

# Molekularna karakterizacija i klinički značaj novog tipa humanog papiloma virusa HPV159

---

Marković, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:119435>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Iva Marković

**Molekularna karakterizacija i klinički značaj novog tipa  
humanog papiloma virusa HPV159**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

**Molekularna karakterizacija i klinički značaj novog tipa humanog papiloma virusa HPV159**

**Iva Marković**

**Rad je izrađen** na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani

**Mentor:** dr. sc. Ljiljana Krstin, **doc.**

**Komentor:** dr. sc. Mario Poljak, **prof.**

**Neposredni voditelj:** dr. sc. Lea Hošnjak

**Kratak sažetak diplomskog rada:** Papiloma virusi (PV) velika su i heterogena grupa malih nekapsuliranih virusa iz porodice Papillomaviridae. Imaju kružni dvolančani DNA genom te uzrokuju benigne i maligne promjene na koži i mukoznim tkivima. Klasificira ih se na osnovi nukleotidne sličnosti L1 gena. Do kolovoza 2019. kompletno su sekvencirana 222 humana papiloma virusa (HPV, engl. *human papillomavirus*) koji su podijeljeni u pet PV rodova: *Alphapapillomavirus* (Alpha-PV), *Betapapillomavirus* (Beta-PV), *Gammapapillomavirus* (Gamma-PV), *Mupapillomavirus* (Mu-PV) i *Nupapillomavirus* (Nu-PV). Cilj ovog istraživanja bio je napraviti kompletnu molekularnu analizu novog viralnog genoma HPV159, filogenetski ga smjestiti unutar porodice PV, odrediti njegov tkivni tropizam te viralne varijante i klinički značaj.

**Broj stranica:** 67

**Broj slika:** 7

**Broj tablica:** 17

**Broj literaturnih navoda:** 106

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Gljučne riječi:** *Betapapillomavirus*, rani i kasni virusni proteini, nekodirajuće područje, filogenetska karakterizacija, viralni tropizam

**Datum obrane:** 25. listopada 2019.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. **Dr.sc. Zorana Katanić, doc.**, predsjednik
2. **Dr.sc. Ljiljana Krstin, doc.**, mentor član
3. **Dr.sc. Lidija Begović, doc.**, član
4. **Dr.sc. Senka Blažetić, doc.**, zamjenik člana

**Rad je pohranjen:**

na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology**

**Graduate university study programme in Biology**

**Scientific Area: Natural science**

**Scientific Field: Biology**

**Molecular characterization and clinical relevance of a novel human papillomavirus type HPV159**

**Iva Marković**

**Thesis performed at** at Institute of microbiology and immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana

**Supervisor:** Ljiljana Krstin, **PhD, Assistant Professor**

**Co-supervisor:** Mario Poljak, **PhD, Professor**

**Assistant in charge:** Lea Hošnjak, **PhD**

**Short abstract:** Papillomaviruses (PVs) are a large and heterogeneous group of small non-enveloped viruses from the Papillomaviridae family. PVs have circular double-stranded DNA genome and are, etiologically linked with various benign and malignant neoplasms of the skin and mucosa. They are classified based on their similarities in the L1 gene. Until August 2019., 222 human papillomavirus (HPV) types have been completely sequenced and classified into five PV genera: *Alphapapillomavirus* (Alpha-PV), *Betapapillomavirus* (Beta-PV), *Gammapapillomavirus* (Gamma-PV), *Mupapillomavirus* (Mu-PV) and *Nupapillomavirus* (Nu-PV). The aim of the present study was to perform the complete molecular analysis of the novel HPV159 viral genome, phylogenetically place the virus within the PV family, and determine its viral tissue tropism, viral variants and their clinical significance.

**Number of pages:** 67

**Number of figures:** 7

**Number of tables:** 17

**Number of references:** 106

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Betapapillomavirus*, early and late viral proteins, non-coding region, phylogenetic characterization, viral tropism

**Date of the thesis defence:** 25<sup>th</sup> October 2019.

**Reviewers:**

1. Zorana Katanić, **PhD, Assistant professor**, chair
2. Ljiljana Krstin, **PhD, Assistant professor**, supervisor and member
3. Lidija Begović, **PhD, Assistant professor**, member
4. Senka Blažetić, **PhD, Assistant professor**, substitute member

**Thesis deposited:**

on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Diplomski rad je izrađen kao dio Erasmus + stručne prakse na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani pod vodstvom prof.dr.sc. Marija Poljaka.

*U prvom redu zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Ljiljani Krstin na stručnim savjetima, razumijevanju, nesebičnoj pomoći i korisnim diskusijama pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem i komentoru prof.dr.sc. Mariju Poljaku na iskazanom povjerenju i ukazanoj prilici za sudjelovanje u radu njegovog laboratorija u Ljubljani tijekom Erasmus + studentske stručne prakse.*

*Velike zahvale i neposrednoj voditeljici dr.sc. Lei Hošnjak na iznimnom strpljenu i odgovorima na sva moja pitanja, posvećenom vremenu tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada, kao i svom prenesenom znanju koje sam stekla tijekom boravka u Ljubljani.*

*Zahvaljujem se i svim zaposlenicima i kolegama studentima Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Ljubljani koji su bili spremni pomoći u radu u laboratoriju i koji su mi omogućili sve potrebne uvjete za izradu diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način olakšali izradu ovog diplomskog rada i obilježili moje vrijeme studiranja te ga učinili nezaboravnim.*

*I za kraj najveća zahvala mojoj obitelji za sva odricanja, savjete, razumijevanje, pomoć i bezuvjetnu ljubav tijekom studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Povijesni pregled otkrića HPV-a.....	1
1.2. Porodica PV-a .....	2
1.3. Struktura PV-a.....	4
1.4. Životni ciklus PV-a .....	13
1.4.1. Imunološki odgovor.....	15
1.5. Epidemiologija, dijagnostika i liječenje PV infekcije .....	16
1.6. Molekularne metode za identifikaciju novih PV-a .....	20
1.6.1. Polimerazna lančana reakcija .....	21
1.6.2. Umnožavanje virusnog genoma po principu RCA.....	23
1.6.3. Sekvenciranje sljedeće generacije .....	23
1.7. Cilj istraživanja .....	24
2. MATERIJALI I METODE.....	25
2.1. Materijali.....	25
2.1.1. Referentni uzorak HPV159 .....	25
2.1.2. Kolekcija uzoraka.....	25
2.2. Metode.....	26
2.2.1. Molekularna definicija genoma HPV159 .....	26
2.2.2. Filogenetsko određivanje genoma HPV159 .....	27
2.2.3. Kvantitativni RT-PCR za umnožavanje dijela gena za humani beta-globin .....	27
2.2.4. Izolacija plazmidne DNA .....	29
2.2.5. Pripremanje standarda.....	30
2.2.6. Umnožavanje dijela genoma HPV159 RT-PCR-om.....	31
2.2.7. Izračunavanje virusnog opterećenja u HPV159 pozitivnim uzorcima .....	32
2.2.8. Umnožavanje LCR sekvence HPV159 za određivanje varijanti virusa .....	32

2.2.9. Umnožavanje virusnog genoma po principu <i>rolling circle amplification</i> (RCA)	34
2.2.10. Ugniježđeni PCR	35
2.2.11. Procjena PCR produkata	37
2.2.13. Sekvenciranje PCR produkta	38
2.2.12.1. Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije	39
2.2.12.2. Analiza slijeda nukleotida	39
3. REZULTATI	40
3.1. Definicija genoma novootkrivenog genotipa HPV159	40
3.2. Značaj virusnih proteina HPV159	41
3.3. Filogenetska definicija HPV159	42
3.4. Tkivni tropizam i klinički značaj infekcije sa HPV159	44
3.4.1. Karakteristike tipične za HPV159 kvantitativni PCR u realnom vremenu	44
3.4.2. Virusno opterećenje u HPV159 pozitivnim uzorcima	45
3.5. Umnožavanje LCR HPV159 i identifikacija viralnih varijanti HPV159	48
4. RASPRAVA	50
5. ZAKLJUČAK	56
6. Literatura	58



## 1.UVOD

### 1.1. Povijesni pregled otkrića HPV-a

Papiloma virusi (PV) raznolika su grupa virusa koja zaražava ljude i životinje. Porijeklo im je povezano s promjenama na epitelu njihovih domaćina pojavom gmazova prije 350 milijuna godina. Od tada su se razvijali i zajedno evoluirali sa svojim domaćinima te se sada mogu pronaći kod ptica, gmazova, tobolčara i sisavaca, ali ne i kod nižih rodova životinja kao što su vodozemci (Doorbar 2005, 2007). Prvi PV-i identificirani su u obliku viralnih čestica, a kasnije i kao DNA koju je moguće klonirati kod sisavaca, prvo kod zečeva (Shope i Hurst 1933, Bernard 2013) i goveda, kao i u velikim ljudskim kožnim bradavicama. Naziv virusa dodijelio se tako da se koristio naziv vrste u kojoj je pronađen, npr. *bovine papillomavirus* (BPV) kod goveda, *cottontail rabbit papillomavirus* (CRPV) kod zečeva ili *human papillomavirus* (HPV, humani papiloma virus) kod ljudi. Također, kako je za istog domaćina postojalo više genotipova virusa koji ga mogu zaraziti, tada je nazivu dodan i broj, npr. HPV1 i HPV2 (Bernard 2013). U novije se vrijeme nazivi PV-a formiraju s pomoću znanstvenih naziva vrste domaćina, tako imamo primjer za MfPV1, tj. *Macaca fascicularis papillomavirus-1* (Joh i sur. 2009, Bernard 2013). Isprva je zanimanje za HPV bilo malo i istraživanja su se uglavnom koncentrirala na životinjskim PV-ima, ponajprije zečevima i govedima. Istraživanja na PV-ima goveda pokazala su se kao velika pomoć kod analiza HPV-a koje su slijedile (zur Hausen 2009).

Kožne i genitalne bradavice poznate su još od vremena starih Grka i Rimljana, ali tek je sredinom 19. stoljeća, godine 1842., proučavajući izvještaje o smrti žena u Veroni, Rigoni-Stern uočio učestalu pojavu raka vrata maternice u udanih žena, udovica i prostitutki, ali i vrlo rijetku pojavu iste bolesti u djevice i časnih sestara. Na osnovu toga je zaključio da je za razvoj te bolesti odgovoran uzročnik koji se prenosi spolnim kontaktom (zur Hausen 2009). Strauss i suradnici prvi su put 1949. godine uspješno prikazali virusnu česticu elektronskim mikroskopom, a uzročnik je prvi put opisan 1965. godine otkrićem genetičkog materijala HPV-a (Crawford 1965). Daljnja istraživanja virusa bila su otežana činjenicom da se PV ne razmnožavaju u staničnoj kulturi. Tek je razvojem molekularne biologije 70-ih godina dvadesetog stoljeća otkriven velik broj HPV genotipova na temelju razlika antigena genitalnih i kožnih bradavica (Almeida i sur. 1969, zur Hausen 2009). Nakon toga u ranim 80-im godinama 20. stoljeća izolacijom određenih PV iz raka cerviksa dolazi do brzog širenja istraživanja ovih virusa koje je napredovalo u sljedećim godinama s brojnim kliničkim DNA testovima i razvojem cjepiva (Dürst i sur. 1983, Bernard 2013).

Upravo taj nagli razvoj istraživanja HPV-a 1982. doveo je do izoliranja genoma HPV6 iz spolne bradavice i HPV11 iz laringealnog papiloma čovjeka (Gissman i sur. 1982). Harald zur Hausen 80-ih godina dvadesetog stoljeća dokazuje da su HPV16 i 18 u velikom broju istraživačkih studija bili ključni čimbenik za nastanak prekanceroznih lezija te karcinoma vrata maternice (zur Hausen 1974a,b). Usprkos velikim naporima brojnih laboratorija, tek je devedesetih godina prošlog stoljeća općenito prihvaćeno da su određeni tipovi HPV-a bitno povezani s pojavom karcinoma vrata maternice, kao i s pojavom prekanceroznih lezija (Bosch 1995, Schiffman 1993).

Istraživanja koja su uslijedila bila su usmjerena na mehanizme njihove onkogenosti. Otkriveni su virusni proteini i njihova uloga, ponajprije E6 i E7 proteini, a uočena je i delecija u virusnom genomu prilikom integracije u genom domaćina (Schwarz i sur. 1985).

## **1.2. Porodica PV-a**

Virusi se klasificiraju u porodice na temelju filogenetike. Filogenetsko stablo je dijagram sastavljen od grana i čvorišta koja predstavljaju odnose (de Villiers i sur. 2004, de Villiers 2013). Virusi iz porodice Papillomaviridae vrlo su heterogeni mali DNA virusi koji zaražavaju širok spektar vrsta kralježnjaka i povezani su s razvojem raznih neoplastičnih promjena (novotvorbi) na koži i mukoznom epitelu usta, anusa i genitalija, te epitelu endocerviksa (Kocjan i Poljak 2011, Bernard 2013, Kocjan i sur. 2015). PV-i su virusi čiji se genetski materijal sastoji od kružne dvolančane DNA (circular DNA, od engl. *circular double stranded DNA*) veličine otprilike 8 000 parova baza (bp, od engl. *base pair*) koja kodira za najčešće osam gena te ima ikozaedersku kapsidu (de Villiers i sur. 2004, Kocjan i Poljak, 2011, McLaughlin-Drubin 2014, Tommasino 2016). Do sada su otkrivena oko 222 HPV-a te oko 211 animalnih PV-a koji su izolirani i sekvencirani. Klasificirani su na osnovi svoje genomske sekvence i naziva ih se genotipovima (van Doorslaer i sur. 2017). Porodica Papillomaviridae podijeljena je u rodove na osnovu L1 (engl. *large/major protein*) sekvence. PV-i koji dijele identitet u 60 – 70 % L1 sekvence identificiraju se kao vrsta, dok se oni sa 71 – 89 % identiteta L1 sekvence smatraju tipom, oni sa 90 – 98 % su podtipovi, a oni sa >98 % smatraju se varijantama (Harden, 2016).

Međunarodni je HPV referentni centar (engl. *International Human Papillomavirus Reference Center*) 2012. godine prebačen na Karolinski institut (šved. *Karolinska Institutet*) u Stockholmu u Švedskoj i odgovoran je za potvrđivanje novih HPV genotipa i

skladištenje referentnih klonova virusnih genoma. Postojeći HPV genotipovi pripadaju nekom od pet rodova PV-a: *Alphapapillomavirus* (*Alpha-PV*), *Betapapillomavirus* (*Beta-PV*), *Gammapapillomavirus* (*Gamma-PV*), *Mupapillomavirus* (*Mu-PV*) i *Nupapillomavirus* (*Nu-PV*). Svaki od njih izražava tropizam za određenu vrstu epitela. Filogenetski, većina PV pripada *Alpha*, *Beta* i *Gamma* rodu. Iznimka je HPV1 koji je glavni uzrok benignih plantarnih i običnih bradavica koji je dio roda *Mu*, te HPV41 koji je jedini opisani član *Nu* roda (McLaughlin-Drubin 2014).

HPV-i se mogu ugrubo razvrstati u skupinu koja zahvaća epitel kože ili onu koja zahvaća epitel sluznice. Zaraza na epitelu kože uočava se u stanicama pločastog epitela kože (npr. obične bradavice), a zaraza može ostati u stanici asimptomatski godinama. Koža sluznice uzrokuje zaraze i replicira se u membrani sluznice (npr. genitalne lezije). PV-i koji inficiraju kožni, keratinizirani (rožnati) epitel imaju pristup bazalnim epitelnim stanicama na mjestu ozljede, dok oni koji zaražavaju mukozni epitel inficiraju specifičan tip stanica na skvamokolumnarnoj zoni. Infekcije PV-om obično uzrokuju benigne, hiperplastične, produktivne lezije, koje se obično naziva bradavicama. Neke infekcije mogu dugo opstati u bazalnim epitelnim stanicama. Sam produktivni životni ciklus PV-a povezan je s diferencijacijom inficiranih stanica i umnožavanjem viralnog genoma u epitelnim stanicama domaćina (de Villiers i sur. 2004, Howley i Lowy 2007, McLaughlin-Drubin 2014, Quint i sur. 2014).

HPV možemo podijeliti prema njihovom karcinogenom potencijalu, odnosno stupnju rizika razvoja karcinoma i nastankom prekancerogenih lezija. HPV visokog rizika (engl. *high risk*, HR) većinom se pojavljuje u zloćudnim oštećenjima epitela, karcinomima i displazijama visokog stupnja, a HPV niskog rizika (engl. *low risk*, LR) ponajviše se nalaze u dobroćudnim oštećenjima epitela poput genitalnih bradavica (Muñoz i sur. 2003, Burd 2003, de Villiers i sur. 2004, Stanley i sur. 2007, Franco 2005).

#### 1.2.1. *Beta-PV*

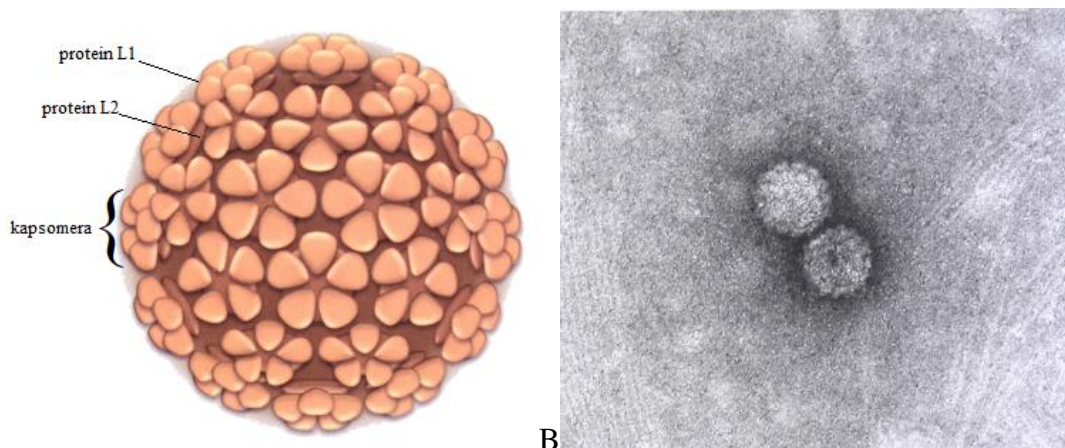
Na *Alpha*- i *Beta-PV* odlazi 90 % vrsta trenutno karakteriziranih HPV-a. U rod *Beta-PV* pripadaju HPV-i povezani s nastankom benignih i malignih promjena na koži kod imuno oslabljenih osoba i bolesnika s rijetkom nasljednom bolešću koja se zove bradavičasta epidermodisplazija (*Epidermodysplasia verruciformis*, EV). Kod osoba koje nemaju genetske predispozicije ti virusi najčešće uspostavljaju latentnu infekciju i rijetko uzrokuju benigne promjene kože. HPV genotipovi iz rodova *Gamma*, *Mu* i *Nu* uzrokuju razne

benigne promjene na koži (Doorbar 2006, Kocjan i Poljak 2011, Kocjan i sur. 2015, Quint i sur. 2014).

Genomi *Beta*-PV-a imaju kraću nekodirajuću kontrolnu regiju (LCR, engl. *long control region*) i rezultiraju manjim genomom nego oni kod mukozalnih HR-HPV-a. Također mu nedostaje E5 gen u ranoj regiji, ali novija istraživanja pokazuju da ga se može pronaći u obliku E8<sup>E2C</sup> transkripta te da ima vrlo sličnu funkciju kao protein u mukozalnom HR-HPV-u (Tommasino 2016). Smatralo se da su infekcije *Beta*-PV-ima specifične samo za pacijente oboljele od EV jer se korištenjem standardnih DNA hibridizacijskih tehnika, kao što su *Southern blot*, *dot blot* i *in situ* hibridizacija, nije moglo otkriti *Beta*-PV kod pacijenata bez EV (Majewski i Jablonska 2002, Potočnik 2006). Ali korištenjem osjetljivijih dijagnostičkih pristupa, kao što je PCR s degeneriranim početnicama, *Beta*-PV mogao se otkriti u raznim kutanoznim lezijama, uključujući 65 – 90 % nemelanomskog karcinoma kože (engl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC) kod imunokompetentnih i imunooslabljenih pojedinaca (Potočnik 2006).

### 1.3. Struktura PV-a

Naziv papiloma dolazi od latinske riječi *papilla* (bradavica) i grčke riječi *oma* (tumor). Iako imaju različite simptome i kliničke pojave bolesti, HPV-i su nekapsulirani virusi simetrije ikozaedra (Presečki i sur. 2002, Doorbar 2005, Kocjan i Poljak 2011). Imaju kružni dvolančani DNA genom, veličine oko 8 kbp i molekulske mase  $5,2 \times 10^6$  Da. Čestica je promjera 55 nm te taksonomski spadaju u skupinu Papillomaviridae. DNA genom obavijen je bjelančevinskim plaštom, tj. kapsidom koju čine dvije strukturne bjelančevine bez ovojnice. Strukturne bjelančevine koje grade kapsidu jesu veliki (L1) i mali (L2) proteini koji su organizirani u 72 morfološke jedinice, tj. kapsomere. Točnije, svaka kapsomera sastoji se od 5 virusnih proteina L1 koji su povezani disulfidnim vezama i jednim aksijalno postavljenim virusnim proteinom L2 koji ima funkciju zadržavanja oblika kapsomere (Slika 1.). Virusni je genom uz pomoć histona sastavljen u kromatin i nalazi se unutar kapside (Doorbar 2005, 2006, Kocjan i Poljak 2011, Tommasino 2016, McBride 2017).



