/	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH446	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1504	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH7416	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CH10641	B	B5	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1077	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH10888	B	B3	Evropa	Švica	ni podatka	ni podatka	ni podatka
CH10924	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH11710	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1308	B	B2	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1339	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1519	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1579	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2054	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2236	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2240	B	B2	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2336	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2399	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2469	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2752	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2780	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH367	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH404	B	B2	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH4061	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH459	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
CH483	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH761	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH7625	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH805	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH8256	A	/	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH8324	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH8391	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH8983	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH9447	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH9503	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1488	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH1622	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2105	A	/	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH3393	B	B3	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH6275	B	B5	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH9193	B	B2	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH6059	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH9439	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH3275	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
CH2205	B	B1	Evropa	Švica	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
F47718	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
F49413	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
F50027	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
F50528	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
F50602	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
GW36	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
GW4	B	B2	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M33382	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M39010	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M44371	A	/	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M46769	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M47769	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M47875	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M48163	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M49576	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M49898	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M51033	A	/	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
M6	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
RRP110	B	B2	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP115	B	B2	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP44	B	B4	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP45	B	B3	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
RRP48	B	B1	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
RRP56	B	B5	Evropa	Velika Britanija	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
UK455	B	B2	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
UK8672	B	B2	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
VB9026	B	B3	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
VB908	B	B1	Evropa	Velika Britanija	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
6e1gt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
6e2gt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
6e3rt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
6e4rt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
6f5gt	A	/	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
6f6gt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ni podatka
6f7rt	B	B1	Severna Amerika	ZDA	področje glave in vratu	papilom grla	ni podatka
HPV6a	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
PPH6LCRA	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
PPH6LCRB	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
PPH6LCRC	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
PPH6LCRD	A	/	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
PPH6LCRE	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	anogenitalna bradavica	ženska
BK1	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK10	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
BK11	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK13	B	B2	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK14	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK16	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK17	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK18	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK19	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK2	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK3	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK30	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK31	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK32	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK33	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK34	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK36	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK37	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK39	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK4	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK40	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK41	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK42	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: 724 HPV-6-pozitivnih vzorcev, vključenih v statistično analizo

Vzorec HPV-6	Genetska linija	Genetska podlinija	Celina	Država izvora vzorca	Anatomsko področje	Vrsta benigne spremembe	Spol
BK43	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK45	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK46	A	/	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK5	B	B1	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK50	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK55	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK59	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK6	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK8	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska
BK9	B	B3	Severna Amerika	ZDA	anogenitalno področje	ni podatka	ženska