

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**MOLEKULARNA OPREDELITEV, PREVALENCA IN
KLINIČNI POMEN NOVEGA PAPILOMAVIRUSA
GLODAVCEV, PHODOPUS SUNGORUS
PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 (PsuPV1),
OSAMLJENEGA PRI SIBIRSKIH HRČKIH
(*Phodopus sungorus*)**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND
CLINICAL RELEVANCE OF A NOVEL PHODOPUS
SUNGORUS PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 (PsuPV1)
INFECTING SIBERIAN HAMSTERS
(*Phodopus sungorus*)**

Nejc Bakovnik

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 578.2:616-006.5:57.083.2:599.323.51(043.2)

**MOLEKULARNA OPREDELITEV, PREVALENCA IN
KLINIČNI POMEN NOVEGA PAPILOMAVIRUSA
GLODAVCEV, PHODOPUS SUNGORUS PAPILLOMAVIRUS
TYPE 1 (PsuPV1), OSAMLJENEGA PRI SIBIRSKIH HRČKIH
(*Phodopus sungorus*)**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CLINICAL
RELEVANCE OF A NOVEL PHODOPUS SUNGORUS
PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 (PsuPV1) INFECTING SIBERIAN
HAMSTERS (*Phodopus sungorus*)**

Nejc Bakovnik

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom doc. dr. Joška Račnika, dr. vet. med. iz Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine, ptic, malih sesalcev in plazilcev Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in somentorstvom prof. dr. Maria Poljaka, dr. med. iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2016

POVZETEK

V sklopu raziskovalne naloge smo odkrili in molekularno ter filogenetsko opredelili prvi genotip PV, *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1), katerega naravnji gostitelj je sibirski hrček (*Phodopus sungorus*). Odkriti virus predstavlja šele drugi osamljen genotip PV v poddržini hrčkov. PsuPV1 je filogenetsko najbolj soroden MaPV1, ki lahko okuži zlate hrčke in je bil do osamitve PsuPV1 edini predstavnik vrste *Pi-1*. PsuPV1 nosi zapise za značilne PV-beljakovine z večino ohranjenih funkcionalnih domen, ki virusu omogočajo, da zaključi svoj življenjski krog in okuži nove gostiteljske celice. V sklopu raziskovalne naloge smo razvili in uvedli PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR (PsuPV1 RT-PCR), z analitično občutljivostjo vsaj 10 virusnih kopij/celico, in PsuPV1-značilno fluorescentno in-situ hibridizacijo (FISH). Z uporabo PsuPV1 RT-PCR smo prisotnost PsuPV1 dokazali v vseh tkivnih vzorcih, ki so bili odvzeti samici sibirskega hrčka z novotvorbo na maternici in na področju mlečne žleze, pri kateri smo odkrili nov genotip PV. Na podlagi negativnega rezultata PsuPV1-značilne FISH sklepamo, da PsuPV1 ni bil etiološko povezan z nastankom adenokarcinoma maternice in sprememb na področju mlečne žleze oz. je bil pri tej živali prisoten le v latentni, klinično neznačilni obliki oz. kot posledica kontaminacije s površine kože. V nadaljevanju smo PsuPV1, tako s PsuPV1 RT-PCR kot tudi s PsuPV1-značilno FISH, dokazali v vseh treh tkivnih vzorcih ploščatoceličnega karcinoma ustne votline, ki smo ga kirurško odstranili samcu sibirskega hrčka. Z uporabo PsuPV1 RT-PCR smo v nadaljevanju v zbirki vzorcev klinično normalne anogenitalne in ustne sluznice mladih živali iz dveh neodvisnih kolonij (n=110) in odraslih živali (n=4) dokazali, da PsuPV1 pogosto povzroča latentne, klinično neznačilne okužbe (102/114; 89,5 %). Prisotnost PsuPV1 smo dodatno dokazali v 6/9 (66,6 %) svežih tkivnih vzorcih odraslih živali, vključno s tumorji vagine, maternice, mlečne žleze in glave ter vratu. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da PsuPV1 pri gostitelju že zelo zgodaj v življenju povzroči klinično neznačilno okužbo anogenitalnega področja in ustne sluznice, in da je pri odraslih živalih za zdaj ta virus povezan le s posameznimi primeri ploščatoceličnega karcinoma ustne votline.