Slika 1. A) Građa virusne čestice HPV; B) Mikroskopski prikaz *Papillomavirus*; preuzeto iz Kocjan i Poljak 2011

Virusni genom dijelimo na tri različita područja, dva kodirajuća i jedno nekodirajuće područje. Cijelo kodirajuće područje (engl. *open reading frame*, ORF) predstavlja većinu virusnog genoma i dijeli se na L (kasno, engl. *late*) i E (rano, engl. *early*) prema prostorno-vremenskom obrascu ekspresije tijekom životnog ciklusa virusa (Kocjan i Poljak 2011, Van Doorslaer 2013, Tommasino 2016). Većina HPV-a ima šest različitih ranih gena unutar genotipa: E1, E2, E4, E5, E6 i E7. Oni sadržavaju proteine odgovorne za razmnožavanje virusa (E1 za replikaciju, a E2 za transkripciju), vezanje za citokeratin (E4), staničnu transformaciju (E5-vezanje na receptore za čimbenik rasta) i onkogenezu (E6 i E7) (Doorbar 2005, 2007, Yugawa 2009, Tommasino 2016). Dva najvažnija HPV proteina u patogenezi zloćudnih bolesti jesu E6 i E7 (Munger i sur. 2002). Kasna regija sadrži dva gena: L1 i L2. Veliki protein kapside (L1) tvori od 80 do 90 % svih proteina kapside. Preostali dio kapside čini mali protein (L2). Nekodirajuća kontrolna regija nalazi se između L1 i E6 područja gena i sadrži većinu regulatornih elemenata uključenih u viralni proces replikacije i transkripcije DNA (Tommasino 2016).

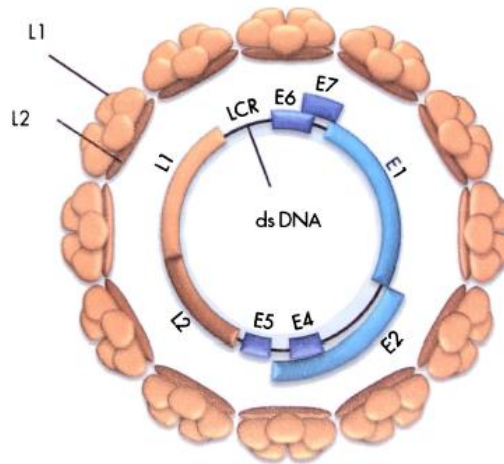
### 1.3.1. Nekodirajuće područje

Između ORF L1 i E6 nalazi se LCR, a također se zove URR (engl. *upstream regulatory region*), dužine 500-1000 bp. Nekodirajuće područje LCR ne nosi zapise za virusne proteine, nego uključuje većinu *cis*-djelujućih regulatornih sekvenci koje reguliraju replikaciju i transkripciju virusnog genoma: mjesto početka replikacije virusnog genoma (engl. *origin of replication*, ori), rane virusne promotore, brojna vezna mjesta za stanične i virusne čimbenike transkripcije te proteine pojačivače i represore za regulaciju (Joh i sur. 2009, Kocjan i Poljak 2011). Vezna mjesta koja se pojavljuju u LCR uključuju TATA

sekvence (engl. *TATA box*) ranog promotora transkripcije virusnih gena na koju su vezani transkripcijski faktori i pojedinačni TFIID-TATA-vezujući protein (TBP, engl. *TATA binding protein*), te vezna mjesta za preostale faktore transkripcije stanica, kao što su Ap-1, NF-1 i Sp1. Na 5' kraju postoji konsenzusna sekvenca kasnog poliadenilacijskog signala (AATAAA) gdje dolazi do završetka transkripcije molekula mRNA kasnih virusnih proteina, te dodavanje poliadenilacijskog repa na njihov 3' kraj tijekom obrade u poliadenilaciji (Chen i sur. 2009). Na 3' kraju LCR-a nalazi se ori mjesto koje obuhvaća AT-bogato područje, mjesto vezanja E1 proteina i najmanje jednu konsenzusnu sekvencu ACC(N)<sub>6</sub>GGT kao mjesto vezanja za protein E2 (E2BS, engl. *E2 binding site*). Protein E1 veže se na dugu, nepotpunu palindromsku regiju od 18 bp unutar ori mjesta koja je sastavljena od 6 obrnutih i preklapajućih sekvenci koje se mogu identificirati s konsenzusnim motivom AT(A/G/T)G(C/T)(C/T) i AACNAT. Ti motivi nisu jednako očuvani u svim genotipovima PV-a. Na području LCR-a određena su mjesta vezanja za čimbenike koji se izražavaju samo u određenim tipovima stanica što utječe na tropizam PV-a (Longworth i Laimins 2004, Doorbar 2006, Bergvall i sur. 2013, McBride 2008, 2013, 2017).

### 1.3.2. Virusni proteini

Virusni genom uporabom višestrukih promotora i složenih alternativnih uzoraka izrezivanja kodira tipične virusne proteine s visoko očuvanim funkcionalnim domenama, što PV-ima omogućuje da uspješno završe svoj životni ciklus i inficiraju nove stanice domaćina (De Villiers i sur. 2004, Kocjan i sur. 2017). Područja ranih proteina (E1, E2, E4, E5, E6 i E7) uključena su u regulaciju replikacije virusne DNA, ekspresiju virusnih gena, interakciju sa staničnim proteinima, uspostavljanje odgovarajuće stanične okoline za virusno umnožavanje u eliminaciju imunih odgovora, dok su proteini kasnog područja (L1 i L2) strukturni proteini virusnih kapsida (Slika 2.) (Kocjan i Poljak 2011, McBride 2017).



Slika 2. Organizacija genoma HPV; preuzeto iz Kocjan i Poljak 2011

**E1 protein** je heksamerna, ATP-ovisna DNA helikaza i jedini enzim kodiran od strane PV-a. Bitan je za replikaciju i amplifikaciju viralnog episoma u jezgri inficiranih stanica keratinocita (Bergvall 2013, Harden 2016). Ima najveći ORF cijelog PV genoma i veličina mu varira od 600 do 6500 aminokiselina (AK), ovisno o genotipu PV-a. Protein može biti podijeljen na tri funkcionalna segmenta: N-terminalnu regulatornu regiju koja je esencijalna za optimalnu replikaciju *in vivo*, centralnu vezujuću domenu (engl. *DNA-binding domena*, DBP) koja prepoznaje specifična mjesta na ori mjestu, i C-terminalna enzimatska domena dostatna za slaganje u heksamere koji pokazuju ATP-aznu aktivnost i sposobni su odmotati DNA dupleks (Bergval 2013). Na svom karboksilnom kraju sadrži ATP-vezno mjesto s konsenzusnim slijedom Gx4GK(T/S) koji prije početka replikacije virusnog genoma u staničnoj jezgri omogućuje djelovanje ATP-ovisne heksamerne DNA helikaze, nespecifičnog vezanja E1 proteina za DNA, i kao takvo predstavlja mjesto vezanja E2 proteina. Amino kraj proteina E1 sadrži oko 200 AK i najmanje je očuvan segment proteina (Bergval 2013). Sadrži brojne kratke sekvence AK motiva koji uključuju bipartitni jezgreni lokalizacijski signal (engl. *nuclear localization signal*, NLS), ciklin vezujući motiv (engl. *cyclin-binding motif*, CBM) koji je u interakciji sa ciklin A/E kompleksom i ciklin-ovisnom kinazom 2 (engl. *cyclin dependent kinase 2*, Cdk2). NLS je sastavljen od visokoočuvane sekvence KRK i manje konzervirane serije argininskih i lizinskih ostataka. Oba područja razdvojena su s približno 30 AK, a među njima se obično nalazi leucinom bogat jezgreni signal (engl. *nuclear export signal*, NES) s konsenzusnim motivom  $Lx_{(2-3)}Lx_2(L/I/V)x(L/I)$ . U nizu NLS postoji vezno mjesto za ciklin s konsenzusnim slijedom RxL na koji se veže ciklin E/ciklin A vezan u kompleksu s kinazom ovisnom o ciklinu, Cdk2. Stanična fosforilacija serina ili treonina i prolinskih

ostataka ((S/T)P), tj. cdk-fosforilacijska mjesta, u blizini sekvenci dvaju transportnih signala uzrokuju promjene u konformaciji i afinitetu NLS-a za vezivanje receptora nuklearnih transportnih nosača-karioferina (importini i eksportini). Tako je reguliran transport jezgreno-citoplazmatskog protein E1 kroz kompleks jezgrinih pora, te je omogućena regulacija i koordinacija replikacije virusne DNA umnožavanjem DNA domaćina unutar stanične jezgre. DNA-vezujuća domena, nekad se naziva i origin-vezujuća domena (engl. *origin-binding domain*, OBD). To je prva domena E1 proteina koja je kristalizirana i nalazi se između C- i N-terminalne regije. Prepoznaje specifične sekvence u ori mjestu i karakterizirana je s osamnaest AT-bogatih nepravilnih palindroma. Daljnje analize ovog područja pokazuju da sadrži šest E1 veznih mjesta konsenzus sekvence 5'-ATTGTT-3' (Longworth i Laimins 2004, Joh i sur. 2009, Bergvall i sur. 2013, Chouhy i sur. 2013, McLaughlin-Drubin 2014, McBride 2008, 2017).

**E2 protein** velik je 350–500 AK i u sebi ima dvije funkcionalne domene koje omogućavaju obavljanje funkcije transkripcijskog faktora pri regulaciji ekspresije ranih virusnih gena. On je DNA vezujući protein koji se veže na specifične konsenzusne motive (ACCGN<sub>4</sub>CGGT ili ACCN<sub>6</sub>GGT) koji su uglavnom smješteni u LCR području. Očuvana C-terminalna regija (otprilike oko 85–100 AK) sadrži DNA vezujuću domenu s motivom leucinskog zatvarača (Lx6Lx6Lx6L) kojim se virusni protein može povezati na mjesto E2BS u LCR-u i povezivanjem s leucinskim zatvaračem drugog proteina E2 formirati dimer (Doorbar 2006, Joh i sur. 2009, Harden 2016, McBride 2017). Prije početka replikacije virusnog genoma E2 surađuje s E1 proteinom u kooperativnom vezanju na ori mjesto jer je vezanje E1 proteina slabo i nespecifično te zahtijeva dodatno vezanje E2 proteina na susjedna mjesta E2BS i formiranje E1/E2 kompleksa. Na N-kraju E2 proteina pronađena je transaktivacijska domena bogata glutaminom koja se veže na E1 protein i kroz vezu s određenim staničnim proteinima kao što je Brd4 omogućava interakciju virusne DNA s transkripcijski aktivnim regijama genoma domaćina, što ubrzava proces aktiviranja transkripcije virusnih gena (Longworth i Laimins 2004, McBride 2017). Kod *Beta-PV* visoko očuvan RxxS motiv u E2 regiji fosforiliran je djelovanjem protein kinaze A. To potiče vezanje na kromatin domaćina i mitotički kromosom i stabilizira E2 protein. Zavisne (engl. *hinge*) regije E2 *Beta-PV*-a bogate su serin-arginin dipeptidima, i to potiče lokalizaciju tih proteina s pjegavim spojem (engl. *splicing speckle*) i njihovu asocijaciju sa splicing proteinima. Većina E2 veznih mjesta sadrži barem jedan CpG dinukleotid. Metilacija citozina na CpG motivu jedna je od najvećih epigenetičkih modifikacija u



stanicama sisavaca i snažno je povezana s represijom transkripcije (McBride 2017). Proteini E1 i E2 regrutiraju stanične DNA polimeraze i druge esencijalne enzime da bi omogućile replikaciju svog viralnog genoma (Harden 2016).

**E4 protein** se u potpunosti nalazi unutar ORF-a E2 proteina i stoga nema vlastiti početni (engl. *start*) kodon te se stoga protein E4 uglavnom prevodi kao fuzijski protein iz mRNA E1<sup>E4</sup> gdje većinski dio pripada ORF-u E4 i kratkog početnog dijela ORF-a E1 (Longworth i Laimins 2004, Moody 2010, Van Doorslaer i sur. 2017). E4 doprinosi uspjehu amplifikacije genoma i sinteze virusa s visokom razinom ekspresije što pridonosi dodatnim ulogama u otpuštanju i/ili prenošenju virusa (Harden 2016). Jasno je uočljiv u uzorcima biopsije metodom imuno bojanja i može biti detektiran u lezijama uzrokovanim različitim PV genotipovima, uključujući one kod pasa, zečeva, stoke i ljudi. E4 proteini *Beta-*, *Gamma-* i *Mu-* PV genotipova slažu se u karakteristične citoplazmatske, i ponekad nukleotidne, inkluzijske granule (Doorbar 2006, 2013). U diferenciranim epitelnim stanicama E4 protein se izražava u kasnim fazama životnog ciklusa PV-a. Istraživanja su pokazala da svojim djelovanjem doprinosi uspješnom razmnožavanju virusnog genoma te se u obliku multimera može vezati na citokeratinske mreže staničnog skeleta. Time se potiče reorganizacija i propadanje njihove strukture te olakšava pojava novih zrelih stanica iz zaražene stanice domaćina. Na svom N-kraju E4 protein sadrži domenu s konsenzusnim motivom LLxLL (engl. *leucine-cluster domain*) ili neku od njegovih verzija. Ta domena je ključna u vezi s citokeratinima, dok C-kraj dopušta multimerizaciju E4 proteina (Doorbar 2006, Kocjan i Poljak 2011, Doorbar 2013, Harden 2016).

**E5** mali je, hidrofobni, transmembranski protein koji se kod zaraženih stanica nalazi prije svega u membrani endoplazmatskog retikuluma, endosomima i Golgijevu aparatu, povremeno i u staničnim membranama. Najbolje je istražen kod BPV-a (Doorbar 2006, Longworth i Laimins 2004, Harden 2016). Učinak E5 proteina pozitivno utječe na recikliranje ili inhibira degeneraciju receptora tirozin-kinaze epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) što dovodi do povećane signalizacije EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) i potiče proliferaciju stanica čime pomaže u inicijaciji maligne transformacije zaraženih stanica (Doorbar, 2006). Osim toga protein E5 je uključen i u apoptozi kao i kod izbjegavanja imunološkog odgovora blokiranjem prijenosa molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) razreda I u staničnoj membrani. Na taj način blokira prikazivanje virusnog genoma limfocitima T (Bravo i Alonso 2004, Kocjan i Poljak 2011, Harden 2016).

**Proteine E6 i E7** nazivamo onkoproteinima i oni su odgovorni za pojavljivanje zloćudnih transformacija stanica domaćina koje dovode do formacije tumora. E6 onkogeni protein veže se za tumor supresor p53 i inaktivira ga, dok se E7 veže za tumor supresor retinoblastoma i inaktivira ga (Aarthy 2018). Njihova ključna uloga je održavanje odgovarajuće okoline za umnožavanje PV-a. Oni također promiču proliferaciju inficiranih stanica i inhibicije zaštitnog djelovanja staničnih proteina koji inhibiraju pojavu tumora u stanicama, što u nekim slučajevima može dovesti do besmrtnosti inficiranih stanica i njihove maligne transformacije (De Villiers i sur. 2004, Kocjan i Poljak 2011, Doorbar 2013, Harden 2016).

**E6 protein** sastavljen je od približno 150 AK i u sebi sadrži dvije domene cinkovih prstiju (engl. *zinc-finger domain*) koje se uglavnom pronalaze u jezgri s visoko očuvanim konsenzusnim sekvencama CxxC(x)<sub>29</sub>CxxC, koje su međusobno odvojene s 36 AK i vežu cinkove ione te su odgovorni za unutarstaničnu stabilnost i konformaciju. Prvi protein koji pokazuje interakciju s E6 je E3 ubikvitin ligaza poznata i kao E6 povezani protein (engl. *E6 associated protein*, E6AP) (Howie 2009, Tomassino 2016, Estevao i sur. 2019). Ubikvitin kaskada funkcionira tako da cilja proteine za proteosomalnu razgradnju dodavanjem nekoliko ubikvitinskih monomera na protein koji bi trebao biti uništen. Prvi identificirani i najistraženiji cilj E6/E6AP je p53 tumor supresor, iako su i drugi proteini također zahvaćeni djelovanjem tog kompleksa. Motiv na E6AP koji se povezuje na E6 je vrlo dobro karakteriziran, i naziva se LxxLL motiv. Sekvenca E6AP koja je u interakciji sa E6 je ELQELLGE (Howie 2009, McLaughlin-Drubin 2014). Na C-kraju proteina E6 HR-HPV genotipa nalazi se PDZ-vezujući motiv s konsenzusnom sekvencom xT/SxV/L koji se zajedno s AK ostacima u blizini specifično veže na PDZ domenu određenih staničnih proteina koji su uključeni u regulaciju staničkog rasta, staničnu adheziju, staničnu polarnost i signalizaciju povezanu s proliferacijom i apoptozom stanica. Istraživanja su pokazala da se protein E6 u inficiranim stanicama nalazi u jezgri i citoplazmi gdje se može vezati na velik broj različitih staničnih proteina, kao gore spomenuti proteini sa PDZ domenom i proteina p53 koji inhibira tumor, a vezanjem često izaziva njihovu degradaciju. Također je pronađeno da E6 protein HR-HPV-a ima sposobnost aktiviranja ekspresije katalitičke subtelomerase hTERT koja u svakoj staničnoj diobi na krajevima kromosoma održava istu dužinu telomera i sprječava starenje. Telomeraza je aktivna samo u kanceroznim i matičnim stanicama, dok u somatskim stanicama obično nije izražena (Longworth i Laimins 2004, Thomas i sur. 2008, Bergin i sur. 2013, McLaughlin-Drubin

2014). E6 nekih HPV genotipova (HPV5 i HPV8) također može ciljati p300 koji je transkripcijski koaktivator p53 i ostalih transkripcijskih faktora. Inhibicija p300 dovodi do inhibicije kalcijem vođene diferencijacije kao i do smanjenja efikasnosti popravka DNA nastale kao posljedica UV-zračenja (McLaughlin-Drubin 2014).

**E7 protein** je protein pomagač sastavljen od približno 100 AK i nalazi se prvenstveno u jezgri zaraženih stanica. Među onkoproteinima E7 je prvi otkriven mali fosfoprotein i sadrži tri očuvane regije (engl. *conserved region*, CR) CR1, CR2, CR3 (Tommasino 2016, Estevao i sur. 2019). E7 ima glavnu ulogu u životnom ciklusu HPV-a reprogramirajući stanični okoliš da bi bio pogodan za viralnu replikaciju (Roman i Munger, 2013). Prva identificirana stanična meta E7 je supresor tumora-protein retinoblastoma (pRB). CR2 posjeduje vezujuću domenu s karakterističnim motivom LxCxE koji omogućava stabilno povezivanje proteina Rb porodice, kao što su p107, p130 i pRB, koji prije početka diferencijacije stanica reguliraju izlaz stanica iz staničnog ciklusa. Sva tri proteina kontroliraju stanični ciklus tako da reguliraju ekspresiju različitih setova staničnih gena (McLaughlin-Drubin 2014, Tommasino 2016). Vezanje proteina E7 na Rb porodicu proteina štiti njihovu aktivnost (Longworth i Laimins 2004, Bergin i sur. 2013). Na C-kraju proteina E7, u CR3, nalazi se domena cinkova prsta CxxC(x)<sub>29</sub>CxxC, povezana sa sličnim motivom E6 proteina, koja pospješuje oblikovanje dimera virusnog proteina i omogućava njeno pravilno djelovanje. Predloženo je da su E6 i E7 proteini evoluirali od istog pretka, tako imamo slučajeve kada neki PV kodiraju E6 protein, ali ne E7 i obrnuto (Longworth i Laimins 2004, Liu i sur. 2006, Roman i Munger 2013, McLaughlin-Drubin 2014).