Ključne besede: Papilomavirus – patogenost – genetika – virologija; genom virusni; filogeneza; maternica, novotvorbe – analize; usta, novotvorbe – analize, verižna reakcija s polimerazo v ralnem času; genetske tehnike; hrčki; *Phodopus*

SUMMARY

In the present study we report the identification as well as the molecular and phylogenetic evaluation of the novel PV, *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1), naturally infecting Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). To the best of our knowledge, this is only the second PV type isolated from the subfamily of hamsters. PsuPV1 is phylogenetically most closely related to MaPV1, naturally infecting golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), which was up to the identification of PsuPV1 the only representative of the species *Pi-1*. Complete genomic characterization of PsuPV1 revealed that PsuPV1 encodes characteristic PV proteins with conserved functional domains, which are important for the viral life cycle and infection of host cells. Furthermore, a highly sensitive PsuPV1 type-specific quantitative RT-PCR (PsuPV1 RT-PCR) and PsuPV1-specific fluorescent in-situ hybridization (PsuPV1-specific FISH) were developed to determine the prevalence and clinical significance of PsuPV1. Using PsuPV1 RT-PCR, the virus was detected in all tissue samples obtained from the female Siberian hamster with neoplastic lesions of the uterus and the mammary gland, in which we initially identified the viral infection. However, based on negative PsuPV1-specific FISH we concluded that PsuPV1 was not etiologically associated with the development of the adenocarcinoma of the uterus and neoplastic changes of the mammary gland region and was causing latent infections of the animal. Additionally, using PsuPV1 RT-PCR and PsuPV1-specific FISH, viral presence and PsuPV1 integration into the host genome, respectively, were identified in all three tissue samples of the oral squamous cell carcinoma surgically removed from the male Siberian hamster. Moreover, PsuPV1 RT-PCR was additionally used to test the collection of clinically normal anogenital and oral mucosa swab samples of young Siberian hamsters from two independent colonies (n=110) and from four adult animals. Based on the high prevalence (102/114; 89.5 %) of PsuPV1 infections we concluded that PsuPV1 is associated with frequent latent infections of Siberian hamsters. Moreover, the presence of PsuPV1 was detected in 6/9 (66.6 %) fresh tissue samples (vaginal, uterine, mammary gland and head/neck tumors) of adult animals. Our results suggest that PsuPV1 can establish clinically unsignificant infections of the anogenital region and oral mucosa and is etiologically associated with sporadic cases of oral squamous cell carcinoma.

Key words: Papillomavirus – pathogenicity – genetics – virology; genome, viral; uterine neoplasms – analysis; mouth neoplasms – analysis; real-time polymerase chain reaction; genetic techniques; hamsters; *Phodopus*

KAZALO

POVZETEK	ii
SUMMARY	iii
KAZALO	iv
KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC	vi
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	viii
1 UVOD.....	1
1.1 Opredelitev problema	2
1.2 Namen raziskovalnega dela	2
1.3 Postavljene delovne hipoteze	3
2 TEORETIČNA IZHODIŠČA.....	4
2.1 Zgradba virusnega delca ter struktura in organizacija genoma papilomavirusov	5
2.2 Filogenetsko razvrščanje papilomavirusov	6
2.3 Razmnoževanje in patogeneza papilomavirusov	7
2.4 Povezava papilomavirusov s karcinogenezom	9
2.5 Papilomavirusi pri živalih in s PV-povezane spremembe	11
2.6 Papilomavirusi pri glodavcih	13
2.7 Sibirski hrček in pojavljanje spontanih neoplastičnih sprememb.....	14
2.8 Mikrobiološka diagnostika okužb s papilomavirusi	15
2.8.1 Molekularne metode za odkrivanje novih papilomavirusov	16
2.8.1.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času	16
2.8.1.2 Pomnoževanje po principu kotalečega se kroga (RCA).....	17
2.8.1.3 Sekveniranje naslednje generacije (NGS).....	18
2.8.2 Molekularne metode za opredeljevanje povezave med okužbo s PV in nastankom značilnih sprememb.....	19
3 MATERIALI IN METODE.....	21
3.1 Materiali	21
3.1.1 Tumorski vzorci.....	21
3.1.2 Brisi klinično normalne sluznice anogenitalnega predela in ustne votline	24
3.2 Metode	25
3.2.1 Osamitev celokupne DNA in preverjanje kakovosti osamljenih nukleinskih kislin	25

3.2.2	<i>Določanje vrste hrčka</i>	26
3.2.3	<i>Opredeljevanje prisotnosti virusne DNA</i>	27
3.2.4	<i>Pomnoževanje, določanje nukleotidnega zaporedja in kloniranje celotnega genoma virusa PsuPV1</i>	28
3.2.5	<i>Molekularna in filogenetska opredelitev genoma PsuPV1</i>	32
3.2.6	<i>PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR</i>	32
3.2.7	<i>Izračun virusnega bremena PsuPV1</i>	34
3.2.8	<i>Pi-PV skupinsko-značilen PCR oz. pan-Pi-PV PCR</i>	34
3.2.9	<i>PsuPV1-značilna fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)</i>	36
3.2.10	<i>Patohistološka preiskava tumorskih vzorcev</i>	37
3.2.11	<i>Statistična analiza podatkov</i>	38
4	REZULTATI	39
4.1	Določanje vrste hrčka	39
4.2	Pomnoževanje celotnega virusnega genoma PsuPV1	39
4.3	Molekularna opredelitev genoma PsuPV1 in podtipske različice PsuPV1	40
4.4	Filogenetska opredelitev genoma PsuPV1	42
4.5	Patohistološka preiskava tumorskih vzorcev, PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen-RT-PCR in PsuPV1-značilna fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)	45
4.6	Prevalenca PsuPV1 pri mladih in odraslih sibirskih hrčkih	47
5	RAZPRAVA	50
6	SKLEPI	56
7	ZAHVALE	58
8	LITERATURA	59
9	PRILOGE	70

KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Zgradba virusnega delca in struktura genoma PV; povzeto iz Medicinske virologije, 2011.....	5
Slika 2: Koilocitozno spremenjen epitelij anogenitalne bradavice (puščici) (Foto: Mario Poljak).....	8
Slika 3: Samica sibirskega hrčka v splošni plinski anesteziji. Ob prednji levi nogi vidimo dobro omejeno maso (Foto: IPPMP VFUL).....	21
Slika 4: Tvorba na maternici samice sibirskega hrčka (puščici) (Foto: IPPMP VFUL).	21
Slika 5: Tumor ob prednji levi nogi na področju mlečne žleze samice sibirskega hrčka (Foto: IPPMP VFUL).....	22
Slika 6: Samec sibirskega hrčka z oralno neoplazijo (Foto: IPPMP VFUL).....	22
Slika 7: Sibirski hrček s tumorjem v ustni votlini v splošni plinski anesteziji (levo) in kirurško odstranjevanje tumorja (desno) (Foto: IPPMP VFUL).....	23
Slika 8: Vzorčenje anogenitalne sluznice pri mladih hrčkih (Foto: IPPMP VFUL).	24
Slika 9: Izbira OZ za pan-Pi-PV PCR.....	35
Slika 10: Organizacija genoma PsuPV1 (povzeto po Van Doorslaer in sod., 2013).....	40
Slika 11: Palindromno vezavno mesto za E1 v nekodirajoči regiji LCR treh celotnih genomov PsuPV1, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, in posameznih genotipov PV iz drugih rodov (McBride, 2008)	41
Slika 12: Filogenetska uvrstitev virusa PsuPV1. Drevo največe verjetnosti zajema L1 nukleotidno zaporedje treh PsuPV1 izolatov, vseh PV glodavcev in 64 sorodnih HPV. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži bootstrap vrednosti.....	43
Slika 13: Ploščatocelični karcinom pri sibirskem hrčku z oralno neoplazijo (100× povečava) (Foto: Tanja Švara).	46
Slika 14: PsuPV1-značilna ISH (levo, črni puščici) in PsuPV1-značilna FISH (desno, bela puščica) v arhivskih tkivnih vzorcih oralne neoplazije sibirskega hrčka (Foto: Anton Hopman).	46
Slika 15: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v anogenitalnih brisih mladih sibirskih hrčkov iz prve kolonije.	47
Slika 16: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v anogenitalnih in oralnih brisih mladih sibirskih hrčkov iz druge kolonije.....	48

Slika 17: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v svežih tkivnih vzorcih odraslih sibirskih hrčkov. 49