Završetak viralnog ciklusa uključuje ekspresiju **L1** i **L2 proteina** potrebnih za pakiranje genoma i formiranje virusne stanice (Harden 2016). Elegantna ikozaedralna struktura PVA formirana je od jednog proteina koji se naziva L1 protein. To je protein od ~55 kD sa sposobnošću da se spontano složi u virusu nalik čestice (VLPs, engl. *virus like particles*). VLP-ovi predstavljaju uglavnom nerazlučivu vanjsku površinu 60 nm nekapsuliranog viriona PVA. Pročišćeni rekombinantni L1 protein može postići slaganje ovih kompleksa bez prisutnosti *chaperona* koji su onda moćni imunogeni (Schiller i Lowy 2012, Buck i sur. 2013). Ova saznanja su dovela do razvoja cjepiva na osnovi VLP-ova koja pružaju efektivnu zaštitu od infekcija HPV-ima koji uzrokuju pojavu raka i drugih promjena tkiva. Zbog toga što ima najočuvaniji ORF od svih virusnih proteina, L1 se koristi za filogenetsku organizaciju i klasifikaciju HPV-a (Harden 2016). L1 tvori kompletnu vanjsku površinu stabilnog, zrelog viriona i kao takav mora inicirati prihvaćanje za stanicu

ili tkivo domaćina. Nakon prihvaćanja L1 mora postati dovoljno savitljiva da bi dopustila otpuštanje viralnog genoma u novu ciljnu stanicu (Buck i sur 2013). Sazrijevanje virusne čestice odvija se u gornjim slojevima terminalno diferenciranog skvamoznog (pločastog) epitela gdje su čestice izložene oksidirajućem okolišu. Taj proces sazrijevanja uključuje akumulaciju disulfidnih veza između L1 proteina te rezultira kondenzacijom kapside i time povećava stabilnost i otpornost na utjecaj proteolitičkih enzima (Harden 2016). Vanjska površina viriona PV poprilično je kvrgava. Svaki od 72 čvora sastoji se od pentamerne L1 kapsomere. N- i C-kraj postavljeni su tako da formiraju produžene strukture koje formiraju područje između čvorova kapsomere (Modis i sur. 2002). C-kraj je posebno razvijen, na vrhovima između susjednih kapsomera se stvaraju disulfidne veze. One su bitne za održavanje stabilnosti viriona. Nezreli virioni nemaju disulfidne veze i fizički su lomljivi (Burk i sur. 2013). Početna interakcija kapside PV-a sa stanicom domaćina se najviše može pripisati interakciji L1 sa ugljikohidratima heparan sulfata (HS) koji se nalaze na proteoglikanima (HSPG) (Burk i sur. 2013). Interakcija kapside s HSPG rezultira suptilnom konformacijskom promjenom koja uzrokuje izlaganje amino terminalnog dijela proteina L2 (Richards i sur. 2006, Burk i sur. 2013).

Kapsidni L2 protein igra bitnu ulogu u slaganju PV i infektivnim procesima. Dok L1 formira većinu kapside i može se složiti u prazne VLP čestice, L2 je manja komponenta kapside i nedostaje joj sposobnost stvaranja VLP-ova (Wang i Roden 2013). L2 ima oko 500 AK, koje se slažu s predviđenom molekularnom masom od otprilike 55 kDa, iako se SDS-PAGE analizom dobije molekularna masa od 64-78 kDa. Razlog ovog fenomena nije poznat jer ne postoje poznate posttranslacijske modifikacije L2 proteina (Doorbar i Gallimore 1987, Jin i sur. 1989, Wang i Roden 2013). Osnovna struktura viriona PV-a neomotana je ikozaedralna kapsida dijametra od 55 do 60 nm. Svaki virion sadrži oko 360 L1 proteina koji se prvo stabilno slažu u zvjezdaste strukture od 5 kapsomera koje imaju centralnu šupljinu. Kapsida je formirana od 72 kapsomere te se povezuje disulfidnim vezama. Kapsida također sadrži nedefiniran broj L2 proteina, iako je predviđen broj od 72 L2 proteina. (Buck i sur. 2008, Wang i Roden 2013). Istraživanja Finnena i suradnika na HPV11 otkrila su da postoji L1-vezujuće mjesto na karboksi kraju L2 proteina. C-terminalna L1-vezujuća regija L2 proteina karakterizirana je s nekoliko ostataka prolina (PxxP). Homologni PxxP ostatci pronađeni su u sličnim regijama C-kraja drugih L2 proteina što nalaže da je to dobro očuvano L1-vezujuće mjesto na PV-ima (Buck i sur. 2008, Lowe i sur. 2008, Wang i Roden 2013). Amino terminalni kraj L2 proteina sadrži

dvije visoko konzervirane cisteinske regije (C22 i C28) u svim PV genotipovima koji formiraju intramolekularne disulfidne strukture ukosnice radije nego da se mostom povezuju sa L1 (Wang i Roden 2013). Struktura L2 se vrlo teško vizualizira, vjerojatno zbog neodgovarajućeg slaganja u kapsidu, degradacije, poremećene ili smanjene simetrije (Wang i Roden 2013). Na N- kraju proteina L2 se nalazi mjesto za stanični enzim furin s konsenzusnim motivom RxK/RR čije cijepanje omogućuje ulaz viriona u stanicu domaćina i važan je kod kasnije bijega virusne DNA od endolizosomalnog odjeljka gdje dolazi do propadanja virusne kapside ovisno o pH. U neposrednoj blizini N-kraja proteina L2 nalazi se područje sa ransmembranskom domenom, dužine otprilike 23 AK, koji uključuje brojne visoko očuvane, prekrivajuće GxxxG motive, te omogućuje proteinu L2 u kompleksu sa virusnom DNA da pobjegne iz kasnog endosoma i prođe kroz citoplazmu do endosomalne membrane. (Doorbar 2006, Bronnimann i sur. 2013, Wang i Roden 2013). U početnoj fazi infekcije važnu ulogu ima argininom bogat transportni signal NRS (engl. *nuclear retention signal*) koji se nalazi u srednjem dijelu proteina L2 i vezanjem za jezgreni matriks uključen je u očuvanje kompleksa proteina L2 i virusne DNA u staničnoj jezgri (Mamoor i sur. 2012).

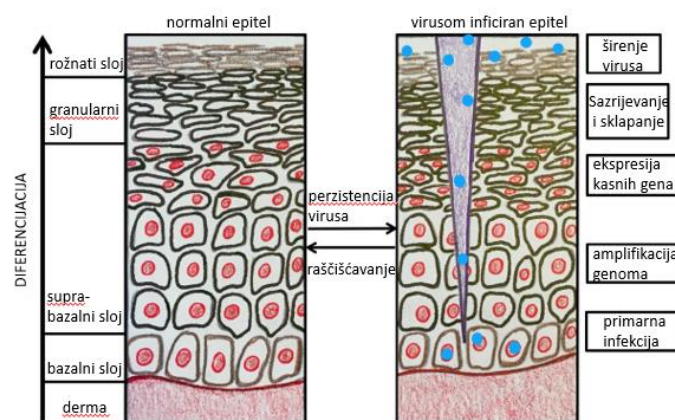
#### **1.4. Životni ciklus PV-a**

S vremenom su virusi sisavaca i njihovi domaćini dostigli stadij ravnoteže u kojem domaćin nije u nepovoljnom položaju, a virus nije limitiran imunim odgovorom domaćina u svom reproduktivskom kapacitetu (Bernard 2005, Frazer 2009). Sisavci su razvili sofisticirane urođene i stečene mehanizme imunog odgovora kojima mogu kontrolirati virusne infekcije i ograničiti štetu na domaćinu ako se infekcija zadrži duže vremena, ali unatoč svim tim mehanizmima virusne infekcije i dalje dugo opstaju u domaćinu (Frazer 2009).

Virus koristi mikroozljede epitela da bi došao do bazalnih keratinocita, jedinih mitotički aktivnih stanica epitela te uzrokovao njihovu zarazu (Burd 2003, Stanley i sur. 2007, Bodily i sur. 2011, Aksoy i Gottschalk 2017). Prvo se povezuje na bazalnu membranu, a nakon toga i na staničnu površinu preko interakcije s viralnim L1 proteinom i heparan sulfat proteoglikanom (HPSG). U početnoj fazi infekcije dolazi do vezanja virusne kapside L1 na primarno vezno mjesto koje predstavlja receptor HSPG na bazalnoj membrani. Nadalje, kapsida se prenosi do sekundarnog vezujućeg mjesta koje se nalazi na površini stanice i koje predstavlja receptor HSPG. Ulazak u stanicu zahtijeva određene

konformacijske promjene kapside preko proteaza i *chaperona*, te interakciju kapside s različitim receptorima (Doorbar 2006, Kocjan i Poljak, 2011, Harden, 2016, Aksoy i Gottschalk 2017).

Životni ciklus PV-a usko je povezan s biologijom keratinocita, točnije stupnjem njihove zrelosti, koji formiraju vanjski sloj kože (epidermu), kao i druge strukture stratificiranih pločastih epitela koji uključuju genitalije, oralnu šupljinu i jednjak (Slika 3.). Bazalne su stanice nositelji HPV-infekcije i nedugo nakon infekcije bazalnih stanica broj virusnih genoma se povećava od 50 do 100 primjeraka po stanici, neovisno o staničnom ciklusu. Replikacija virusnog genoma tada prati stanični ciklus domaćina. Budući da su PV-i ovisni o replikaciji DNA stanica domaćina, da bi nastavili svoje napredovanje, oni zadržavaju stanicu u replikativnom stanju, tj. u S-fazi, što je duže moguće. To je posebno važno jer terminalna diferencijacija keratinocita predstavlja programiranu staničnu smrt, tj. apoptozu. Virus je uspio evolucijski stvoriti specifična svojstva kako bi produžio kritični period S-faze tako što se povezuje na tumor supresorski gen pRB (Feltkamp 2008, Kocjan i Poljak 2011, Harden 2016). Uglavnom se sintetiziraju proteini E6 i E7, uz male količine drugih virusnih proteina, posebno E1 i E2 koji su nužni za početak replikacije i dupliciranja virusnog genoma. Zbog utjecaja E6 i E7, a dijelom i E5 zaražene stanice superbazalnog sloja se dijele češće nego obično prije nego što dođu u gornji sloj epitela. Kada dođu u trnasti sloj (lat. *stratum spinosum*), oni čine potrebnu količinu proteina HPV potrebnih za replikaciju virusa (E1 i E2). Povišena razina proteina E2 stvara virusne onkogene koji isključuju proliferaciju epitelnih stanica i omogućuje njihovu diferencijaciju u keratinocitima (Feltkamp 2008, Kocjan i Poljak 2011, Quint i sur. 2014).



Slika 3. Životni ciklus HPV-a u diferencirajućem skvamoznom epitelu; preuzeto iz Harden 2016

Kasna faza viralnog životnog ciklusa tijekom koje se sastavljaju virusi događa se samo u keratinocitima koji se nalaze u terminalnom diferencijacijskom koraku koji konačno vodi do perutanja (engl. *desquamation*) mrtvih keratinocita u okoliš (Doorbar 2005).

UV-radijacija vrlo je bitan dio sunčeva spektra emitiranih zraka i poznata je kao jedan od većih faktora rizika u razvoju raka kože. UVB radijacija uzrokuje oštećenja DNA i time potiče stanicu na kraj staničnog ciklusa, popravak DNA i naposljetku apoptozu. Smatra se da su infekcije *Beta-PV* povezane s utjecajem UV radijacije na stanice domaćina te da utječu na prirodnu obranu stanica od genotoksičnog djelovanja UVB radijacije interferiranjem s popravkom DNA i apoptozom (Feltkamp 2008, Quint i sur. 2014).

Infekcija u kojoj virus uspješno završava svoj životni ciklus naziva se produktivna virusna infekcija, a promjene koje se tada javljaju jesu produktivne promjene ili lezije. Mnogi HPV genotipovi uzrokuju samo ovu vrstu promjene i rijetko, ili nikada, pojavu zloćudnih promjena. Zbog umnožavanja HPV-a u konačnim diferenciranim stanicama dolazi do morfoloških promjena. Taj citopatski efekt karakterističan za HPV naziva se koilocitoza (engl. *coilocytosis*). Za nju je karakteristična skrivena, hiperkromirana jezgra različitih oblika, kromatin je skupljen i oko jezgre se pojavljuje prepoznatljiv svijetli pojas ili aureola. Koilocitoza je znak produktivne virusne infekcije koja se odražava u kolapsu stanica i histološki je najvidljivija u gornjoj trećini epitela benignih lezija povezanih s HPV-om (Moody i Laimins 2010, Kocjan i Poljak 2011).

Rak vrata maternice najgora je posljedica infekcije HPV-om. Nastaje kod žena koje su dugotrajno zaražene jednim od HR-HPV-a, najviše HPV16 i HPV18. Kod tih osoba se izgubi zaštitno djelovanje staničnih protutumorskih proteina koje nastaje kao posljedica prekomjerne količine virusnih proteina E6 i E7, te vodi do nastanka raznih sekundarnih mutacija koje mogu dovesti do pojave raka (Feltkamp 2008, Moody i Laimins 2010, Kocjan i Poljak 2011).

#### 1.4.1. Imunološki odgovor

Imunološki odgovor na HPV infekciju još je uvijek nepoznat i neuobičajeno spor i slab u usporedbi s ostalim virusima, što sugerira da je HPV evolucijski razvio određene mehanizme kojima uspješno izbjegava imunološki odgovor. Primarni mehanizam je izbjegavanje prezentacije antigena, tj. nedostatak lize stanica i sistematska viremija smanjuje mogućnost prezentiranja antigena, kao i osiguranje da nekoliko pro-inflamatornih signala bude pušteno da bi pobudilo adaptivni imuni odgovor (Frazer 2009). Umnožava se

samo u gornjim slojevima kože i sluznice, bez značajne lize stanica ili nekroze tkiva. Za razliku od drugih virusa, tijekom HPV infekcije ne postoji viremija, tj. nema prisutnih virusa u krvi. Na taj način se smanjuje količina virusnog antigena te se osigurava minimalna količina upalnih signala koji bi mogli aktivirati imunološki sustav. Od posebnog interesa su HR-PV-i koji imaju predispoziciju za stvaranje raka kože ili genitalija. Proučavanje imunološkog odgovora ovih PV-a otežano je zbog specifičnosti za jednu vrstu domaćina i ograničenim mogućnostima istraživanja viralne reprodukcije *in vitro* (Frazer 2009, Kocjan i Poljak 2011, Quint i sur. 2014). Procjenjuje se da je prosječno vrijeme od HPV infekcije do pojave mjerljivog iznosa anti-HPV protutijela u serumu (seroverzije) 12 mjeseci, dok u 18 mjeseci nakon infekcije 54 – 69 % zaraženih osoba razvije mjerljivu razinu protutijela za virusne proteine L1 (Frazer 2009, Kocjan i Poljak 2011). Niža razina humoralnog odgovora potaknutog prirodnom infekcijom HPV-om nije posebno snažna, a ni dugotrajna. Stoga, antitijela nastala nakon prirodne infekcije ne štite od ponovne infekcije istim HPV genotipom. Također, antitijela proizvedena prirodnom infekcijom karakteriziraju određeni HPV genotip i ne štite od dodatne infekcije drugim HPV genotipovima (zur Hausen 2009, Frazer 2009).

Najviše imunogena komponenta patogenih PV-a veliki je kapsidni protein L1. Infekcija PV dovodi do humoralnog imunog odgovora na virusnu kapsidu koja je prepoznata samo kad je složena u pentamernu strukturu (Frazer 2009). Adaptivni imuni odgovor na HPV je puno sporiji od onoga za većinu ostalih patogenih virusnih infekcija. Razina antitijela koja prati prirodnu infekciju je niska i teže ju je odrediti testovima (Ferguson i sur. 2005, Frazer 2009).

Većina infekcija PV-ima ne ubije svog domaćina ili mu narušava reproduktivni fitness. Manjak oštećenja na stanici domaćina osigurava minimalan imunološki odgovor domaćina, omogućavajući opstanak viralnih funkcija koje mogu opstati mjesecima pa i godinama sa stalnom mogućnosti nastavka viralne infekcije na nove osjetljive domaćine (Frazer 2009, Mody i Laimins 2010).

### **1.5. Epidemiologija, dijagnostika i liječenje PV infekcije**

Različiti rodovi HPV-a prenose se na različite načine, tako se genotipovi roda *Alpha* uglavnom prenose intimnim kontaktom sluznice i kože, najčešće seksualnim odnosima. Ovi se virusi rijetko prenose preko kontaminiranih površina ili predmeta (npr. donje rublje,



igračke, kirurške rukavice ili kirurški instrumenti). Uglavnom inficiraju mukozalni epitel anogenitalnog trakta i oralne šupljine (Doorbar 2005, McLaughlin-Drubin 2014). Epidemiološka ispitivanja pokazala su da je više od 90 % infekcija s HR-HPV prolazno te ne dovode do nastanka premalignih promjena, dok samo oko 5 – 10 % zaraženih žena razvije trajnu infekciju s jednim ili više HR-HPV-a te imaju veći rizik od razvoja malignih novotvorbi. Učestalost infekcije rodom *Alpha*-PV slična je i kod muškaraca, ali kod njih je infekcija HPV-om najčešće asimptomatska. *Alpha*-PV poznati su kao mukozalni i poznato je da HPV infekcija može opstati i da je njegov opstanak značajno doprinosi riziku pojave HPV povezanog raka. Također, većina mukozalnih infekcija očisti se nakon dvije godine od početka infekcije kao rezultat imuniteta T-stanica (Feltkamp 2008, Kocjan i Poljak 2011). Većina infekcija nema kliničkih manifestacija i prolazi spontano, ali ponekad se mogu pojaviti i lezije koje je potrebno tretirati i liječiti. LR-HPV-i, kao što su HPV6 i HPV11, su odgovorni za nastanak benignih lezija te ne napreduju u malignim promjenama. Dok HR, kao što su HPV16 i HPV18, uzrokuju pločaste intraepitelne lezije koje mogu napredovati do pojave raka. Do sada je poznato da više od 99 % raka vrata maternice sadrži i izražava sekvence HR-HPV-a, s time da su HPV16 i HPV18 otkriveni u 70 % slučajeva raka vrata maternice (Doorbar 2005, McLaughlin-Drubin 2014).

HPV genotipovi svrstani u *Beta*, *Gamma*, *Mu* i *Nu* (Tablica 1.) uglavnom se prenose izravnim kontaktom kože s kožom osoba koje imaju kliničke promjene povezane s HPV-om (npr. česte kožne bradavice) ili neizravno preko kontaminiranih površina ili predmeta (npr. tuševi, saune, bazeni) (Kocjan i Poljak 2011, Harden 2016).

Tablica 1. Glavni HPV genotipovi, njihov tropizam i bolesti povezane s njima; preuzeto iz Harden 2016.

Rod	Vrsta	Reprezentativni HPV genotipovi	Tropizam	Povezana bolest
Alpha-PV	$\alpha$ 1	32	Mukozni	Heckova bolest
	$\alpha$ 2	3, 10, 28	Kutanozni	Ravne bradavice
	$\alpha$ 4	2, 57, 27	Kutanozni	Obične bradavice
	$\alpha$ 7	18, 39, 45, 59, 68	Mukozalni	Intraepitelna neoplazija, invazivni rak
	$\alpha$ 9	16, 31, 33, 35, 52, 58	Mukozalni	Intraepitelna neoplazija, invazivni rak
	$\alpha$ 10	6, 11	Mukozalni	Genitalne bradavice
	$\alpha$ 10	13	Mukozalni	Heckova bolest

<b>Beta-PV</b>	$\beta 1$	5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 36, 47	Kutanozni	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
	$\beta 2$	9, 15, 17, 22, 23, 37, 38	Kutanozni	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
	$\beta 3$	49	Kutanozni	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
<b>Gamma-PV</b>	$\gamma 1$	4, 65	Kutanozni	Bradavice
	$\gamma 4$	60	Kutanozni	Bradavice
<b>Mu-PV</b>	$\mu 1$	1	Kutanozni	Plantarne bradavice
	$\mu 2$	63	Kutanozni	Bradavice
<b>Nu-PV</b>	$\nu$	41	Kutanozni	Bradavice

Za razliku od *Alpha-PV*, *Beta-* i *Gamma-* duže ostaju na koži i uglavnom uzrokuju skrivene infekcije. *Beta-PV* mogu se prenositi unutar rožnatih stanica ili biti otpuštene kao slobodne stanice. Kao posljedica toga infekcije *Beta-PV* mogu se pojaviti već i pri rođenju. Tako su te infekcije česte u ranom djetinjstvu, a istim genotipom *Beta-PV* mogu biti zaraženi roditelji i njihova djeca (Antonsson i sur. 2003, Quint i sur. 2014, Tommasino 2016). Osobe sa transplantiranim organima imaju veću mogućnost za infekciju genotipom *Beta-PV*, kao i povećan rizik razvitka nemelanomskog karcinoma kože u usporedbi sa zdravim osobama (Boyle i sur. 1984, Kiviat 1999, Tomassino 2016). Kod ljudi oslabljenog imuniteta, kao što su osobe zaražene HIV-om, te osobe s transplatiranim organima, ti se virusi mogu dokazati u dlačnim folikulima. To dovodi do hipoteze da je područje ispupčenja (engl. *bulge area*) vanjskog sloja dlake jedno od glavnih spremišta *Beta HPV*-a. Istraživanja pokazuju da infekcija jednim *Beta-PV* genotipom, ili više njih, može opstati 6 mjeseci ili duže u velikom broju pojedinaca (Hsu i sur. 2009, Tommasino 2016). Pod utjecajem imunosupresije HPV aktivacija *Beta-* i *Gamma-* roda u ovih bolesnika često se razvija i s novotvorbama na koži. Prijenos *Beta-PV* se odvija preko izravnog kontakta s kožom zaražene osobe ili njenih derivata, kao što su ljuskice kože i perut (Doorbar 2005, Feltkamp 2008, Kocjan i Poljak 2011). Može proći inkubacijsko razdoblje od 3 tjedna do 8 mjeseci prije nego lezije postanu vidljive. Benigne bradavice mogu biti visoko produktivne i sadržavati i do  $10^{12}$  virusnih čestica i obično pokazuju hipertrofiju (povećanje stanica) koja vodi do akantozе (engl. *acanthosis*) ili zadebljanja epitela. Takve lezije imaju deblje kornificirane slojeve (hiperkeratoza) i sadržavaju citoplazmatske granulaste inkluzije karakterističnog izgleda u trnastom i granularnom sloju koji se uglavnom sastoji od

viralnog E4 proteina. Virioni koji su otpušteni na površinu mogu se prenijeti indirektno (npr. preko predmeta) ili s osobe na osobu (Doorbar 2005, Chow i sur. 2010). Pacijenti koji imaju EV razvijaju kutanozne bradavice po cijelom tijelu i one imaju tendenciju prolaska kroz maligne promjene, posebno na područjima tijela izloženim suncu. Tako se *Beta-PV* može pronaći u svakoj tumorskoj stanici planocelularnog karcinoma kože (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC) pacijenata s EV. Pretpostavlja se da je razlog pojave *Beta-PV* infekcije kod EV pacijenata imunološki defekt, a ta hipoteza je potvrđena pojavom SCC kod imunooslabljenih pacijenata koji su prošli transplantaciju organa (McLaughlin-Drubin 2014). Zna se da postoji još vrsta *Beta-PV*-a koji nisu otkriveni te je razumno zaključiti da bi svi mogli biti zaraženi nekim njihovim oblikom. Ako uzmemo u obzir i njegovu sposobnost opstanka, bitno je da otkrijemo i koliki se i koji dio keratinocita zarazi *Beta-PV*. Neka istraživanja pokazuju da se *Beta-PV* može pronaći po cijelom tijelu, u uzorcima iščupanih dlaka i briseva kože kod imunokompetentnih ljudi. Također, neka istraživanja su otkrila da im je veća pojavnost na područjima koja su više izložena suncu (Feltkamp 2008, Chow i sur. 2010, Quint i sur. 2014).

Većina HPV infekcija nestaje spontano unutar jedne godine od infekcije. U liječenju prekancerogenih promjena anogenitalnog područja najčešće se upotrebljavaju ekscizijske metode (npr. ekscizija zone transformacije s električnom petljom-LLETZ) ili destruktivne metode (npr. lasersko spaljivanje). Za liječenje benignih novotvorbi, npr. anogenitalnih bradavica, mogu se koristiti imunomodulatori staničnog imuniteta (npr. imikvimod), antimitotici (npr. podofilotoksin) ili antimetaboliti (npr. 5-fluorouracil). Liječenje papiloma grla najčešće se izvodi kirurški, endoskopskim-mikrolaringoskopskim laserskim uklanjanjem. Ponavljanje infekcije pripisuje se reaktivaciji prikrivenih virusa u blizini uklonjenih papiloma. Kao i kod većine spolno prenosivih infekcija, prevencija HPV infekcija roda *Alpha*- temelji se na ABC načelima: suzdržavanje od seksualnog odnosa ili apstinencija (engl. *abstinence*, A), vjernost jednom partneru (engl. *befithful*, B), i pravilna i dosljedna uporaba kondoma (engl. *correct and consistent condom use*, C) (Chow i sur. 2010, Kocjan i Poljak 2011).

Nastanak cjepiva dizajniranih za sprječavanje bolesti povezanih sa zarazom HPV-om omogućilo je saznanje da se L1 veliki kapsidni protein HPV-a može složiti u česticu nalik virusu i da bi se na taj način moglo potaknuti izlučivanje neutralizirajućih antitijela (Zhou i sur. 1991, Frazer 2009). Virusu nalik čestice ne sadrže virusnu DNA te ne mogu zaraziti ljudske stanice, niti se množiti i uzrokovati bolest. Na ovaj se način promovira formiranje

neutralizirajućih antitijela IgG klase koje karakterizira HPV genotip koji se nalazi u cjepivu (Frazer 2009, Chow i sur. 2010, Kocjan i Poljak 2011, CDC 2014). Zbog unosa cjepiva na neprirodan način (intramuskularno) nakon cijepjenja se stvara velika količina neutralizirajućih protutijela u stotinu puta većoj koncentraciji u usporedbi s prirodnom infekcijom. Trenutno na europskom tržištu postoje tri profilaktička cjepiva: deveterovalentno, četverovalentno i dvovalentno. Deveterovalentno cjepivo štiti od genotipa 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 te 6 i 11 te je odobreno 2014. godine, četverovalentno sadrži virusne čestice HPV genotipa 6, 11, 16 i 18 te je u EU u uporabi od rujna 2006., a dvovalentno cjepivo sadrži čestice HPV genotipa 16 i 18 i koristi se od rujna 2007. godine. Uporabom cjepiva smanjila se pojava raka vrata maternice, prekancerogenih promjena cerviksa, prekancerogenih promjena ženskih vanjskih spolnih organa (vulve), prekancerogenih promjena vagine i anogenitalnih bradavica. Preporučeni je uzrast za cijepjenje dječaka i djevojčica 11 – 12 godina, a ako nisu prethodno cijepjene, mlađe odrasle osobe mogu se cijepiti do 26 godine. Do 15 godine cjepivo se daje u dvije doze, nakon 15 u tri doze (Chow i sur. 2010, Kocjan i Poljak 2011, CDC 2014, Veković i sur. 2018, web1).

HPV cjepiva nemaju mjerljiv terapijski učinak i stoga nisu indicirana za liječenje raka maternice ili prekancerogenih promjena u materničnom vratu, vulvi i vaginalnim lezijama. Razvoj profilaktičkih cjepiva nove generacije temelji se na integraciji većeg seta HPV genotipova, snižavanju cijene, povećanju temperaturne stabilnosti cjepiva i jednostavnijoj aplikaciji (transdermalno, inhalacija/udisanje) (Kocjan i Poljak 2011).

### **1.6. Molekularne metode za identifikaciju novih PV-a**

Poboljšanja u molekularnim tehnikama koje se koriste za identificiranje novih PV-a dovela su do značajnog porasta broja novootkrivenih PV genotipa u posljednjih nekoliko godina (Kocjan i Poljak 2011, Kocjan i sur. 2015).

Prve nukleotidne sekvence čitavih PV genoma, uglavnom HPV-a, dobivene su izravno iz različitih promjena epitela (anogenitalne bradavice, papilomi grla, karcinomi vrata maternice i neoplastične promjene kod EV bolesnika), korištenjem izravnog molekularnog kloniranja izoliranih virusnih nukleinskih kiselina u plazmidne vektore, transformacije plazmida u kompetentne bakterijske stanice i određivanje nukleotidne sekvence. Unatoč relativno jednostavnoj primjeni tehnika izravnog kloniranja izoliranih nukleinskih kiselina

ima mnogo nedostataka: nakon rezanja kružnih virusnih genoma na kraće sekcije s restriktivnim endonukleazama mogu se formirati kratki fragmenti koje je na agaroznom gelu vrlo teško otkriti što može dovesti do neispravnog kloniranja čitavog virusnog genoma, metoda je posebno pogodna za identificiranje genotipa PV-a prisutnih u velikom broju virusnih kopija u kliničkim uzorcima, pokazalo se da su određene sekvence PV genoma toksične za razne vektorske sustave. Brojni nedostaci doveli su do razvoja i korištenja novijih i osjetljivijih metoda molekularnog kloniranja s prethodnim umnožavanjem virusnog genoma (de Villiers i sur. 2004, Kocjan i sur. 2015).

U zadnja se dva desetljeća za identificiranje novih genotipova PV koriste moderne molekularne metode koje uključuju polimeraznu lančanu reakciju, PCR (engl. *polymerase chain reaction*), umnožavanje cijelog virusnog genoma po principu *rolling circle amplification*, RCA, i sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *deep sequencing* ili *next-generation sequencing*, NGS) (Kocjan i sur. 2015).

Molekularne metode koje se upotrebljavaju za rutinsko dokazivanje HPV dijelimo na hibridizacijske metode, gdje ga dokazujemo s RNA ili DNA-markerima usmjerenim na karakteristične dijelove različitih HPV genotipovima, i metodama koje se koriste za množenje karakteristične sekvence virusnog genoma, npr. PCR. Dobivene PCR produkte naknadno obrađujemo različitim tehnikama, kao što su gel elektroforeza, enzimska razgradnja PCR produkta, enzimski oligonukleotidni test, metoda reverznog line-blota ili utvrđivanjem nukleotidnog slijeda. Tijekom posljednjih nekoliko godina sve se više koristi real-time PCR (RT-PCR, PCR u realnom vremenu) kao metoda za otkrivanje HPV-a (Chow i sur. 2010, Kocjan i Poljak 2011).

#### 1.6.1. Polimerazna lančana reakcija

PCR je *in vitro* metoda sinteze DNA pomoću termostabilne DNA polimeraze kojom u kratkom vremenskom roku (1 – 3 sata) možemo umnožiti određeni dio matične DNA u veliki broj kopija. Za uspješnu izvedbu potrebno je poznavati ciljni nukleotidni slijed DNA jer se reakcija temelji na korištenju dvije (ili više) početnica koje se prihvaćaju za ciljni nukleotidni slijed i usmjerene su tako da sinteza nove DNA teče u prostoru između njih. Osim matične DNA, para početnica i DNA polimeraze potrebni su nam i deoksinukleotidi (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), PCR pufer koji sadrži optimalne koncentracije Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> i KCl koji omogućuju tok enzimske reakcije, i sterilna deionizirana voda. Da bi se početnica vezala za ciljni dio DNA, one se prvo mora razdvojiti na dvije jednolančane

molekule DNA. To se događa u prvom koraku PCR-a koji se naziva denaturacija dvolančane DNA (engl. *denaturation*), a izvodi se kratkim zagrijavanjem reakcijske smjese na 95°C. Nakon toga slijedi prihvaćanje početnice na ciljni dio DNA (engl. *primer annealing*) pri čemu je temperatura inkubacije reakcijske smjese ovisna o temperaturi taljenja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ) korištenih početnica. U završnoj fazi dolazi do produžavanja početnica, tj. sinteze nove komplementarne molekule DNA s DNA polimerazom u smjeru 5' prema 3'. U ovom koraku vrijeme inkubacije reakcijske smjese ovisi o duljini ciljanog nukleotidnog slijeda i temperaturi inkubacije djelovanja DNA polimeraze. U slučaju Taq DNA polimeraze ta temperatura iznosi 72°C. Svaki sljedeći temperaturni ciklus udvostručuje broj kopija ciljnog dijela DNA. U posljednjem temperaturnom ciklusu cijela enzimska reakcija se zaustavlja hlađenjem reakcijske smjese na 4°C (Poljak i sur. 1994, Nicholl 2008).

Najčešći pristup za definiranje novih PV genotipova temelji se na primjeni PCR-a s različitim primjenama početnica širokog spektra (engl. *broad-range primers*) formiranih na temelju višestrukog ponavljanja nukleotidnih nizova više različitih, unaprijed definiranih PV-a. Uporaba početnica širokog spektra omogućuje otkrivanje najpoznatijih i službeno priznatih PV genotipova, ali također može otkriti neke potencijalno nove PV genotipove koji su povezani s ranije identificiranim genotipovima PV-a ili imaju visok stupanj sličnosti u sekvenci sa njima. Većina dostupnih početnica širokog spektra (PGMY09/11, GP5+/6+, SPF10, FAP59/FAP64, FAP6085/FAP6319, CUT, CODEHOP, CPI/CPIIg,  $M_a/H_a$ ) obuhvaća najočuvanije genomske regije PV-a (L1 ili E1) koje su u kružnom virusnom genomu smještene jedna nasuprot druge (Staheli i sur. 2009, Kocjan i sur. 2015). Uporabom početnica širokog spektra obično umnožavamo kraće dijelove ciljnih nukleotidnih slijedova (120 – 700 bp). Ako se pokaže da je jedan od slijedova potencijalno novi PV, koristimo ga kao referentni nukleotidni niz u dizajnu novih početnica specifičnih za genotip koji omogućuje umnožavanje čitavog virusnog genoma reverznim PCR (engl. *inverted long-range PCR*) ili metodom preklapanja PCR produkata (engl. *overlapping long-range PCR*). Vrsno specifične početnice nastaju tako da na dvolančani DNA predložak naliježu jedan nasuprot drugome, *back to back*, te se tako cjelokupni kružni virusni genom umnoži. U PCR metodi preklapanja PCR produkata cijeli se PV genom množi u dva ili više segmenata sa preklapajućim krajevima. S obzirom na to da je genom dug oko 8000 bp umnožavanje glavnih dijelova virusnog genoma provodi se uporabom DNA polimeraze dugog raspona (engl. *long range*) koja je temperaturno stabilna, precizna,

osjetljiva i sposobna ojačati nukleotidne sekvence dužine od 15 kb ili više. Povećanje osjetljivosti PCR može se postići klasičnim ugniježđenim PCR-om (engl. *nested PCR*). Dobivene PCR produkte kvalitativno odredimo gel elektroforezom. Čitava nukleotidna sekvenca virusnog genoma obično se određuje metodom pomicanja početnica (engl. *primer walking*) temeljeno na metodi sekvenciranja po Sangeru (Kocjan i sur. 2015)

#### 1.6.2. Umnožavanje virusnog genoma po principu RCA

Za otkrivanje novih PV upotrebljava se posebna metoda umnožavanja cjelokupnog genoma (engl. *whole genome amplification*, WGA) te se naziva amplifikacija po principu kruga (RCA) te se temelji na umnožavanju svih kružnih DNA molekula (jedno- ili dvolančane) korištenjem bakteriofagne  $\Phi 29$  DNA polimeraze s kontrolom čitanja i slučajnim heksamernim početnicama koje se pričvršćuju na više mjesta kružne matične DNA. Prednost RCA metode jest visoka preciznost i prinos produkta, a RCA s nasumičnim heksamernim početnicama omogućuje otkrivanje kružnih virusnih genoma bez prethodne informacije o njihovoj nukleotidnoj sekvenci. Rezultat toga je mogućnost identificiranja novih PV-a koji se razlikuju od već identificiranih PV genotipova. Specifičnost umnožavanja genoma PV-a metodom RCA možemo postići uporabom vrsno specifično karakterističnih početnica. Nedostatak RCA metode jest taj što, osim kružnih molekula DNA, ona u manjoj mjeri pojačava i linearni oblik DNA, kao što je genom domaćina, što može utjecati na umnožavanje virusnog genoma ako je prisutan u kliničkim uzorcima u vrlo malim količinama. Produkti RCA jesu linearne, dvolančane, konkaterne kopije cjelokupnog genoma PV-a u količinama koje omogućuju izravno određivanje nukleotidne sekvence sekvenciranjem po Sangeru ili primjenom NGS, restriksijsku analizu restriksijskim endonukleazama, molekularno kloniranje RCA kultura ili njihovo daljnje umnožavanje PCR reakcijom. Široka uporaba RCA omogućila je identifikaciju velikog broja novih HPV genotipova, posebno onih iz *Beta* i *Gamma* roda, kao i brojnih animalnih PV (Rector i sur. 2004, de Villiers 2013, Rector i Ranst 2013, Kocjan i sur. 2015, Rockett i sur. 2015).

#### 1.6.3. Sekvenciranje sljedeće generacije

Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) označava skupinu modernih metoda visokopropusnog sekvenciranja (engl. *high-throughput sequencing*) koji omogućava višestruko, paralelno i automatizirano određivanje nukleotidnog slijeda velikog broja različitih molekula DNA u kratkom vremenu. NGS platformne poput Illumina (sekvenciranje pomoću reverzibilne terminacije), Roche 454

(pirosekvenciranje), i SOLiD (sekvenciranje s ligacijom), razlikuju se po kemijskom sastavu i tehnologiji sekvenciranja, načinu pripreme uzoraka, troškovima i dubini sekvenciranja (engl. *sequencing depth*), tj. količini dobivenih očitavanja te njihovoj duljini i točnosti (Chiu i Miller 2011, Kocjan i sur. 2015).

Metode NGS se na području PV-a najviše upotrebljavaju pri identificiranju cijelih virusnih genoma nakon umnožavanja cjelokupne DNA s metodom RCA. NGS metode se koriste u analizi produkata PCR-a širokog spektra te je nekoliko istraživanja pokazalo da izvedba PCR-a prije NGS-a omogućava osjetljivije otkrivanje ciljnih molekula u usporedbi s korištenjem NGS bez prethodnog umnažanja nukleinskih kiselina (tj. PCR-a). S obzirom na to da se u provedbi NGS-a ne zahtijeva prethodno poznavanje nukleotidne sekvence, osjetljivost NGS metode veća je od one PCR. Posljednjih godina dobiveni su djelomični ili ukupni nukleotidni sljedovi velikog broja potencijalno novih genotipova HPV-a i nekih životinjskih PV-a uz pomoć NGS-a u različitim ekološkim nišama PV-a poput kože domaćina, različitih mjesta sluznice glave i vrata te analnog kanala. To nam je omogućilo nov pogled na razumijevanje raznolikosti PV-a (Bzhalava i sur. 2014, Kocjan i sur. 2015).

### **1.7. Cilj istraživanja**

Cilj je ovog rada:

- Napraviti kompletnu molekularnu analizu viralnog genoma novog genotipa HPV159
- Filogenetski smjestiti HPV159 unutar porodice PV-a
- Odrediti tkivni tropizam HPV159 u kolekciji uzoraka korištenoj u izradi ovog diplomskog rada
- Odrediti viralne varijante i kliničku važnost HPV159 u kolekciji uzoraka korištenoj u izradi ovog diplomskog rada.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Materijali

#### 2.1.1. Referentni uzorak HPV159

Početna sekvenca L1 proteina od 371 bp dobivena je iz DNA uzorka izoliranog iz stidne dlake zdravog 38-godišnjeg muškarca 2003. godine sekvenciranjem širokog spektra *Beta*-PV PCR produkta. Ona je dostupna u GenBank bazi podataka pod pristupnim brojem AJ646892. Zbog slabe kvalitete originalnog izolata novi je izolat HPV159 uzorkovan i izoliran od imunokompetentnog 36-godišnjeg muškarca koji je sudjelovao u istraživanju o rasprostranjenju genotipova HPV u analnom kanalu Slovenaca koji imaju spolne odnose s muškarcima. Umnožavanje kompletnog genoma obavljeno je prije *long-range* PCR korištenjem phi29 DNA polimeraze: dva preklapajuća fragmenta (7348-bp i 761-bp) koji pokrivaju cijeli genom dobivena su korištenjem početnica u Tablici 2., zatim klonirana u plazmidne vektore i sekvencirana korištenjem *primer walking* strategije. Kompletne sekvence genoma HPV159 dostupne su na EMBL, GenBank i DDBJ bazi podataka pod pristupnim kodom HE963025 (Kocjan 2013).

Tablica 2. Sekvence početnica dizajniranih za umnožavanje kompletnog genoma HPV159; preuzeto iz Kocjan 2013

Početnica	Sekvenca (5'-3')	Pozicija nukleotida <sup>a</sup>	Dužina produkta <sup>c</sup>
SIBX8F-LR(62)	ACCTGCATTCATAGCATTAAATCTGTG	6729-6704	7348 bp
SIBX8R-LR(59)	AGATGCTGTGGAGCCTACAGAA	6825-6846	
CP62 <sup>b</sup>	GTWAATGAAAYTTGYAAATATCC	6181-6203	761 bp
CP70a <sup>b</sup>	AAYTTTCKACCYARAGRATAYTGATC	9941-6916	

<sup>a</sup>U odnosu na kompletnu sekvencu genoma HPV159 u GenBank bazi podataka pod pristupnim brojem [HE963025](#).; <sup>b</sup> Prethodno objavljeno u *Boxman i sur. 1997* °7348-bp dugačak PCR fragment dobiven korištenjem Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity kit (Invitrogen), dok je 761-bp PCR fragment dobiven korištenjem HotStarTaq Plus DNA Polymerase kit (Qiagen).

#### 2.1.2. Kolekcija uzoraka

Istraživanje ovog diplomskog rada uključivalo je DNA izolate reprezentativne kolekcije uzoraka koja se sastojala od 1499 kliničkih uzoraka koji su prethodno dobiveni od istog broja pojedinaca. Uzorci su bili s područja usne šupljine (bris, FFPE tkivo, engl. *formalin-fixed, paraffin embedded*) (n= 401), usne šupljine i usnog dijela ždrijela (FFPE tkivo) (n= 135), nosnog dijela ždrijela (bris) (n= 60), verukozni SCC grkljana (FFPE tkivo) (n= 10), cerviksa (SMILE) (n= 37), penisa (bradavice, svježe tkivo) (n= 51), analnog kanala i

analog ruba (n= 121), bradavica perianalne kože i anusa (svježe tkivo) (n= 60) te običnih bradavica (FFPE tkivo) (n= 86), SCC tkiva (FFPE tkivo) (n= 50) i tkiva bazocelularnog karcinoma (FFPE tkivo) (BCC, engl. *basal cell carcinoma*) (n= 51) kože. Također, histološki uzorci zdravog mukozalnog tkiva kao što je grkljan (FFPE tkivo) (n= 10), cerviks (bris) (n= 60) i kože tj. dlačnih folikula obrva (n= 367) bili su uključeni u analize.

## 2.2. Metode

Laboratorijski rad odrađen je uz strogo poštivanje aseptičnih uvjeta rada u laboratoriju na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani (slo. *Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani*).