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje celotnega virusnega genoma potencialno novega genotipa PV.....	29
Preglednica 2: Oligonukleotidni začetniki za določanje celotnega nukleotidnega zaporedja virusa PsuPV1.....	31
Preglednica 3: Oligonukleotidna začetnika za pomnoževanje dela gena L1 PsuPV1.....	32
Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki za pan-Pi-PV PCR.....	34
Preglednica 5: Deleži podobnosti med posameznimi geni (beljakovinami) PsuPV1 in geni (beljakovinami) filogenetsko najbolj sorodnih genotipov MaPV1 in AsPV1.....	44
Preglednica 6: Klinične in patohistološke značilnosti tumorjev ter rezultati PsuPV1 RT-PCR in PsuPV1-značilne FISH.	45
Preglednica 7: Rezultati PsuPV1 RT-PCR v svežih tkivnih vzorcih.....	49

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

IPPMP VFUL	Inštitut za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani
PV	papilomavirus; angl. <i>papillomavirus</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina; angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
PsuPV1	Phodopus sungorus papillomavirus type 1
HPV	človeški papillomavirus; angl. <i>human papillomavirus</i>
ORF	odprt bralni okvir; angl. <i>open reading frame</i>
LCR	nekodirajoče področje; angl. <i>long control region</i>
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov; angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
NLS	jedrni lokalizacijski signal; angl. <i>nuclear localization signal</i>
NES	jedrni eksportni signal; angl. <i>nuclear export signal</i>
bp	bazni par
kb	kilobazni par
ddH ₂ O	demineralizirana in deionizirana sterilna voda
nt	nukleotid
PCR	verižna reakcija s polimerazo; angl. <i>polymerase chain reaction</i>
RCA	pomnoževanje po principu kotalečega se kroga; angl. <i>rolling circle amplification</i>
NGS	sekveniranje naslednje generacije; angl. <i>next generation sequencing</i>
FFPE	arhivski tkivni vzorci, ki so fiksirani s formalinom in vklopljeni v parafin; angl. <i>formalin fixed, paraffin embedded</i>
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
ak	aminokislina

1 UVOD

Papilomavirusi (PV) predstavljajo veliko in izjemno raznoliko skupino majhnih DNA virusov brez zunanje ovojnice (angl. *non-enveloped*) iz družine *Papillomaviridae*, ki se pogosto pojavljajo pri večini vretenčarjev in so etiološko povezani z nastankom različnih benignih in malignih neoplastičnih sprememb kožnega in sluzničnega epitelija. Do sedaj je bilo odkritih več kot 340 različnih genotipov PV; večino (n=206) odkritih PV predstavljajo genotipi, ki povzročajo okužbe pri ljudeh (človeški papilomavirusi; HPV) (Van Doorslaer in sod., 2013; Kocjan in sod., 2015). V skladu z razvojem sodobnih molekularnih metod je število novo-odkritih genotipov PV v zadnjih letih začelo naraščati - odkriti so bili tudi številni genotipi PV, ki povzročajo okužbe pri živalih, vključno z genotipi PV, ki povzročajo okužbe živali iz reda glodavcev (*Rodentia*). Slednji se razvrščajo v štiri različne rodove PV (*Iota-PV*, *Pi-PV* in *Sigma-PV* ter v pred kratkim opisan rod *Dyosigma-PV*); zaenkrat je največji rod *Pi-PV* s šestimi predstavniki glodavčjih PV (Rector in Van Ranst, 2013).

Glodavci so bili kot model uporabljeni v mnogih raziskavah v zvezi s preučevanjem PV okužb in nastankom neoplastičnih sprememb (Peh in sod., 2002). Šele nedavno je bil odkrit prvi PV pri laboratorijskih miših (*Mus musculus* papillomavirus type 1; MmuPV1) (Joh in sod., 2011), kar je olajšalo nadaljnje raziskovanje tovrstnih okužb. Kljub temu znanstvenikom do danes ni uspelo osamiti PV na celični kulturi, saj se virus razmnožuje le v popolnoma dozorelih celicah (Grissmann, 2006). V številnih raziskavah o virusni patogenezi, virusnem razmnoževanju v tarčnih epitelijskih celicah in vlogi virusnih beljakovin pri nastanku novotvorb so kot živalske modele uporabili tudi hrčke (Iwasaki in sod., 1997; Peh in sod., 2002). Hrčki so glodavci, ki s 25 različnimi vrstami pripadajo poddružini *Cricetinae* in se razvrščajo v preko sedem različnih rodov. Poleg laboratorijskih živalih pa hrčki danes predstavljajo tudi eno izmed bolj priljubljenih ljubiteljskih živali, med katere sodijo zlasti sirijski oz. zlati hrčki (*Mesocricetus auratus*), ruski pritlikavi hrčki (*Phodopus campbelli*) ter sibirski hrčki (*Phodopus sungorus*). Sirijski oz. zlati hrček je bil do sedaj edini predstavnik svoje poddružine, pri katerem je bila dokazana okužba s PV (Iwasaki in sod., 1997).