### 2.2.1. Molekularna definicija genoma HPV159

Za *in silico* analizu značajnih područja virusnog genoma HPV159 i identifikaciju gena koji nose zapis za virusne proteine u referentnom uzorku HPV159 upotrijebili smo dostupnu mrežnu aplikaciju ORF finder (NCBI, 2017), koja nam omogućuje identifikaciju virusnih ORF s algoritmom Protein BLAST (NCBI) u bazi podataka UniProtKB/Swiss-Prot (UniProt Consortium). Prema HPV sporazumu početak ORF E6 uzeli smo kao položaj prvog nukleotida u kružnom genomu virusa. Pojedinačne regulatorne sekvence i najočuvanije funkcionalne domene unutar virusnih proteina utvrđene su kroz nekoliko dostupnih mrežnih aplikacija. Za određivanje TATA-sekvence virusnog promotora uporabili smo mrežnu aplikaciju GPMiner (GPMiner 2017). Za analizu navodnih veznih mjesta za regulatorne faktore prepisivanja, kao što su AP-1, NF-1, TBP, TMF (engl. *TATA element modulatory factor*), TRF (engl. *TBP-related factor*) i C/EBP beta smo koristili program SIGSCAN software v4.05 (Prestridge 1991) i mrežnu aplikaciju WWW Signal SCAN (WWW Signal Scan, 2017) i program Patch 1.0 na mrežnoj stranici Gene Regulation (GeneXplain, 2016). Navodna poliadenilacijska mjesta za rane i kasne virusne mRNA odredili smo s mrežnom aplikacijom Poly (A) Signal Miner (Liu i sur. 2006). Prisutnost motiva leucinskih zatvarača u DNA-vezujućoj domeni proteina E2 provjerili smo uporabom internet aplikacije 2ZIP-Server (Bornberg-Bauer i sur. 1998, 2ZIP-Server 2017). Pri određivanju ostalih značajnih funkcionalnih domena ili motiva unutar virusnih proteina koristili smo se postojećom literaturom i uporabom računalnih programa Vector NTI Advance v11.5.4 (Invitrogen) te BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.6.1 (Ibis

Therapeutics, Carlsbad, CA, ZDA) s kojima smo usporedili sekvence AK pojedinačnih proteina HPV159 s proteinima srodnih PV genotipova.

### 2.2.2. Filogenetsko određivanje genoma HPV159

Evolucijsku povezanost genoma dobivenog iz referentnog uzorka HPV159 s definiranim PV genotipovima odredili smo usporedbom cjelokupnog nukleotidnog slijeda gena L1 referentnog uzorka HPV159 s nukleotidnim sekvencama već definiranih, klasificiranih i službeno priznatih HPV genotipova iz virusnih rodova *Alpha*-PV (64), *Beta*-PV (47), *Gamma*-PV (78), *Mu*-PV (3) i *Nu*-PV (1). Nukleotidne sekvence L1 gena spomenutih PV genotipova dobili smo iz besplatno dostupne podatkovne baze referentnih PV genotipova Papillomavirus Episteme (PaVE), kojemu je izvor podataka nukleotidna podatkovna baza GenBank (NCBI).

Sve dobivene nukleotidne sekvence L1 gena smo poravnali uporabom algoritma MUSCLE koji je dio MEGA 7 paketa. Filogenetsko stablo smo napravili u računalnom programu MEGA 7.0.26 koristeći Maximum likelihood algoritam (Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, ZDA), a prikazali smo ga korištenjem FigTree programa 1.3.

Da bismo dodatno usporedili genotip referentnog uzorka HPV159 s filogenetski najbližim genotipom HPV9 izračunali smo sličnost između pojedinačnih genoma virusnih proteina, kao i proteinskih sekvenci. Usporedba nukleotidnih sljedova pojedinih gena i sljedova AK pojedinih proteina provedena je korištenjem besplatne mrežne aplikacije EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignment tool ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)).

### 2.2.3. Kvantitativni RT-PCR za umnožavanje dijela gena za humani beta-globin

S ciljem utvrđivanja virusnog opterećenja pojedinačne stanice domaćina sa HPV159 u kolekciji uzoraka korištenoj u ovom diplomskom radu razvili smo i uveli vrsno specifičan kvantitativni PCR u realnom vremenu (metoda opisana u 2.2.6.), koji smo koristili u kombinaciji s qPCR-om s kojim možemo umnožiti 150 bp dug dio gena za humani beta-globin. Pomoću njega možemo utvrditi etiološku ulogu virusa u pojavi promjena i nastanku novotvorbi (van Duin i sur. 2002). Za beta-globin RT-PCR upotrijebili smo kemikalije komercijalno dostupnog kompleta QuantiTect SYBR Green PCR + UNG Kit (Qiagen). Reakcijske smjese pripremili smo u staklenim kapilarama LightCycler Capillaries (Roche), koje su bile smještene u ohlađenim adapterima (stalcima). Početnice

su prethodno određene (van Duin i sur. 2002) i prikazane u Tablici 3. Konačni volumen reakcijske smjese je 25  $\mu$ l, a sastoji se od:

- 12,5  $\mu$ l 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) s fluorescentnom bojom SYBR Green I za detekciju PCR produkata
- 0,25  $\mu$ l forward početnice beta-403f (50  $\mu$ M)
- 0,25  $\mu$ l reverse početnice beta-555r (50  $\mu$ M)
- 5  $\mu$ l izolirane DNA iz HPV159 ishodišnih uzoraka (optimalna koncentracija dodane DNA= 80-100 ng, najveća= 1000 ng)
- 7  $\mu$ l sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen).

Tablica 3. Oligonukleotidne početnice za umnožavanje dijela gena za humani beta-globin veličine 150 bp (van Duin i sur. 2002)

Ime početnice	Vrsta početnice	Nukleotidna sekvenca početnice (5'-3')
Beta-403f	<i>forward</i>	TGGGTTTCTGATAGGCACTGACT
Beta-532r	<i>reverse</i>	AACAGCATCAGGAGTGGACAGAT

Kapilare s reakcijskim mješavinama prenijeli smo na stalak, zatvorili poklopcem i centrifugirali 30 sekundi pri 3000 rpm u centrifugi LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche). Potom smo stalak s kapilarama prenijeli u LightCycler 2.0 Instrument (Roche) s računalnim sustavom koji umnožava DNA po protokolu u Tablici 4.

Tablica 4. Protokol umnožavanja dijela genoma HPV159 s vrsno specifičnim kvantitativnim PCR u realnom vremenu za humani beta-globin veličine 150 bp

	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
Aktivacija/denaturacija	1 ciklus	95 °C (20 °C/s)	15 min
Umnožavanje	45 ciklusa	94 °C (20 °C/s)	15 s
		60 °C (20 °C/s)	20 s
		72 °C * (2 °C/s)	20 s
Analiza krivulje taljenja 530 (melting curve analysis)	1 ciklus	95 °C (20 °C/s)	0 s
		50 °C (20 °C/s)	30 s
		95 °C ** (0,1 °C/s)	0 s
Hlađenje	1 ciklus	40 °C (20 °C/s)	30 s

\*→data gain: single (530); \*\*→data gain: continuous

Na kraju svakog ciklusa umnožavanja ciljnih molekula prikupljen je podatak od mjerenja fluorescencije pri 530 nm te smo na završetku umnožavanja na istoj valnoj dužini proveli analize krivulje taljenja, kojom smo analizirali specifičnost PCR produkata. Također, pozitivne uzorke beta-globina odredili smo pomoću temperature taljenja produkata PCR-a (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ) od 80,5 – 81,5 °C.

#### 2.2.4. Izolacija plazmidne DNA

Na kraju inkubacije izolirali smo bakterijske kolonije koje su rasle na tvrdoj LB (Luria-Bertani) hranjivoj podlozi (engl. *lysogeny broth agar*) s pomoću komercijalno dostupnog kompleta kemikalija QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) u skladu s uputama proizvođača.

U 2 ml standardnu epicu za mikrocentrifugiranje odpipetirali smo 250 µl ohlađenog pufera P1 s dodanom ribonukleazom (RNaza) A i potom u tome resuspendirali bakterijsku kulturu s hranjive podloge. Suspenziji smo dodali 250 µl lizirajućeg pufera P2 i temeljito promiješali kratkim okretanjem (rotacijama) epice (šest puta). Da bismo zaustavili lizu u manje od 5 minuta, dodajemo 350 µl neutralizacijskog pufera N3 i temeljito promiješamo sadržaj šest puta s laganim okretanjem epice. Zatim sve centrifugiramo 10 minuta pri 13000 rpm u centrifugi Centrifuge 5424 R (Eppendorf). Supernatant prenesemo u QIAprep 2.0 kolonu koju smo stavili u mikroepicu za prikupljanje od 2 ml i ponovno centrifugirali 1 minutu na 13000 rpm te zamijenili mikroepiruvete za prikupljenje (engl. *collection tubes*). Nakon toga smo za uspješnije povezivanje plazmidne DNA na silikatnu kolonu dodali 500 µl pufera PB i centrifugirali (1 minuta, 13000 rpm) te ponovno zamijenili mikroepiruvete za prikupljanje. Slijedi ispiranje membrane dodatkom 750 µl za ispiranje PE i ponovno centrifugiranje (1 minuta, 13000 rpm). Za potpuno odstranjivanje pufera PE kolonu smo još jednom centrifugirali (1 minuta, 13000 rpm) i prebacili ju u čistu 1,5 ml mikroepiruvetu za centrifugiranje. Plazmidnu DNA eluirali smo tako da smo dodali 50 µl elucijskog pufera EB, kolonu smo inkubirali 1 minutu na sobnoj temperaturi (22 °C) i nakon toga centrifugirali 1 minutu na 13000 rpm.

Čistoću i koncentraciju izolirane plazmidne DNA odredili smo pomoću NanoDrop ND-2000c spektrofotometra (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija) koji na temelju spektrofotometrijskih mjerenja omogućuje kvantifikaciju nukleinskih kiselina i proteina u uzorku (prikazano u ng/µl). Za daljnju analizu sve uzorke smo definirali omjerom apsorbance A260/A280 između 1,8 i 2,1.

### 2.2.5. Pripremanje standarda

Kako bi se utvrdila osjetljivost, ograničenja otkrivanja i kvantifikacije i pripreme standardne (kalibracijske) krivulje za genotip HPV159, pripremili smo otopinu referentnih plazmida koja je obuhvaćala otopine od  $10^9$  do  $10^{-1}$  kopija plazmide DNA / $\mu$ l.

Prvo smo postavili stalak s 11 mikroepreveta za centrifugiranje DNA LoBind Tubes (Eppendorf) od 1,5 ml. Također smo pripremili vodenu otopinu s 1  $\mu$ g/ml nositelja RNA Carrier RNA (Qiagen) koju smo dobili tako da smo 0,4 ml nositelja RNA (10  $\mu$ g/ml) pomiješali s 3,6 sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen). Za pripremanje prve otopine smo prema izmjerenoj koncentraciji izolirane plazmidne DNA PV genotipa po formuli (1) izračunali broj kopija plazmidne DNA u 1 $\mu$ l našeg uzorka, a po formuli (2) potreban volumen našeg uzorka da bi u prvoj otopini dobili 200  $\mu$ l vodene otopine s  $10^9$  kopija plazmidne DNA/ $\mu$ l. Mikro epruvete za preostale otopine smo napunili s 180  $\mu$ l vodene otopine s RNA nositeljicom (engl. *carrier RNA*). Potom smo u svaku sljedeću mikroeprevetu dodali po 20  $\mu$ l prijašnje otopine. Nakon svakog dodavanja volumena iz prethodne otopine dobro smo promiješali mikroeprevete na vorteksu.

$$\text{brojkopijeDNA//}\mu\text{l} = \frac{N_A \times \gamma_{DNA}}{l_{DNA} \times M_{DNA} \times 10^9}$$

Napomena:

$N_A$  – Avogadrova konstanta ( $6,02 \times 10^{23}$  kopija DNA/mol)

$\gamma_{DNA}$  – izmjerena masena koncentracija plazmidne DNA (ng/ $\mu$ l)

$l_{DNA}$  – dužina plazmidne DNA (broj baznih parova)

$M_{DNA}$  - molarna masa 1 baznog para DNA (660 g/(mol x bp))

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

Napomena:

$C_1$  – početna koncentracija

$V_1$  – početni volumen

$C_2$  – konačna koncentracija

$V_2$  – konačni volumen

## 2.2.6. Umnožavanje dijela genoma HPV159 RT-PCR-om

Za umnožavanje dijela virusnog genoma HPV159 smo na temelju cjelokupnog slijeda nukleotidnog gena L1 razvili početnice (HPV159-RT-FW-New, HPV159-RT-RW-New) i probu (sondu) (HPV159-RT-P-New) za *real-time* PCR (RT-PCR) (Tablica 5). Predviđena dužina dobivenog PCR produkta je 112 bp.

Tablica 5. Oligonukleotidne početnice za umnožavanje cjelokupnog virusnog genoma HPV159 s *real-time* PCR-om

Ime početnice	Vrsta početnice	Nukleotidna sekvenca početnice (5'-3')	Područje vezanja na genom
HPV159-RT-FW-New	<i>forward</i>	CGAGTTCAAAGCACGGATG	L1
HPV159-RT-P-New	<i>forward</i>	GTGATCGTTTGCTGACAGTAGGAC	L1
HPV159-RT-RW-New	<i>reverse</i>	CATCCTGAGAGCGAACATCA	L1

Početnice i probu (sondu) razvili smo pomoću besplatno dostupne mrežne aplikacije Primer3 v0.4.0 (WIBR, 2012). Njihova kemijska i termodinamička svojstva (za početnice:  $T_m = 50-55$  °C, omjer baznih parova gvanin-citozin = 40-60 %; za probu (sondu):  $T_m = 60$ °C) smo provjerili na besplatno dostupnoj mrežnoj aplikaciji Net Primer (PREMIER Biosoft, 2017). Nukleotidne sekvence L1 gena smo dobili iz besplatno dostupne podatkovne baze referentnih PV genotipova *Papillomavirus Episteme* (PaVE, [https://pave.niaid.nih.gov/#search/search\\_database](https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database)), kojemu je izvor podataka nukleotidna podatkovna baza GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Specifičnost razvijenih početnica i probe provjerena je korištenjem Vector NTI Advance v11.5.4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA), i besplatnom mrežnom aplikacijom BLAST (NCBI, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, ZDA). Pri izvedbi smo koristili kemikalije iz komercijalnog kita LightCycler480 Probes Master (Roche).

U svaku 0,2 ml PCR mikroeprevetu dodan je volumen mješavine od 25  $\mu$ l, a smjesa je sadržavala:

- 10  $\mu$ l LC480 Probes Master (2x) (Roche)
- 0,2  $\mu$ l početnice HPV159-RT-FW-New (50  $\mu$ M)
- 0,2  $\mu$ l početnice HPV159-RT-RW-New (50  $\mu$ M)
- 0,2  $\mu$ l probe (sonde) HPV159-RT-P-New (20  $\mu$ M) (\*FAM)
- 4,4  $\mu$ l sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen)

- 5 µl DNA uzorka (optimalna koncentracija dodane DNA= 100 ng).

Svi PCR protokoli odrađeni su na instrumentu LightCycler 480 Instrument II (Roche) po protokolu u Tablici 6.

Tablica 6. Protokol umnožavanja cjelokupnog virusnog genoma HPV159 na temelju cjelokupnog slijeda nukleotidnog gena L1

	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
Preinkubacija	1 ciklus	95 °C (4.4)	10 min
Umnožavanje	40 ciklusa	95 °C (4.4)	10 s
		60 °C (2.2)	30 s
		72 °C * (4.4)	1 s
Hlađenje	1 ciklus	40 °C	30 s

\*data gain, kanal za prikaz (analizu) umnožavanja: FAM: 530

Analitička osjetljivost testa određena je uporabom plazmidnih razrjeđenja DNA koja su sadržavala genom HPV159 u koncentraciji od 1 do 10<sup>9</sup> virusnih DNA kopija po reakciji u prisutnosti 100 ng ljudske DNA, u tri ponavljanja (metoda opisana u 2.2.5.). Fluorescencija je mjerena na valnoj duljini od 530 nm na kraju svake elongacijske faze.

#### 2.2.7. Izračunavanje virusnog opterećenja u HPV159 pozitivnim uzorcima

Broj kopija virusnog genoma u svakom tkivnom uzorku dobili smo kvantitativnim tipsko-značajnim RT-PCR-om (metoda opisana u 2.2.6.). Broj ljudskih stanica u svakom HPV159 pozitivnom tkivnom uzorku izračunali smo s pomoću koncentracije beta-globina koju smo dobili kvantitativnim RT-PCR-om koji omogućava umnožavanje dijela gena velikog 150 bp za ljudski beta-globin (metoda opisana u 2.2.3.) U skladu s objavljenim radom Hazarda i suradnika (2006) pretpostavili smo da jedna ljudska stanica posjeduje 6,6 pg genomske DNA. Virusno opterećenje HPV159 izrazili smo kao omjer između brojeva kopija virusnog genoma i brojem ljudskih stanica.

#### 2.2.8. Umnožavanje LCR sekvence HPV159 za određivanje varijanti virusa

Za umnožavanje dijela virusnog genoma HPV159 u kolekciji uzoraka korištenoj u izradi ovog diplomskog rada razvili smo početnice za PCR na temelju cjelokupnog nukleotidnog slijeda LCR (HPV159-LCR-FW, HPV159-LCR-RV) (Tablica 7.). Predviđena dužina PCR produkta je 666 bp.



Tablica 7. Oligonukleotidne početnice za umnožavanje dijela virusnog genoma HPV159 na temelju nukleotidnog slijeda LCR s PCR-om

Ime početnice	Vrsta početnice	Nukleotidna sekvenca početnice (5'-3')	Područje vezanja na genom
HPV159-LCR-FW	<i>forward</i>	GAGCCTACAGAACGTGAAG	LCR
HPV159-LCR-RV	<i>reverse</i>	AGGAATAGTCAAGGTATCTGC	LCR

Početnice smo razvili s pomoću besplatno dostupne mrežne aplikacije Primer3 v0.4.0 (WIBR, 2012). Nukleotidne sekvence LCR smo dobili iz besplatno dostupne podatkovne baze referentnih PV genotipova *Papillomavirus Episteme* (PaVE), kojemu je izvor podataka nukleotidna podatkovna baza GenBank (NCBI). Njihova kemijska i termodinamička svojstva ( $T_m = 50-55$  °C, omjer baznih parova gvanin-citozin = 40-60 %) provjerili smo na besplatno dostupnoj mrežnoj aplikaciji Net Primer (PREMIER Biosoft, 2017). Specifičnost razvijenih početnica provjerena je korištenjem Vector NTI Advance v11.5.4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA), i besplatnom mrežnom aplikacijom BLAST (NCBI, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, ZDA).

Dio nukleotidne sekvence umnožili smo PCR-om na instrumentu Veriti (Applied Biosystems). Pri izvedbi smo koristili kemikalije iz komercijalnog kita FastStart High Fidelity PCR System (Roche). Protokol se nalazi u Tablici 8.

Tablica 8. Protokol za umnožavanje dijela virusnog genoma HPV159 na temelju cjelokupnog slijeda nukleotidnog LCR s PCR-om

	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
Aktivacija/denaturacija	1 ciklus	95 °C	2 min
Umnožavanje	35 ciklusa	95 °C	30 s
		50 °C	30 s
Hlađenje	1 ciklus	72 °C	1 min
		72 °C	7 min
		4 °C	∞

U svaku 0,2 ml PCR mikroepruvetu dodan je volumen mješavine od 25 µl, a smjesa je sadržavala:

- 0,5 µl dNTP mix (10 mM)<sup>b</sup> PCR Nucleotide Mix (Roche)

- 2,5 µl 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer (+1,8mM MgCl<sub>2</sub>) (Roche)
- 0,2 µl početnice HPV159-LCR-FW (50µM)
- 0,2 µl početnice HPV159LCR-RV (50 µM)
- 0,25 µl FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/µl) (Roche)
- 16,35 µl sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen)
- 5 µl DNA uzorka (optimalna koncentracija dodane DNA= 100 ng).

#### 2.2.9. Umnožavanje virusnog genoma po principu *rolling circle amplification* (RCA)

Zbog niske koncentracije virusne DNA dobivene u prethodnom koraku napravili smo umnožavanje virusnog genoma po principu RCA da bismo dobili veću koncentraciju virusnog genoma u uzorku.

U prvom koraku smo u 0,2 ml PCR mikroeprovete odpipetirali:

- 5 µl pufera Sample Buffer (GE Healthcare Life Sciences)
- 1 µl izolirane DNA iz kliničkog uzorka (ili destilirane deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen) za negativnu kontrolu).

Sadržaj mikroeprovete smo lagano promiješali i inkubirali 10 minuta pri 25 °C. Nakon toga, uslijedila je inkubacija od 3 minute na 95 °C u instrumentu Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), te smo uzorke potom stavili na led (4°C). Napravili smo *spin down* uzoraka da bi se spustile kapljice sa unutrašnjosti poklopca. Zatim smo mikroeprovete za centrifugiranje prebacili u hladni blok hlađen na -20 °C.

Zatim smo u 1,5 ml standardnu epicu na hladnom bloku za svaki uzorak dodali reakcijsku smjesu za RCA (5,7 µl) koja se sastojala od:

- 5 µl reakcijskog pufera TempliPhi Reaction Buffer (GE Healthcare Life Sciences),
- 0,5 µl mješavine nukleotida PCR Nucleotide Mix (10nM) (Roche, Mannheim, Njemačka),
- 0,2 µl mješavine TempliPhi Enzyme Mix (GE Healthcare Life Sciences) sa fi 29 DNA polimerazom.