1.1 Opredelitev problema

Večino odkritih genotipov PV predstavljajo HPV, saj je večina raziskav omejenih na opredeljevanje etioloških povzočitelj neoplastičnih sprememb pri ljudeh. Kljub temu ne gre zanemariti dejstva, da so, podobno kot človek, tudi druge vrste, vključno z živalmi iz reda glodavcev, nosilci svojega seta vrstno-značilnih genotipov PV in predstavljajo veliko ekološko nišo pri odkrivanju novih PV. Odkrivanje novih genotipov PV pomembno prispeva k poznavanju genetske raznolikosti PV, raziskovanju patogeneze PV in razvoju novih diagnostičnih testov (Rector in Van Ranst, 2013).

1.2 Namen raziskovalnega dela

Namen raziskovalnega dela je bilo v celoti opredeliti genom prvega genotipa PV, *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1), ki okužuje sibirske hrčke, ter znotraj posameznih genov/beljakovin in nekodirajočega genomskega območja določiti pomembne funkcionalne domene. Sledila je filogenetska uvrstitev PsuPV1 med že odkrite genotipe PV. V nadaljevanju se je razvila in uvedla tipsko-značilno verižno reakcija s polimerazo v realnem času (PsuPV1-RT-PCR), s katero se je testiralo reprezentativno zbirko kliničnih vzorcev, sestavljeno iz brisov sluznice anogenitalnega področja in ustne votline klinično zdravih ter vzorce različnih sprememb/tumorjev obolelih sibirskih hrčkov. Na podlagi testiranja reprezentativne zbirke kliničnih vzorcev se je določila pojavnost PsuPV1 v skupini mladih živalih ter tkivni tropizem virusa. S pomočjo novo-razvite PsuPV1-značilne fluorescentne in-situ hibridizacije se je opredelil klinični pomen PsuPV1 pri nastanku anogenitalnih sprememb in sprememb ustne votline sibirskih hrčkov. V nadaljevanju se je na podlagi pridobljenih celotnih genomskeh zaporedij dodatnih izolatov PsuPV1 opredelila genetsko raznolikost virusa.

1.3 Postavljenе delovne hipoteze

- *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1) ima vse molekularne značilnosti papilomavirusov. PsuPV1 se filogenetsko uvrsti v rod *Pipapillomavirus*.
- Okužbe s PsuPV1 so pri sibirskih hrčkih pogoste. Virus izkazuje sluznični tkivni tropizem.
- Okužba s PsuPV1 pri sibirskih hrčkih lahko vodi do nastanka tumorjev.
- Obstaja več genomskeh (podtipskih) različic PsuPV1.

2 TEORETIČNA IZHODIŠČA

Prva odkritja različnih vrst bradavic in sum na spolno prenosljive anogenitalne bradavice pri ljudeh segajo že v grško-rimske čase, medtem ko je bila virusna etiologija prvič predstavljena leta 1907 z uspešnim poskusom prenosa bradavic na človeka z aplikacijo neceličnih tkivnih ekstraktov. Kunčje kožne bradavice so zaradi povezave s kunčjimi PV in njihovim domnevnim sodelovanjem pri maligni preobrazbi celic leta 1930 predstavljale prvi model preučevanja virusne karcinogeneze pri sesalcih (Grissmann, 2006).