U svaku mikroeprovetu s denaturiranom DNA dodali smo 5 µl pripremljene RCA reakcijske smjese, sadržaj lagano promiješali na vorteksu i inkubirali preko noći na 30 °C.

Sljedeći dan smo za inaktivaciju fi29 DNA polimeraze mikroeprovete inkubirali 10 minuta pri 65 °C u instrumentu Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Dobivene RCA produkte smo na kraju razrijedili sterilnom deioniziranom vodom Nuclease-Free Water (Qiagen, Hilden, Njemačka) u omjeru 1:100 (u 1 ml vode smo stavili 10 µl uzorka). Nakon toga uzorke smo čuvali na -20 °C.

#### 2.2.10. Ugniježđeni PCR

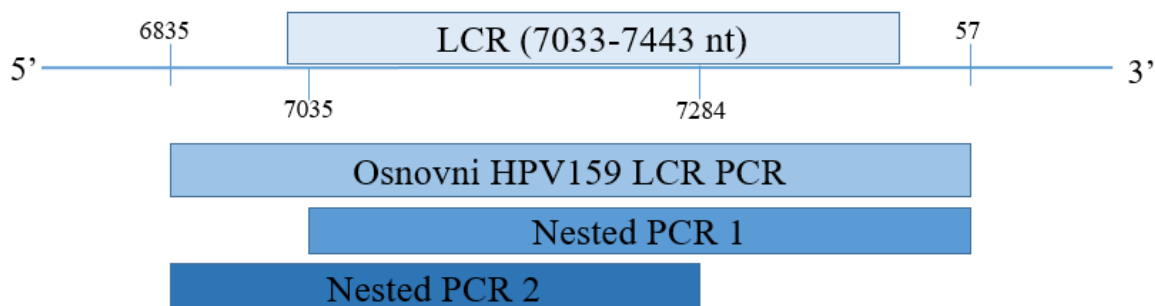
Virusne varijante HPV159 identificirane su određivanjem čitavog nukleotidnog slijeda nekodirajućeg LCR genoma. Za umnožavanje dijela virusnog genoma HPV159 referentnog uzorka smo na temelju cjelokupnog slijeda nukleotidnog LCR razvili početnice za PCR (HPV159-LCR-FW, HPV159-LCR-RV, HPV159-LCR-FW-N1, HPV159-LCR-RV-N1) (Tablica 9.).

Tablica 9. Oligonukleotidne početnice za umnožavanje virusnog genoma HPV159 sa ugniježđenim PCR-om

Ime početnice	Vrsta početnice	Nukleotidna sekvenca početnic (5'-3')	Dužina PCR produkta	PCR
HPV159-LCR-FW	<i>forward</i>	GAGCCTACAGAACGTGAAG	666 bp	Osnovni
HPV159-LCR-RV	<i>reverse</i>	AGGAATAGTCAAGGTATCTGC		
HPV159-LCR-FW-N1	<i>forward</i>	GATAGCGGTGCTCAATAAA	466 bp	Nested 1
HPV159-LCR-RV	<i>reverse</i>	AGGAATAGTCAAGGTATCTGC		
HPV159-LCR-FW	<i>forward</i>	GAGCCTACAGAACGTGAAG	449 bp	Nested 2
HPV159-LCR-RV-N1	<i>reverse</i>	TGTAGCCAAGTCGGTGTACT		

Početnice smo razvili pomoću besplatno dostupne mrežne aplikacije Primer3 v0.4.0 (WIBR, 2012). Nukleotidne sekvence LCR-a smo dobili iz besplatno dostupne podatkovne baze referentnih PV genotipova *Papillomavirus Episteme* (PaVE), kojemu je izvor podataka nukleotidna podatkovna baza GenBank (NCBI). Njihova kemijska i termodinamička svojstva ( $T_m = 50-55$  °C, omjer baznih parova gvanin-citozin= 40-60 %) provjerili smo na besplatno dostupnoj mrežnoj aplikaciji Net Primer (PREMIER Biosoft, 2017). Specifičnost razvijenih početnica provjerena je korištenjem Vector NTI Advance v11.5.4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA), i besplatnom mrežnoj aplikacijom BLAST (NCBI, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, ZDA).

S pomoću ugniježđenih PCR početnica (HPV159-LCR-FW-N1, HPV159-LCR-RV-N1) zasebno smo umnožili pojedini dio LCR sekvence da bismo povećali osjetljivost umnožavanja ciljanog niza (Slika 4.). Koristili smo ih u kombinaciji, HPV159-LCR-FW i HPV159-LCR-RV-N1, te HPV159-LCR-FW-N1 i HPV159-LCR-RV. Dužina osnovnog PCR produkta je 666 bp, a dužina ugniježđenog PCR produkata je 466 bp za Nested 1, te 449 bp za Nested 2.



Slika 4. Shematski prikaz umnožavanja LCR HPV159

Dio nukleotidne sekvence umnožili smo PCR-om na instrumentu Veriti (Applied Biosystems). Pri izvedbi smo koristili kemikalije iz komercijalnog kita FastStart High Fidelity PCR System (Roche) po protokolu u Tablici 10.

Tablica 10. Protokol za umnožavanje virusnog genoma HPV159 sa ugniježđenim PCR-om

	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
Aktivacija/denaturacija	1 ciklus	95 °C	2 min
Umnožavanje	35 ciklusa	95 °C	30 s
		72 °C	1 min
Hlađenje	1 ciklus	72 °C	7 min

U svaku 0,2 ml PCR mikroeprevetu dodan je volumen mješavine od 25 µl, a smjesa je sadržavala:

- 0,5 µl dNTP mix (10 mM)<sup>b</sup> PCR Nucleotide Mix (Roche)
- 2,5 µl 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer (+1,8 mM MgCl<sub>2</sub>) (Roche)
- 0,2 µl forward početnice (50 µM) \*

- 0,2 µl reverse početnice (50 µM)\*
- 0,25 µl FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/µl) (Roche)
- 16,35 µl sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen)
- 5 µl DNA-PCR produkt HPV159 LCR PCR MMX (optimalna koncentracija dodane DNA= 100 ng).

\*Napravljena su dva ugniježdjena PCR-a (Nested 1 i Nested 2) te su početnice dodane u kombinaciji HPV159-LCR-FW-N1 i HPV159-LCR-RV za Nested 1, te HPV159-LCR-FW i HPV159-LCR-RV-N1 za Nested 2

#### 2.2.11. Procjena PCR produkata

PCR produkte razdvojili smo po veličini uz pomoć agarozne gel elektroforeze. U tu svrhu smo pripremili 2 % agarozni gel tako što smo u čistu Erlenmeyer tikvicu dodali 1 g agaroze u prahu A9539 SIGMA Agarose (SigmaAldrich, St. Louis, MO, ZDA) i rastopili ga u 50 ml 1x TAE pufera (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat; pH = 8,3) i dodali 2 µl boje SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Smjesu smo zagrijavali 3 minute u mikrovalnoj pećnici te ga nakon toga izlili u nosač u koji smo stavili češljic za formiranje jažica i ostavili smo gel da se stisne.

Iz stisnutog gela uklonili smo češljic i položili ga u elektroforeznu kadu i prelili ga sa 1x puferom TAE ohlađenim na 4 °C. U jažice na gelu smo dodali 10 µl dobivenog PCR produkta i 2µl pufera 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA). Kao standard za određivanje dužine PCR produkta upotrijebili smo 6,4 µl molekularnog markera (High DNA Mass Ladder (Invitrogen)). Navedeni molekularni marker pokazuje skalu veličina pojedinačnih čestica koje putuju kroz gel te se može koristiti za dokazivanje 1000 – 10000 bp dugih PCR produkata jer sadrži DNA čestice u veličini od 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 i 10000 bp.

Elektroforeza je tekla kroz 20 – 22 minute na sobnoj temperaturi (22 °C) i pri konstantnom naponu od 120V. Nakon toga, gel smo pregledali pod UV svjetlom i fotografirali ga digitalnim detekcijskim sistemom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael).

#### 2.2.12. Pročišćavanje PCR produkta

PCR produkte očistili smo po protokolu čišćenja PCR produkata (FERMENTAS). U mikropruvete smo dodali 5 µl PCR produkta, 0,5 µl (20U) eksonukleaze I, 1 µl (1U)

»Shrimp« alkalne fosfataze. Nakon toga je napravljen *spin down* i produkti su stavljeni u sekvencijski PCR instrument. Protokol čišćenja je odrađen na instrumentu Veriti (Applied Biosystems) po protokolu u Tablici 11.

Tablica 11. Protokol pročišćavanja PCR produkata

Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
1 ciklus	37 °C	15 min
1 ciklus	85 °C	15 min
1 ciklus	4 °C	∞

Čišćenjem smo odstranili manje, nespecifične PCR produkte veličine do 100bp, početnice, soli, DNA polimeraze, neugrađene nukleotide i ostale nečistoće.

#### 2.2.13. Sekvenciranje PCR produkta

Reakcijsku mješavinu pripremili smo u skladu s uputama proizvođača komercijalno dostupnog kompleta kemikalija Big Dye Terminator v3.1 Cyclor Sequencing kit (Applied BioSystems).

Konačni volumen reakcijske mješavine za sekvencijsku reakciju iznosio je 10 µl, a smjesa se sastojala od:

- 2 µl 5x sekvencijskog pufera
- 0,5 µl MMX
- 0,65 µl svake početnice (50 µM),
- 1-2 µl DNA (PCR produkta),
- do 10 µl sterilne deionizirane vode Nuclease-Free Water (Qiagen).

Sekvencijsku reakciju izveli smo na instrumentu Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) po prethodno objavljenom protokolu sekveniranja STeP (Platt i sur. 2007) koji je naveden u Tablici 12.

Tablica 12. Odvijanja sekvencijske reakcije po STeP protokolu (Platt i sur. 2007)

Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
	96 °C	1 min
15 ciklusa	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	1 min 15 s
5 ciklusa	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	1 min 30 s
5 ciklusa	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	2 min
	8 °C	∞

#### 2.2.12.1. Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije

Čišćenje produkata sekvencijske reakcije uklonili smo dideoksinukletide i soli. Postupak je izveden u skladu s uputama komercijalno dostupnog kompleta kemikalija BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). U sekvencijsku reakciju dodali smo 10 µl XTerminator Solution (otopine XTerminator) i 45 µl SAM solutiona (SAM otopine). Smjesa je miješana pri 2000 okretaja u minuti tijekom 25 minuta i centrifugirana na 3000 okretaja u minuti tijekom 2 minute.

Reakcijske pločice smo stavili u računalni sistem ABI3500 Genseic Analyzer (Applied BioSystems) koji omogućava automatsko određivanje nukleotidnog slijeda. Za dobivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata izabrali smo dva protokola: ShortReadSeqPOP7 koji je primjeren za dobivanje nukleotidnih sekvenci dugih 300 pb, i FastReadSeqPOP7 s kojim možemo dobiti nukleotidne sljedove duge 700 pb. Nakon završetka analize računalni program dostavlja konačne rezultate u obliku elektorferograma s pripadajućom nukleotidnom sekvencom.

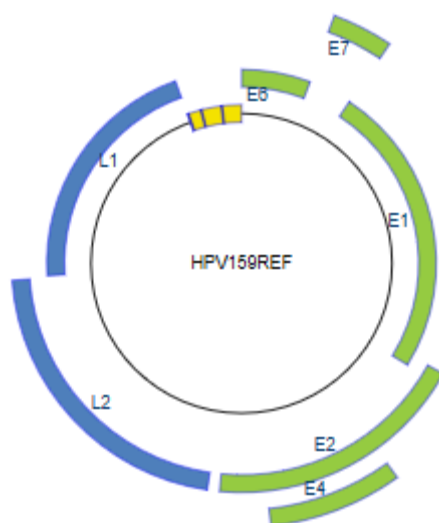
#### 2.2.12.2. Analiza slijeda nukleotida

Nukleotidne sekvence dobivene automatskim određivanjem nukleotidne sekvence sastavili smo s pomoću računalnog programa Vector NTI Advance v10.1.1 (Invitrogen, Carlsbad, ZDA). Korištenjem specifičnih algoritama za svaku PCR sekvencu (RT-PCR) dobili smo nukleotidne sljedove s različitim početnicama i konsenzusne nukleotidne sekvence.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Definicija genoma novootkrivenog genotipa HPV159

Cjelokupna nukleotidna sekvenca genoma HPV159 nalazi se u GenBank-u pod brojem HE963025 od lipnja 2013.godine. Dugačka je 7443 bp i ima 40,6 % baznih parova gvanin-citozin. Kodirajuće područje sastoji se od sedam ORF (Slika 5., Tablica 13.). Rana područja koja nose zapis za virusne proteine su E1, E2, E4, E6 i E7, dok kasno područje kodira proteine L1 i L2. U kompletnoj genomskoj sekvenci nema otvorenog okvira čitanja za virusni protein E5.



Slika 5. Organizacija genoma HPV159. Položaji virusnih gena (E6, E7, E1, E4, E2, L2 i L1) i nekodirajućeg genomskog područja LCR prikazani su u pojedinačnom genu, tj. genomskom području. Preuzeto s web2.

Tablica 13. Položaj i dužina otvorenih okvira čitanja (ORF) u genomu HPV159

ORF	Položaj u genomu (nt)	Dužina (bp)
E6	1 – 426	426
E7	423 – 701	279
E1	694 – 2514	1821
E2	2456 – 3835	1380
E4	2979 – 3590	612
L2	3899 – 5494	1596
L1	5506 – 7032	1527

ORF-otvoreni okvir čitanja; nt-nukleotid; bp-bazni par



U genomu HPV159 se između ORF L1 i E6 nalazi nekodirajuće područje LCR (7033-7443 nt) dužine 411 bp. Na 5' kraju LCR se nalazi poliadenilacijsko mjesto za virusne molekule mRNA (AATAAA, 7048-7053 nt). Unutar LCR nekodirajuće regije nalaze se tri konsenzusna palindromska vezna mjesta za protein E2 (ACCGATAGCGGT, 7032-7043 nt; ACCGCGCCCGTT, 7133-7144 nt; ACCGATAACGGT, 7289-7300 nt) i vezno mjesto za protein E1 (TTGTGGTTAACAACAATCAT, 7341-7360 nt) koje se nalazi na kraju LCR regije. Unutar LCR regije smo identificirali dvije TATA sekvence ranog virusnog promotora (TATAAA 7154-7159 nt; 7405-7410 nt).

### 3.2. Značaj virusnih proteina HPV159

Protein E6 HPV159 sastavljen je od 141 AK i sadrži dvije cink-vezujuće domene s konsenzusnim slijedom AK CxxC(x)<sub>30</sub>CxxC i CxxC(x)<sub>29</sub>CxxC (27-64 AK ; 101-137 AK). Cink-vezujuće domene razdvojene su s 36 AK. Na N-kraju E6 proteina nalazi se motiv LxxLL (LIDLL, 20-24 AK) potreban za povezivanje E6 vezanog proteina (E6AP) koji se ponaša kao ubikvitin ligaza.

Protein E7 HPV159 veličine 92 AK u sebi sadrži vezno mjesto za pRB s konsenzusnim slijedom LxCxE (LHCYE, 24-28 AK) i jedno malo izmijenjeno cink-vezujuće mjesto na C-kraju, CxC(x)<sub>29</sub>CxxC (50-85 AK).

Protein E1 HPV159 kodira najveći viralni protein i sadrži 606 AK. On je replikacijski protein i u njegovoj sekvenci na karboksi-terminalnom kraju se nalazi ATP-vezno mjesto s konsenzusnom sekvencom G<sub>x4</sub>GK(T/S) (GPPDTGKS, 434-441 AK) za ATP-ovisnu helikazu. NLS je sastavljen od visokoočuvane regije KRK (80-82 AK) nakon koje slijedi leucinom bogat jezgri signal NES s konsenzusnim motivom L<sub>x(2-3)</sub>L<sub>x2</sub>(L/I/V)<sub>x</sub>(L/I) (LRSVLAALFW, 267-277 AK). U nizu NLS postoji vezno mjesto za ciklin s konsenzusnim slijedom RxL (RRL, 109-11 AK) na koji se veže ciklin E/ciklin A vezan u kompleksu s kinazom ovisnom o ciklinu, cdk2.

E2 protein HPV159 sadrži 459 AK i on je regulatorni protein. Njegova C-terminalna regija (oko 85-100 AK) sadrži DNA vezujuću domenu s motivom leucinskog zatvarača s konsenzusnom sekvencom L<sub>x6</sub>L<sub>x6</sub>L<sub>x7</sub>L (LSDRFNALQETLMELYEAGREDL, 4-26 AK). Bogat je serin-arginin dipeptidima i ima visoko očuvanu regiju RxxS (RSQRSRSRSRSRSRS, 318-333 AK) što potiče vezanje kromatina domaćina i stabilizaciju E2 proteina.

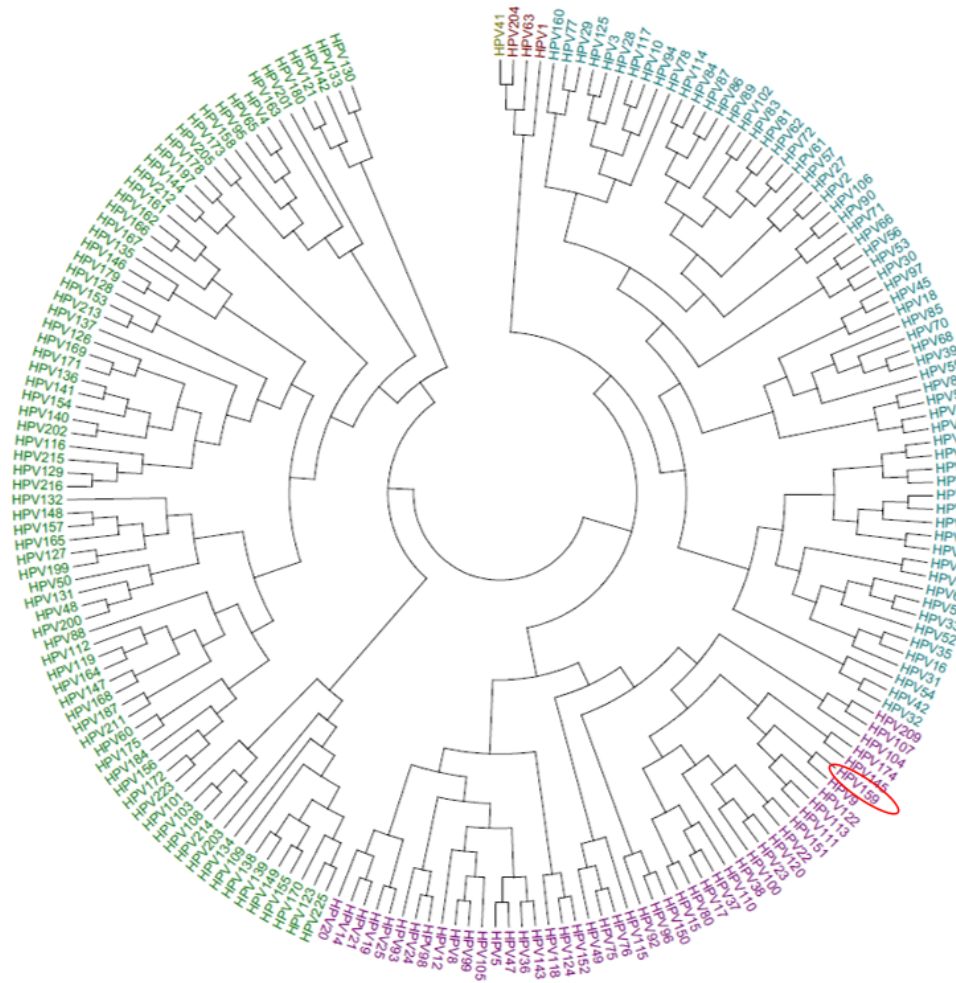
Protein E4 HPV159 sadrži 203 AK i njegov otvoreni okvir čitanja (ORF) E4 sadrži svoj start kodon koji se nalazi između 2988-2990 nt (ATG). Također, za razliku od svih drugih virusnih proteina, E4 sadrži visok udio prolina od 19,7 % (ostali proteini sadrže udio manji od 10 %: E6 protein – 4,9 %; E7 protein – 4,34 %; E1 protein – 4,6 %; L2 protein – 8,2 %; L1 protein – 6,2 %). Na kraju N-kraja virusnog proteina nalazi se konsenzusni motiv LL(x)<sub>6</sub>LL (LLSLVLRHLL, 22-31 AK) koji omogućava povezivanje na citokeratine. ORF E4 proteina se u potpunosti preklapa s ORF E2 proteina.

Protein L2 HPV159 sadrži 531 AK i kodira za male proteinske jedinice virusne kapside. Na njenom amino kraju nalazimo vezno mjesto za furin s konsenzusnom sekvencom RxK/RR (RTKR 6-9 AK). Na karboksi kraju se nalazi vezno mjesto za L1 karakterizirano prolinskim ostatcima PxxP (PEAP, 497-500 AK). Također, nalazimo nekoliko GxxxG motiva čije su mutacije važne kod endosomalne retencije (13-17 AK; 355-359 AK; 383-387 AK).