Vloga HPV pri nastanku neoplastičnih sprememb je nato dolgo ostala neraziskana, predvsem zaradi pomanjkanja tkivnih kultur, ki bi omogočale nadaljnje raziskave viusne patogeneze. Šele z razvojem novih tehnik v poznih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je prišlo do odkritja večjega števila HPV, ki so jih povezali z veliko klinično raznolikostjo neoplastičnih sprememb. Opredelitev neposredne vloge genotipa HPV5 pri nastanku raka kože v povezavi z redko prirojeno boleznijo imenovano bradavičasta epidermodisplazija (*Epidermodysplasia verruciformis*)¹ velja za prvi molekularni dokaz neposredne vloge PV pri nastanku neoplastičnih kožnih sprememb (Grissmann, 2006). V začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja je bila dokazana etiološka povezava med okužbo s HPV in nastankom raka materničnega vratu, prof. dr. Harald zur Hausen pa je za svoje odkritje prejel tudi Nobelovo nagrado s področja fiziologije in medicine.

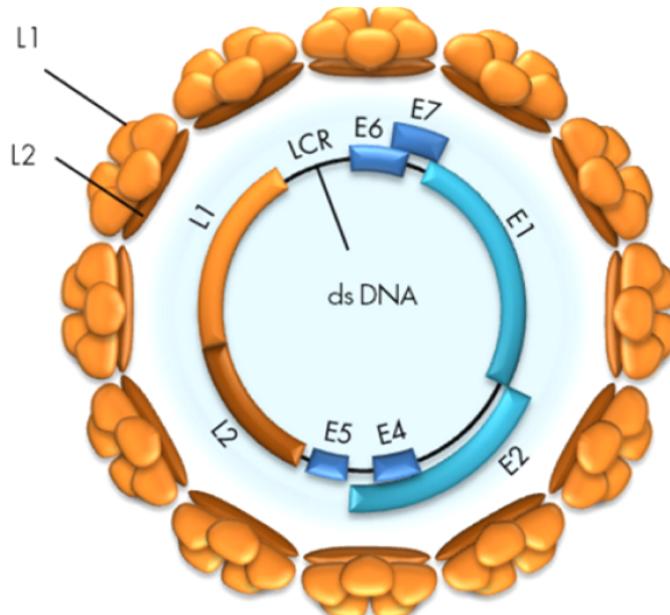
Poleg omenjenih bradavic in raka materničnega vratu, lahko določeni genotipi HPV povzročajo tudi novotvorbe vagine, vulve, anusa, penisa ter različne tumorje jezika, grla in tonzil (Cubie, 2013). Kljub temu da večina okužb s PV poteka klinično neznačilno, lahko genotipi PV povzročajo tudi podoben spekter benignih in malignih sprememb pri mnogih vrstah živali.

¹ Bradavičasta epidermodisplazija je redka, avtosomalno recesivna dedna bolezen kože predsvem imunsko oslabljenih posameznikov, za katero je značilno množično pojavljanje bradavicam podobnih lezij, ki jih povzročajo HPV, kjerkoli po telesu. Glavno skrb bolnikom povzroča predvsem možnost transformacije bradavicam podobnih lezij v rak kože (Orth, 2006).

2.1 Zgradba virusnega delca ter struktura in organizacija genoma papilomavirusov

PV gradi majhna (52 – 55 nm v premeru), ikozaedrično oblikovana kapsida brez zunanje ovojnica, ki je sestavljena iz 72 pentamernih kapsomer. Njihov genom predstavlja dvojnoverižna, kovalentno zaprta, krožna molekula DNA, velikosti 6,8 – 8,4 kilobaznih parov (kb) in molekulsko maso $5,4 \times 10^6$ Da. Virusna DNA je povezana s celičnimi histoni in z njimi tvori kromatinu podobno strukturo. Virusne genetske informacije se nahajajo samo na eni verigi DNA, ki ponavadi vsebuje osem odprtih bralnih okvirjev (ORF, angl. *open reading frame*) (Pfister in Fuchs, 1994).

Virusni genom je razdeljen na tri glavna področja: (i) nekodirajoče področje (LCR, angl. *long control region*), ki vsebuje zaporedja DNA, ki so pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepisovanja virusnega genoma (Bernard, 2013) ter (ii) zgodnje (E, angl. *early*) in (iii) pozno (L, angl. *late*) kodirajoče področje (Slika 1).



Slika 1: Zgradba virusnega delca in struktura genoma PV; povzeto iz Medicinske virologije, 2011.

Figure 1: Papillomavirus structure and genome organization; adopted from Medicinska virologija, 2011.

Zgodnji virusni geni ponavadi nosijo zapis za pet različnih virusnih beljakovin: beljakovini E1 in E2 sta odgovorni za podvojevanje in uravnavanje prepisovanja virusnega genoma; beljakovina E4 je izražena v pozrem obdobju virusnega življenjskega cikla in ima vlogo

rušilca celičnega citoskeleta (Wilson in sod., 2005); beljakovini E6 in E7 preko interakcij s celičnimi beljakovinami uravnavata celični cikel gostiteljske celice. Pozno kodirajoče področje nosi zapis za dve strukturni beljakovini virusne kapside, in sicer za veliko plaščno beljakovino L1, z molekulsko maso 54 kDa, ki tvori 80 – 90 % vseh beljakovin virusnega plašča in malo plaščno beljakovino L2, z molekulsko maso 74 – 80 kDa ter z vlogo pri prenosu virusne DNA in pri vključitvi virusnega genoma v kapsido (Zheng in Baker, 2006; Bernard, 2013). Gen za majhno hidrofobno beljakovino E5 s transformirajočimi lastnostmi, ki najverjetneje sodeluje v začetni stopnji maligne preobrazbe celic imajo samo nekateri genotipi PV iz rodov *Alpha-* in *Delta-PV* (Venuti in sod., 2011).

Čeprav imajo genetsko raznoliki PV izredno visoko ohranjeno strukturo virusnega genoma, so tekom raziskav živalskih PV dokazali, da je samo prisotnost beljakovin E1, E2, L1 in L2 moč dokazati v prav vseh do sedaj opredeljenih PV živali (Rector in Van Ranst, 2013).

2.2 Filogenetsko razvrščanje papilomavirusov

Pred letom 2005 smo PV skupaj s poliomavirusi uvrščali v skupno virusno družino *Papovaviridae*, po predlogu ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) leta 2005 pa PV sestavlja lastno družino *Papillomaviridae*.

S pojavom novih sodobnih molekularnih metod in povezanim porastom novo-odkritih PV, je bila posodobljena tudi taksonomska razvrstitev, po kateri danes PV na podlagi skladnosti nukleotidnega zaporedja visoko ohranjenega gena L1 taksonomsko uvrščamo v robove (označene z grškimi črkami), vrste in genotipe (označene z imenom gostitelja in zaporedno številko osamitve) (de Villiers in sod., 2004). Skladnost nukleotidnih zaporedij gena L1 med posameznimi rodovi PV je manjša od 60 %. Virusne vrste znotraj posameznega rodu izkazujejo 60 - 70 % skladnost nukleotidnih zaporedij gena L1, medtem ko različni genotipi v posamezni vrsti izkazujejo 71 - 89 % skladnost nukleotidnega zaporedja gena L1. Za virusne podtipe je značilna 90 – 98 % skladnost nukleotidnega zaporedja gena L1, posamezne podtipske različice pa se med seboj razlikujejo v največ 2 % celotnega nukleotidnega zaporedja (de Villiers in sod., 2004). Genotipi PV predstavljajo osnovno taksonomsko enoto razvrščanja PV, saj so različni genotipi etiološko dokazano povezani z nastankom različnih bolezni pri človeku. Do sedaj je bilo odkritih, genetsko opredeljenih in uradno priznanih 345 genotipov PV, ki jih uvrščamo v 48 rodov; od tega 206 trenutno opredeljenih genotipov HPV

uvrščamo v pet rodov: *Alpha-* *Beta*, *Gamma*-, *Mu*- in *Nu*-PV. Večino novo-odkritih genotipov HPV taksonomsko uvrščamo v rod *Gamma*-PV, ki predstavlja največji rod PV z 81 genotipi HPV, sledita mu rodova *Alpha*-PV s 65 genotipi in *Beta*-PV z 52 genotipi HPV (Van Doorslaer in sod., 2013; Kocjan in sod., 2015). Približno 40 genotipov HPV iz rodu *Alpha*-PV s tropizmom za epitel sluznic glede na vrsto novotvorb, ki jih povzročajo, delimo na visokorizične (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 in 59) in nizkorizične genotipe HPV (najpomembnejša sta HPV6 in 11) (Bouvard in sod., 2009). Trenutno je uradno opredeljenih 139 genotipov PV, ki povzročajo okužbe pri 68 različnih živalskih vrstah, vključno s sesalci, pticami, želvami in kačami (Rector in Van Ranst, 2013; Van Doorslaer in sod. 2013).