Protein L1 HPV159 sadrži 508 AK i kodira za velike proteinske jedinice velike kapside. To je najočuvanija sekvenca unutar genoma i koristi se za klasifikaciju PV.

### **3.3. Filogenetska definicija HPV159**

Na osnovu filogenetsko stabla, temeljenog na svim dostupnim nukleotidnim sekvencama virusnih gena L1, novi genom HPV159 pripada kutanotrofnom (engl. *cutaneotrophic*) rodu *Beta-PV*, vrsta Beta-2. Prikaz filogenetskog stabla nalazi se na Slici 6. HPV159 je filogenetski najbliži virusnom genomu genotipa HPV9 te oni tvore samostalnu filogenetsku skupinu u virusnoj vrsti Beta-2. U Tablici 14. prikazana je usporedba genoma HPV159 i HPV9.



Slika 6. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu dostupnih nukleotidnih slijedova gena L1 svih HPV-a. Crvenom bojom je označen položaj HPV159.

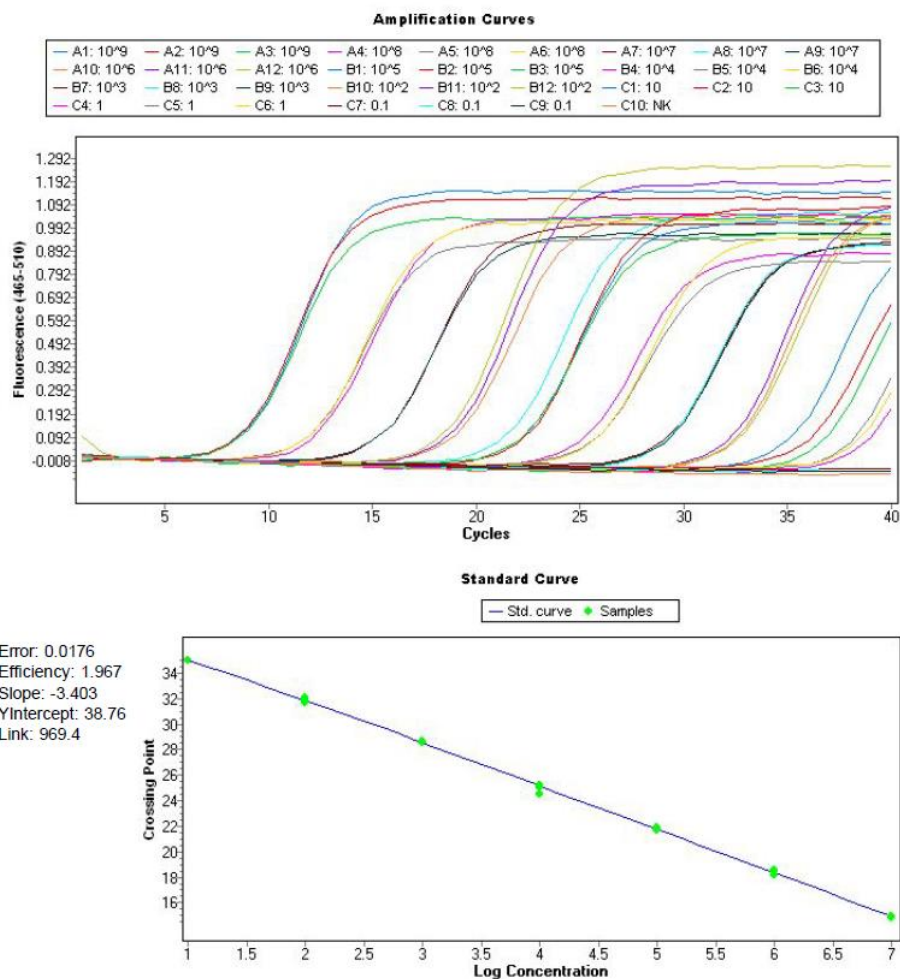
Tablica 14. Molekularna sličnost HPV159 i HPV9

ORF HPV159	Sličnost između sljedova (%)	ORF HPV9
E6	nt	73,3 %
	AK	83,0 %
E7	nt	81,6 %
	AK	89,1 %
E1	nt	80,5 %
	AK	90,7 %
E2	nt	77,6 %
	AK	84,6 %
E4	nt	73,2 %
	AK	72,9 %
L1	nt	79,6 %
	AK	94,5 %
L2	nt	75,7 %
	AK	92,9 %

### 3.4. Tkivni tropizam i klinički značaj infekcije sa HPV159

#### 3.4.1. Karakteristike tipične za HPV159 kvantitativni PCR u realnom vremenu

Testiranjem triplikata razrjeđenje plazmidne DNA HPV159 s koncentracijom od  $10^9$  do  $10^1$  kopija plazmidne DNA/reakciji procijenjena je analitička osjetljivost HPV159 vrsno specifičnog RT-PCR-ana 10 virusnih kopija/reakciji. Korelacijski koeficijent standardne krivulje (engl. *correlation coefficient*,  $R^2$ ) između Ct (engl. *cycle threshold*) i logaritma početnog broja kopija virusa kroz najmanje 7 redova veličine smo odredili na  $R^2 = 0,9992$ . učinkovitost umnožavanja je bila 96,7 % (Slika 7.).



Slika 7. A) Rezultati HPV159 RT-PCR testiranja razrjeđenja plazmidne DNA koja je imala 0,1-10<sup>9</sup> virusnih kopija/reakciji. ; B) standardna krivulja koju smo upotrebljavali pri određivanju koncentracije HPV159 u kliničkim uzorcima

### 3.4.2. Virusno opterećenje u HPV159 pozitivnim uzorcima

Prisutnost novog genotipa HPV u različitim kliničkim uzorcima provjerili smo uporabom HPV159 tipsko-značajnog RT-PCR razvijenog u svrhu izrade ovog diplomskog rada. Testirali smo reprezentativnu zbirku uzoraka (n= 1499) zdrave i benigne ili maligne modificirane kože i sluznice te dobili 40/1499 (2,7 %) uzoraka pozitivnih na prisutnost HPV159. Prevalencija svih rezultata prikazana je u Tablici 15.

Tablica 15. Definiranje infekcije HPV159 u zbirci uzoraka s naznačenim količinama testiranih te pozitivnih uzoraka i njihovih prevalenci

Vrsta tkiva	Anatomsko područje (vrsta uzorka)	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Prevalencija (%)
<b>Mukozalno</b>	Usna šupljina (bris, FFPE tkivo)	401	20	4,9 %
	Usna šupljina i usni dio ždrijela SCC (FFPE tkivo)	135	0	0
	Nosni dio ždrijela (bris)	60	0	0
	Grkljan: verukozni SCC (FFPE tkivo)	10	0	0
	Grkljan: normalna histologija (FFPE tkivo)	10	2	20 %
	Cerviks: normalna citologija (bris)	60	0	0
	Cerviks: SMILE	37	0	0
	Penis: bradavice (svježe tkivo)	51	0	0
<b>Muko-kutanozno</b>	Analni kanal i analni rub	121	3	2,5 %
	Perianalna koža, anus: bradavice (svježe tkivo)	60	1	1,7 %
<b>Kutanozno</b>	Obrve (dlačni folikuli)	367	14	3,8 %
	Koža: obične bradavice (FFPE tkivo)	86	0	0
	Koža: SCC (FFPE tkivo)	50	0	0
	Koža: BCC (FFPE tkivo)	51	0	0
<b>Zajedno</b>		<b>1499</b>	<b>40</b>	<b>2,7 %</b>

FFPE tkivo: tkivo fiksirano u formalinu i učvršćeno u parafinu (engl. *formalin-fixed, paraffin embedded*); SCC: planocelularni karcinom kože; BCC: bazocelularni karcinom kože; SMILE: intraepitelne lezije stratificiranog sloja koje proizvode mucin (enlg. *stratified mucin producing intraepithelial lesions*)

Kao što vidimo u Tablici 16., virusno opterećenje HPV159 u svim testiranim tkivnim uzorcima je vrlo nisko i kreće se od 0,001532 do 0,95568 virusnih kopija/10<sup>4</sup> stanica.

Tablica 16. Virusno opterećenje u HPV159 pozitivnim uzorcima

Vrsta tkiva	Anatomsko područje (vrsta uzorka)	Oznaka uzorka	Virusno opterećenje (virusne kopije/10 <sup>4</sup> st.)
<b>Koža</b>	Obrve (dlačni folikuli)	626	0,002
		625	0,002
		622	0,003
		596	0,01
		594	0,003
		303	0,003
		254	0,03
<b>Sluznica</b>	Usna šupljina	249	0,02
		73	0,01
		72	0,04
		105	0,09
		75	0,04
		87	0,03
		71	0,06
		85	0,30
		37	0,05
		89	0,46
		86	0,16
		82	0,96
		63	0,88

### **3.5. Umnožavanje LCR HPV159 i identifikacija viralnih varijanti HPV159**

Za umnožavanje cjelokupnog nukleotidnog slijeda nekodirajućeg genomskog područja LCR razvili smo PCR reakciju s visokom analitičkom osjetljivošću. Kao što je vidljivo iz Tablice 17., kod pet uzoraka pronašli smo pet viralnih varijanti od kojih se od referentnog uzorka jedan ne razlikuje niti u jednom mjestu (0/410; 0 %), te se ostali razlikuju u dva (2/410; 0,48 %), četiri (4/410; 0,98 %), dvadeset (20/410; 4,8 %) te trideset šest (36/410; 8,7 %) nukleotidnih mjesta. Uzorak u kojem nije uočena razlika definirali smo u analnom brisu, dok su uzorci u kojima se pojavljuje razlika u nukleotidnom slijedu definirali kod dlaka obrva.



Tablica 17. Podtipske razlike HPV159 identificirane u pet uzoraka. Na vrhu tablice označena su nukleotidna mjesta referentnog izolata HPV159 kod kojih je došlo do izmjene nukleotida. Genomska mjesta kod kojih nisu zabilježene promjene označena su točkom.

		Nukleotidna mjesta u LCR																								
Oznaka uzorka		7353	7354	7355	7356	7357	7360	7361	7362	7365	7366	7369	7371	7384	7385	7386	7390	7392	7393	7395	7396	7397	7398	7407	7408	7409
Referenca	HE963025-HPV159	A	A	C	A	A	A	T	C	A	C	A	A	C	T	-	G	T	A	C	T	A	C	T	A	T
Dlake obrva	1-o-1+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Dlake obrva	17-o-723	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Dlake obrva	D206	G	T	T	G	-	.	.	A	G	.	C	T	T	A	A	A	C	-	T	G	.	.	.	T	A
Dlake obrva	1427-o-pool	.	.	.	.	.	T	A	.	.	T	T	T	.	.	-	.	.	-	.	C	T	T	C	.	.
Analni bris	A395Re	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

		Nukleotidna mjesta u LCR																					
Oznaka uzorka		7410	7413	7420	7421	7424	7426	7427	7429	7431	7433	7434	7435	7436	7437	7438	7439	7441	7442	7444	7446	7449	7450
Referenca	HE963025-HPV159	A	T	T	T	C	T	G	A	A	T	-	-	-	A	A	A	G	C	A	G	C	A
Dlake obrva	1-o-1+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
Dlake obrva	17-o-723	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Dlake obrva	D206	C	C	G	A	T	G	A	C	.	C	-	-	-	T	C	C	A	G	.	T	T	G
Dlake obrva	1427-o-pool	.	.	.	C	A	.	.	G	.	A	T	T	A	G	.	.	A	G	.	.	.	.
Analni bris	A395Re	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.

#### 4. RASPRAVA

PV tvore veliku i raznovrsnu skupina malih DNA virusa bez ovojnice te su povezani sa nastankom benignih i malignih neoplastičnih promjena kožnog i mukoznog epitela (Kocjan i Poljak 2011). International Committee on the Taxonomy of Viruses je klasificirao sve poznate humane i animalne PV u 16 rodova i označio ih slovima grčkog alfabeta (od alfa do ksi). Pet od njih pripada HPV-ima te se dijele na *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* i *Nu* (de Villiers i sur. 2004, Potočnik 2006). U sklopu ovog diplomskog rada smo molekulski i filogenetski okarakterizirali novi genotip HPV-a. On je uzorkovan i izoliran od imunokompetentnog 36-godišnjeg muškarca koji je sudjelovao u istraživanju o rasprostranjenju kutaneotrofnih genotipova HPV-a u analnom kanalu Slovenaca koji imaju spolne odnose s muškarcima, odredili mu virusni tropizam i virusne varijante te njegov klinički značaj.

Kompletni viralni genom je pohranjen u Reference Center for Papillomaviruses u Heidelbergu u Njemačkoj od srpnja 2012. godine. Potvrđena sekvenca je službeno nazvana HPV159 te se može pronaći na EMBL, GenBank i DDBJ bazama podataka pod pristupnim imenom HE963025 (Kocjan 2013).

Virusni genoma HPV159 dugačak je 7443 bp i time odgovara ostalim genotipovima HPV-a čiji se genetski materijal sastoji od dvolančane DNA kružnog oblika velike otprilike 8.000 bp. Za razliku od većine HPV-a koji kodiraju najčešće 8 gena, koje dijelimo na šest ranih i dva kasna (de Villiers i sur. 2004, Kocjan i Poljak, 2011, McLaughlin-Drubin 2014, Tommasino, 2016), kodirajuće područje HPV159 sastoji se od sedam ORF-a. Rana područja koja nose zapis za virusne proteine su E1, E2, E4, E6 i E7, dok kasno područje kodira proteine L1 i L2. U kompletnoj genomskoj sekvenci nema otvorenog okvira čitanja za virusni protein E5.

E1 protein je ATP-ovisna DNA helikaza i jedini enzim kodiran od strane PV-a, te je bitan za replikaciju i amplifikaciju viralnog episoma u jezgri inficiranih stanica keratinocita (Bergvall, 2013, Harden, 2016). E1 protein genotipa HPV159 ima najveći ORF cijelog PV-a veličine 606 AK što je u skladu sa srednjim vrijednostima ostalih HPV-a čija veličina varira od 600-6500 AK (Bergval 2013). Na svom karboksi-terminalnom kraju sadrži ATP-vezno mjesto GPPDTGKS (434-441 AK) koji prije početka replikacije virusnog genoma u staničnoj jezgri omogućuje djelovanje ATP-ovisne heksamerne DNA helikaze. Amino kraj proteina E1 je najmanje očuvan segment proteina te sadrži brojne kratke sekvence AK



Proteini E6 i E7 su odgovorni za pojavljivanje zloćudnih transformacija stanica domaćina koje dovode do formacije tumora te ih stoga nazivamo onkoproteinima. E6 se veže za tumor supresor p53 i inaktivira ga, dok se E7 veže za tumor supresor pRB i također ga inaktivira (Aarthy 2018).

E6 protein genotipa HPV159 sastoji se od 141 AK i u sebi sadrži dvije domene cinkovih prstiju od kojih je jedna malo izmijenjena. One se uglavnom pronalaze u jezgri s visoko očuvanim konsenzusnim sekvencama CxxC(x)<sub>30</sub>CxxC i CxxC(x)<sub>29</sub>CxxC na položaju 27-64 AK i 101-137 AK te su međusobno odvojene s 36 AK. Vežu cinkove ione i odgovorne su za unutarstaničnu stabilnost i konformaciju (Tomassino 2016). Prvi protein dolazi u interakciju s E6 je E3 ubikvitin ligaza poznata i kao E6AP (Howie, 2009, Tomassino 2016, Estevao i sur. 2019). A prvi identificirani i najistraženiji cilj E6/E6AP je p53 tumor supresor. Motiv na E6AP koji se povezuje na E6 se nalazi između 20-24 AK te je konsenzusne sekvence LIDLL. Na C-kraju proteina E6 HR-HPV-a nalazi se PDZ-vezujući motiv s konsenzusnom sekvencom xT/SxV/L koji se specifično veže na PDZ domenu određenih staničnih proteina koji su bitni u regulaciji staničkog rasta, stanične adhezije, stanične polarnosti i signalizacije povezane s proliferacijom i apoptozom stanica. Kod HPV159 nismo pronašli takvu konsenzusnu sekvencu (Longworth i Laimins 2004, Thomas i sur. 2008, Bergin i sur. 2013, McLaughlin-Drubin 2014).

E7 protein je protein pomagač sastavljen od 92 AK i nalazi se prvenstveno u jezgri zaraženih stanica (Tommasino 2016, Estevao i sur. 2019). On ima glavnu ulogu u životnom ciklusu HPV-a na način da reprogramira stanični okoliš kako bi bio pogodan za viralnu replikaciju (Roman i Munger, 2013). Prva identificirana stanična meta E7 je tumor supresor retinoblastoma (pRB) koji se povezuje na motiv LxCxE, u slučaju HPV159 to je LHCYE (24-48 AK) koji omogućava stabilno povezivanje proteina Rb porodice, kao što su p107, p130 i protein retinoblastoma (pRB) (McLaughlin-Drubin 2014, Tommasino 2016). Na C-kraju proteina E7 nalazi se malo izmijenjena domena cinkova prsta CxC(x)<sub>29</sub>CxxC (50-85 AK), koja pospješuje oblikovanje dimera virusnog proteina i omogućava njeno pravilno djelovanje (Longworth i Laimins 2004, Liu i sur. 2006, Roman i Munger 2013, McLaughlin-Drubin 2014).

Kraj viralnog ciklusa uključuje ekspresiju L1 i L2 proteina potrebnih za pakiranje genoma i formiranje virusne stanice (Harden 2016). Jer ima najočuvaniji ORF od svih virusnih proteina, L1 se koristi za filogenetsku organizaciju i klasifikaciju HPV-a (Harden 2016).

Protein L1 genotipa HPV159 sadrži 508 AK i kodira za velike proteinske jedinice velike kapside (Modis i sur. 2002).

Kapsidni L2 protein igra bitnu ulogu u slaganju PV-a i infektivnim procesima. L2 genotipa HPV159 sadrži 531 AK i kodira male proteinske jedinice virusne kapside (Doorbar i Gallimore 1987, Jin i sur. 1989, Wang i Roden 2013). C-terminalna L1-vezujuća regija L2 proteina je karakterizirana s nekoliko ostataka prolina PEAP na mjestu 497-500 AK. Homologni PxxP ostatci pronađeni su u sličnim regijama C-kraja drugih L2 proteina što nalaze da je to dobro očuvano L1-vezujuće mjesto kod PV-a (Buck i sur. 2008, Lowe i sur. 2008, Wang i Roden 2013). Na N-kraju nalazimo vezno mjesto za furin s konsenzusnom sekvencom RxK/RR (RTKR 6-9 AK). Također, nalazimo nekoliko GxxxG motiva čije su mutacije važne kod endosomalne retencije na mjestima 13-17 AK, 355-359 AK, te 383-387 AK.

Između ORF L1 i E6 nalazi se LCR dužine 410 bp (7033-7443 nt). LCR ne nosi zapise za virusne proteine, nego uključuje većinu *cis*-djelujućih regulatornih sekvenci koje reguliraju replikaciju i transkripciju virusnog genoma kao što su mjesto početka replikacije virusnog genoma, rani virusni promotori, brojna vezna mjesta za za stanične i virusne čimbenike transkripcije te proteine pojačivače i represore za regulaciju (Joh i sur. 2009, Kocjan i Poljak, 2011). Vezna mjesta koja se pojavljuju u LCR uključuju dvije TATA sekvence (TATAAA 7154-7159; 7405-7410) ranog promotora transkripcije virusnih gena na koju su vezani transkripcijski faktori i pojedinačni TBP te vezna mjesta za preostale faktore transkripcije stanica kao što su Ap-1, NF-1 i Sp1. Na 5' kraju LCR-a se nalazi konsenzusna sekvenca kasnog poliadenilacijskog signala (AATAAA, 7048-7053 nt) u kojoj dolazi do završetka transkripcije molekula mRNA kasnih virusnih proteina te dodavanje poliadenilacijskog repa na njihov 3' kraj tijekom obrade u poliadenilaciji (Chen i sur. 2009). Na 3' kraju LCR-a nalazi se ori mjesto koje obuhvaća AT-bogato područje kao mjesto vezanja E1 proteina (TTGTGGTTAACAACAATCAT, 7341-7360nt) i tri konsenzusne sekvence kao mjesta vezanja za protein E2 (ACCGATAGCGGT, 7032-7043 nt; ACCGCGCCCGTT, 7133-7144 nt; i ACCGATAACGGT, 7289-7300 nt). Protein E1 veže se na dugu, nepotpunu palindromsku regiju od 18 bp unutar ori mjesta (TTGTGGTTAACAACAATCAT, 7341-7360nt) (Longworth i Laimins 2004, Doorbar 2006, Bergvall i sur. 2013, McBride 2008, 2013, 2017).

Na osnovu rezultata molekularne *in silico* analize genotipa referentnog uzorka HPV159 zaključujemo da genom nosi zapis za značajne virusne proteine s očuvanim funkcionalnim domenama i motivima te nekodirajuće područje LCR sa značajnim regulatornim DNA sljedovima koji virusu omogućavaju da uspješno dovrši svoj životni ciklus te zarazi nove stanice domaćina.

Postojeći HPV genotipovi pripadaju jednom od pet rodova PV: *Alpha*-PV, *Beta*-PV, *Gamma*-PV, *Mu*-PV i *Nu*-PV. Svaki od njih izražava tropizam za određenu vrstu epitela. Filogenetski, većina PVa pripada *Alpha*, *Beta* i *Gamma* rodu (McLauglin-Drubin 2014).

Na osnovu dostupnih nukleotidnih sekvenci virusnih gena L1 novi genom HPV159 smo filogenetski uvrstili u *Beta*-PV. Filogenetski je najbližiji virusnom genomu genotipa HPV9 te oni tvore samostalnu filogenetsku skupinu u virusnoj vrsti Beta-2 (Kocjan 2013).

*Beta*-PV su tipično povezani s nevidljivim kutanoznim infekcijama kod ljudi, uglavnom kod imunokompromitiranih pojedinaca i pacijenata koji pate od nasljedne bolesti EV (Doorbar 2006). U jednom istraživanju dokazana je prisutnost *Beta*-PV u iščupanim obrvama zdravih odraslih osoba (de Koning i sur. 2007, Tommasino 2016). Time dolazimo do hipoteze da je područje ispupčenja (*bulge area*) vanjskog sloja dlake jedan od glavnih spremnika *Beta*-PV-a. Naši se rezultati poklapaju s tezama prethodno navedenih istraživanja o pronalasku *Beta*-PV u dlačnim folikulima pojedinaca. Od 367 testiranih uzoraka 14 ih je pozitivnih (3,8 %) što možemo povezati s činjenicom da su dlačni folikuli jedan od glavnih spremnika *Beta*-PV. Osim na koži, *Beta*-PV se može pronaći i na oralnom mukoznom epitelu, obrvama i vanjskim genitalijama (Tomassino 2016). Najviše pozitivnih uzoraka imali smo na području mukoznog epitela, točnije usne šupljine, čak njih 20 od 401 testiranih uzoraka što je postotak rasprostranjenosti virusa (prevalencija) od 4,9 %. Izračunom opterećenja virusom (virusne kopije /  $10^4$  stanica) dobili smo vrlo male vrijednosti što možemo objasniti malom količinom DNA u uzorcima. Također, na osnovu niskog virusnog opterećenja u testiranim uzorcima možemo zaključiti da uglavnom uzrokuju latentne i klinički neznčajne infekcije kože i sluznice (Köhler 2009, Bottalico 2012, Forslund 2013, Sichero 2013).

U sklopu ovog diplomskog rada iz kolekcije uzoraka smo dobili 40 uzoraka pozitivnih na HPV159. S obzirom na to da je većina uzoraka fiksirana u formalinu, uklopljena u parafin, ili su arhivski tkivni uzorci, ili brisevi kože i sluznice s niskim virusnim opterećenjem i/ili fragmentiranom DNA za identificiranje genetske raznolikosti genotipa HPV159

usredotočili smo se na nekodirajuće područje LCR. Za genotip HPV159 smo razvili i proveli ugniježđenu PCR metodu koja je imala visoku analitičku osjetljivost (najmanje 10 virusnih kopija/reakcija). Bez obzira na niske vrijednosti virusnog opterećenja za svaki uzorak smo proveli ugniježđeni PCR, ali ipak nismo mogli dobiti kompletne nukleotidne sljedove LCR kod svih izolata. Sekvenciranjem smo uspjeli dobiti sekvence pet uzoraka i pronašli smo 5 podtipova od kojih se od referentnog uzorka jedan ne razlikuju ni u jednom mjestu (0/410; 0 %) ostali se razlikuju u dva (2/410; 0,48 %), četiri (4/410; 0,98 %), dvadeset (20/410; 4,8 %) te trideset šest (36/410; 8,7 %) nukleotidnih mjesta. Uzorak u kojem nije uočena razlika definirali smo u analnom brisu, dok su uzorci u kojima se pojavljuje razlika u nukleotidnom slijedu definirali kod dlaka obrva. Sve mutacije HPV159 dokazane su izvan važnih funkcionalnih odjeljaka u LCR-u, tako da vjerujemo da varijante HPV159 nisu patogeno različite.

## 5. ZAKLJUČAK

- U sklopu diplomskog rada potpuno je molekularno i filogenetski analiziran cijelokupni nukleotidni slijed genoma HPV159 koji je uzorkovan i izoliran od imunokompetentnog 36-godišnjeg muškarca koji je sudjelovao u istraživanju o rasprostranjenju HPV genotipova u analnom kanalu Slovenaca koji imaju spolne odnose s muškarcima.
- Molekularnom *in silico* analizom dokazana je organizacija genoma HPV159 te AK slijed nužnih virusnih proteina (specifičnih motiva i domena) u skladu s karakteristikama ostalih *Beta-PV*.
- Genotip HPV159 filogenetski je smješten u Beta-2 te je najrodniji s genotipom HPV9.
- Na osnovu rezultata molekularne *in silico* analize zaključeno je da genom HPV159 nosi zapis za značajne virusne proteine s očuvanim funkcionalnim domenama/motivima i nekodirajuće područje LCR s značajnim regulatornim DNA sljedovima koji PV-ima omogućuju da uspješno zakluče svoj životni ciklus i inficiraju nove stanice domaćina.
- Za utvrđivanje tkivnog tropizma i kliničke značajnosti HPV159, razvijrn je i korišten vrsno specifičan kvantitativni PCR u realnom vremenu (HPV159 RT-PCR) s osjetljivošću od 10 virusnih kopija/reakcija.
- S pomoću HPV159RT-PCR u kombinaciji s kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu kojim je umnožen 150 bp veliki dio gena za ljudski beta-globin dokazano je virusno opterećenje u pozitivnim uzorcima.
- Testirana je reprezentativna zbirka uzoraka (n= 1499) zdrave i benigne ili maligne modificirane kože i sluznice te je dobiveno 40 uzoraka pozitivnih na prisutnost HPV159. Virusno opterećenje u svim testiranim uzorcima vrlo je nisko i kreće se od 0,001532 do 0,95568 virusnih kopija / 10<sup>4</sup> stanica.
- Na osnovu niskog opterećenja virusom u testiranim uzorcima zaključeno je da uglavnom uzrokuju latentne i klinički neznčajne infekcije.
- Za umnožavanje virusnog genoma HPV159 na temelju cjelokupnog nukleotidnog slijeda LCR razvijene su početnice za ugniježđeni PCR i na temelju njega su identificirani genomske podtipovi HPV159.
- Kod pet uzoraka pronađeno je 5 podtipova od kojih se od referentnog uzorka jedan ne razlikuju ni u jednom mjestu (0/410; 0 %) , a ostali se razlikuju u dva (2/410;



0,48 %), četiri (4/410; 0,98 %), dvadeset (20/410; 4,8 %) te trideset šest (36/410; 8,7 %) nukleotidnih mjesta. Uzorak u kojem nije uočena razlika definirali smo u analnom brisu, dok su uzorci u kojima se pojavljuje razlika u nukleotidnom slijedu definirali kod dlaka obrva.

- Sve mutacije HPV159 dokazane su izvan važnih funkcionalnih odjeljaka u LCR-u, na temelju čega pretpostavljamo da varijante HPV159 nisu patogeno različite.

## 6. Literatura

- Aarthy M., Kumar D., Giri R., Singh K. (2018) E7 oncoprotein of human papillomaviruses: Structural dynamics and inhibitor screening study. *Gene* 658: 159 – 177.
- Aksoy P., Gottschalk E.Y., Meneses P.I., (2017) HPV entry into cells. *Mutation Research* 772: 13–22.
- Almeida JD, Oriel JD, Stannard LM. (1969) Characterization of the virus found in human genital warts. *Microbios* 3: 225–32.
- Antonsson, A., Karanfilovska, S., Lindqvist, P.G., Hansson, B.G. (2003) General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *Journal of clinical microbiology* 41(6): 2509–2514.
- Bergin I. L., Bell J. D., Chen Z., Zochowski M. K., Chai D., Schmidt K., Culmer D. L., Aronoff D. M., Patton D. L., Mwenda J. M., Wood C. E., Burk R. D. (2013) Novel genital *Alphapapillomaviruses* in baboons (*Papio hamadryas anubis*) with cervical dysplasia. *Veterinary Pathology* 50, 1: 200-208
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J. (2013) The E1 proteins. *Virology* 445: 35–56.
- Bernard H.U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology* 32: S1–S6.
- Bernard H.U. (2013) Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent development. *Infection, Genetics and Evolution* 18: 357–361.
- Bodily J, Laimins LA. (2011) Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in Microbiology* 19: 33-39.
- Bornberg-Bauer E., Rivals E., Vingron M. (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Research* 26, 11: 2740-2746
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute* 87: 796–01.
- Bottalico D., Chen Z., Dunne A., Ostolozza J., McKinney S., Sun C., Schlecht N.F., Fatahzadeh M., Herrero R., Schiffman M., Burk R.D. (2012) The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the

- Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *Journal of Infectious Diseases* 204: 787–92.
- Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *The Journal of Investigative Dermatology* 108:712–5.
  - Boyle, J., MacKie, R.M., Briggs, J.D., Junor, B.J., Aitchison, T.C. (1984) Cancer, warts, and sunshine in renal transplant patients. A case-control study. *Lancet* 1(8379): 702–705.
  - Bravo I.G., Alonso A. (2004) Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *Journal of virology* 78: 13613–13626.
  - Bronnimann M. P., Chapman J. A., Park C. K., Campos S. K. (2013) A transmembrane domain and GxxxG motifs within L2 are essential for papillomavirus infection. *Journal of Virology* 87, 1: 464–473.
  - Buck C.B., Cheng N., Thompson C.D., Lowy D.R., Steven A.C., Schiller J.T., Trus B.L. (2008) Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of Virology* 82: 5190–5197.
  - Buck C.B., Day P.M., Trus B.L. (2013) The papillomavirus major capsid protein L1, *Virology* 445: 169–174.
  - Burd EM. (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 1–17.
  - Burk R.D., Harari A., Chen Z. (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445: 232–243.
  - Bzhalava D., Mühr L.S., Lagheden C., Ekström J., Forslund O., Dillner J., Hultin E. (2014) Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Scientific Reports* 4: 5807.
  - Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases (STDs). Atlanta, GA: CDC; 2014. <http://www.cdc.gov/std/general/>
  - Chen Z., DeSalle R., Schiffman M., Herrero R., Burk R.D. (2009) Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45 and 97. *Journal of Virology* 88: 1443–1455.

- Chiu C., Miller S. (2011) Microarrays and deep sequencing in clinical microbiology. *Microbe* 6, 1: 13–20
- Chouhy D., Bolatti E. M., Piccirilli G., Sánchez A., Fernandez Bussy R., Giri A. A. (2013) Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments. *Journal of General Virology* 94: 524–533.
- Chow L.T., Broker T.R. i Steinberg B.M. (2010) The neutral history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Journal Compilation AMPIS* 118: 422–449.
- Crawford LV. (1965) A study of human papilloma virus DNA. *Journal of Molecular Biology* 13: 362–72.
- de Koning M.N., Struijk L., Bavinck J.N., Kleter B., ter Schegget J., Quint W.G., Feltkamp M.C. (2007) Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *The Journal of general virology* 88: 1489–1495.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
- de Villiers E.M. (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445:2–10.
- Doorbar, J., Gallimore, P.H. (1987) Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus. *Journal of Virology* 61: 2793–2799.
- Doorbar J. (2005) The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32: 1, S7-15.
- Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110, 5: 525–541.
- Doorbar J. (2007) Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers* 23:297–13.
- Doorbar J. (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445: 80–98.
- Dürst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 3812–3815.

- Estevao D., Rios Costa N., Gil da Costa R.M., Medeiros R. (2019) Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene regulatory mechanisms* 1862: 153–162.
- Feltkamp M.C.W., de Koning M.N.C, Bouwes Bavnick J.N., ter Schegget J. (2008) Betapapillomaviruses: Innocent bystanders or cause of skin cancer. *Journal of Clinical Virology* 43: 352–360.
- Ferguson M., Heath A., Johns S., Pagliusi S., Dillner J. (2005) Results of the first WHO international collaborative study on the standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *International Journal of Cancer* 118(6):1508-14.
- Forslund O., Johansson H., Madsen K.G., Kofoed K. (2013) The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the betapapillomavirus and gammapapillomavirus genera. *Journal of Infectious Diseases* 208:1335–41.
- Franco E.L., Harper D.M. (2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 23: 2388–2394.
- Frazer I.H. (2009) Interaction of Human Papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. *Virology* 384: 410–414.
- GeneXplain. 2016. Patch 1.0. Wolfenbüttel, GeneXplain GmbH. <http://gene-regulation.com/pub/programs.html#patch> (pristupljeno 03.05.2019.)
- Gissman L., Diehl V., Schulz-Coulon H.-J., zur Hausen H. (1982) Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from laryngeal papilloma. *Journal of Virology* 44: 393–400.
- GPMiner. Hsinchu, National Chiao Tung University, Institute of Bioinformatics. <http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/> (pristupljeno 03.05.2019.)
- Harden M.E., Munger K. (2016) Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research-Reviews in mutation research* 772: 3–12.
- Hazard K, Eliasson L, Dillner J, Forslund O. (2006) Subtype HPV38b[FA125] demonstrates heterogeneity of human papillomavirus type 38. *International Journal of Cancer* 119: 1073–7.
- Howie H.L., Katzenellenbogen R.A., Galloway D.A. (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384: 324–334.

- Howley P.M., Lowy D.R. (2007) Papillomaviruses. Lippincott Williams & Wilkins pp. 2299–2354.
- Hsu J.Y., Chen A.C., Keleher A., McMillan N.A., Antonsson A. (2009) Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *Journal of medical virology* 81: 1444–1449.
- Jin X.W., Cowsert L.M., Pilacinski W.P., Jenson A.B. (1989) Identification of L2 open reading frame gene products of bovine papillomavirus type 1 using monoclonal antibodies. *The Journal of General Virology* 70(Pt5): 1133–1140.
- Joh J., Hopper K., Van Doorslaer K., Sundberg J.P., Jenson A.B., Ghim S.J. (2009) *Macaca fascicularis* papillomavirus type 1: a non-human primate betapapillomavirus causing rapidly progressive hand and foot papillomatosis. *The Journal of General Virology* 90: 987–994.
- Kiviat N.B. (1999) Papillomaviruses in non-melanoma skin cancer: epidemiological aspects. *Seminars in cancer biology* 9: 397-403.
- Kocjan B. J., Poljak M., Petrovec M. (ur.) (2011) *Medicinska virologija, Papilomavirusi*. Medicinski razgledi, Ljubljana
- Kocjan B. J., Hošnjak L., Seme K., Poljak M. (2013) Complete genome sequence of a novel human Betapapillomavirus, HPV-159. *Genome Announcements* 1(3).
- Kocjan B. J., Bzhalava D., Forslund O., Dillner J., Poljak M. (2015) Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 9: 808–816.
- Kocjan B. J., Hošnjak L., Račnik J., Zdravec M., Bakovnik N., Cigler B., Ummelen M., Hopman A. H. N., Gale N., Švara T., Gombač M., Poljak M. (2017) Molecular characterization, prevalence and clinical relevance of *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1) naturally infecting Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *The Journal of General Virology* 98, 11: 2799–2809.
- Köhler A., Meyer T., Stockfleth E., Nindl I. (2009) High viral load of human wart-associated papillomaviruses (PV) but not beta-PV in cutaneous warts independent of immunosuppression. *The British Journal of Dermatology* 161:528–35.
- Liu X., Clements A., Zhao K., Marmorstein R. (2006) Structure of the human *Papillomavirus* E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 1: 578–586.

- Longworth M. S., Laimins L. A. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 2: 362–372.
- Lowe J., Panda D., Rose S., Jensen T., Hughes W.A., Tso F.Y., Angeletti P.C. (2008) Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. *Virology Journal* 5(1): 150.
- Majewski S, Jablonska S. (2002) Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations?. *Archives of Dermatology* 138: 649–654.
- Mamoor S., Onder Z., Karanam B., Kwak K., Bordeaux J., Crosby L., Roden R. B., Moroianu J. (2012) The high risk HPV16 L2 minor capsid protein has multiple transport signals that mediate its nucleocytoplasmic traffic. *Virology* 422, 2: 413–424.
- McBride A. A. (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Advances in Virus Research* 72: 155–205.
- McBride A. A. (2013) The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445, 1–2: 57–79.
- McBride A. A. (2017) Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry* 398, 8: 919–927.
- McLaughlin-Drubin M.E., Munger K., Caplan M.J. (ur.) (2014) Reference Module in Biomedical Research, Papillomaviruses. 3rd edition, Elsevier
- Modis Y., Trus B.L., Harrison S.C. (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO Journal* 21: 4754-4762.
- Moody C.A., Laimins L.A. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature* 10: 550–560.
- Munger K., Howley P.M. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research* 89: 213–228.
- Munger K., Basile J.R., Duensing S., Eichten A., Gonzalez S.L., Grace M., i suradnici (2002) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 protein. *Oncogene* 20: 7888–7898.
- Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J. (2003) Epidemiologic classification of human

- papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* 348: 518–527.
- Nicholl D.S.T. (2008) Chapter 7. The polymerase chain reaction U: Nicholl D.S.T. *An Introduction to Genetic Engineering (Third Edition)*, Cambridge University Press, New York. 116–131.
  - Platt A. R., Woodhall R. W., George A. L. (2007) Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43, 1: 58–62
  - Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. (1994) Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi* 33: 379–400.
  - Potočnik M., Kocjan B.J., Seme K., Luzar B., Babič D.Z., Poljak M. (2006) Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. *Journal of Medical Virology* 78:1673–1678.
  - PREMIER Biosoft. 2017. Net Primer. Palo Alto, PREMIER Biosoft. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/> (pristupljeno 20.05.2019.)
  - Presečki V. i suradnici. (ur.) (2002) *Virologija*. Medicinska naklada, Zagreb. 129–32.
  - Prestridge D. S. (1991) SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Computer Applications in the Biosciences* 7, 2: 203–206
  - Quint K. D., Genders R. E., de Koning M. N., Borgogna C., Gariglio M., Bouwes Bavinck J. N., Doorbar J., Feltkamp, M. C. (2014). Human *Beta-papillomavirus* infection and keratinocyte carcinomas. *The Journal of Pathology* 235(2): 342–354.
  - Rector A., Tachezy R., van Ranst M. (2004) A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of Virology* 78:4993–8.
  - Rector A., Van Ranst M. (2013) Animal papillomaviruses. *Virology* 445:213–23.
  - Rockett R., Barraclough K.A., Isbel N.M., Dudley K.J., Nissen M.D., Sloots T.P., Bialasiewicz S. (2015) Specific rolling circle amplification of low-copy human polyomaviruses BKV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, and STLPyV. *Journal of Virology Methods* 215–6:17–21.
  - 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., Munger K. (2013) The papillomavirus E7 proteins, *Virology* 445: 138–168.
- Schiffman M.H., Bauer H.M., Hoover R.N. i suradnici (1993) Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 85: 958–964.
- Schiller J.T., Lowy D.R. (2012) Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews-Microbiology* 10: 681–692.
- Schwarz E., Freese U.K., Gissman L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A., zur Hausen H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. *Nature* 7-13;314(6006):111-4.
- Shope R.E., Hurst E.W. (1933) Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on histopathology. *Journal of Experimental Medicine* 58: 607–624.
- Sichero L., Pierce Campbell C.M. (2013) Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. *Virology* 443: 214–7.
- Staheli J. P., Ryan J. T., Bruce A. G., Boyce R., Rose T. M. (2009) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) for the detection of novel viruses in non- human primates. *Methods* 49, 1: 32–41.
- Stanley M. A., Pett M. R., Coleman N. (2007) HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* 35: 1456–1460.
- Thomas M., Dasgupta J., Zhang Y., Chen X., Banks L. (2008) Analysis of specificity determinants in the interactions of different HPV E6 proteins with their PDZ domain containing substrates. *Virology* 376, 2: 371–378.
- Tommasino M. (2016) The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Research* 231: 128–138.
- Van Doorslaer K. (2013) Evolution of Papillomaviridae. *Virology* 445: 11–20.
- Van Doorslaer K., Li Z., Xirasagar S., Maes P., Kaminsky D., Liou D., Sun Q., Kaur R., Huyen Y., McBride A.A. (2017) The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Research* 45(D1):D499–D506.

- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ. (2002) Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International Journal of Cancer* 98: 590–5.
- Veković V., Živković Z., Veković B., Tomašević M. (2018) Primarna prevencija oboljenja izazvanih humanim papiloma virusom. *Preventivna Pedijatrija* 4 (1–2): 41–43.
- Zhou J., Doorbar J., Sun X. Y., Crawford L. V., McLean C. S., Frazer I. H. (1991) Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 185, 2: 625–632.
- 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 J., Schulte-Holthausen H., Wolf H., Dörries 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.
- zur Hausen H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 384: 260–265.
- Wang J.W., Roden R.B.S (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus, *Virology* 445: 175–186.
- WIBR. 2012. Primer3 v0.4.0. Cambridge, WIBR – Whitehead Institute for Biomedical Research. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (pristupljeno 20.05.2019)
- Yugawa T., Kiyono T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology* 19: 97–113.
- 2ZIP-Server. Berlin, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department Computational Molecular Biology. <http://2zip.molgen.mpg.de/index.html> (pristupljeno 03.05.2019)

## MREŽNE STRANICE

Web 1. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information_hr.pdf) (pristupljeno 22.08.2019)

Web 2. [https://pave.niaid.nih.gov/#search/search\\_database](https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database) (pristupljeno 03.05.2019)