Odkrivanje novih genotipov HPV spremljajo v Mednarodnem referenčnem centru za HPV (angl. *International Human Papillomavirus Reference Center*) na Karolinska Institutet v Stockholm na Švedskem, kjer določajo zaporedne številke novo opredeljenih genotipov. Z odkrivanjem novih živalskih PV lahko v prihodnosti pričakujemo tudi vzpostavitev mednarodnega referenčnega centra živalskih PV, kjer bi bili shranjeni vsi referenčni kloni, ki bi bili na voljo celotni raziskovalni skupnosti.

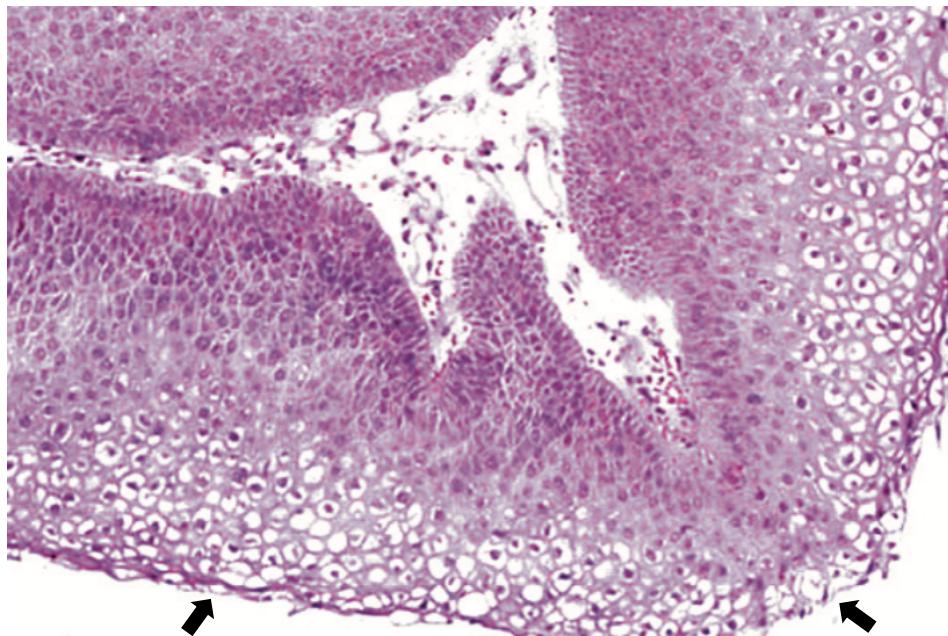
2.3 Razmnoževanje in patogeneza papilomavirusov

Papilomavirusi so heterogena skupina virusov, ki lahko povzročajo okužbe pri širokem spektru gostiteljev in jih povezujemo s številnimi boleznimi, od različnih benignih bradavic do malignih karcinomov, prav tako pa lahko povzročajo dolgotrajne, latentne oz. klinično neznačilne okužbe.

Začetno mesto okužbe, preko mikroabrazij in poškodb, predstavljajo bazalne celice ploščatoceličnega epitelija. PV v celice vstopijo s pomočjo vezave na proteoglikanska celična receptorja heparan sulfat in $\alpha 6:\beta 4$ integrin (Evander in sod., 1997). V bazalnih celicah poteka razmnoževanje virusov, ki je odvisno od genotipa PV in prisotnosti regulatornih virusnih beljakovin ter stopnje diferenciacije epitelijskih celic in imunskega odziva gostitelja. Bolj kot so bazalne celice zrele, večja je tudi sposobnost razmnoževanja virusa v njih, novonastali virioni pa se sproščajo samo iz popolnoma dozorelih celic. Virusna DNA se v okuženih celicah nahaja v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev ali episomov; latentno okuženih

celic histološko ne moremo ločiti od zdravih. Na začetku virusnega pomnoževanja se virusni genom deli premo sorazmerno z delitvijo okuženih celic (Schneider, 1994; Peh in sod., 2002), zgodnji virusni beljakovini (E6 in E7) pa vzpodbujata bazalne epitelijske celice k pospešenemu razmnoževanju. Virusni genom se začne pospešeno podvojevati ob zorjenju bazalnih celic v spinozne celice oz. ob ustavitevi celičnega cikla, saj od takrat naprej pomnoževanje virusne DNA poteka po principu kotalečega se kroga. Z aktivacijo promotorjev poznih genov (L1 in L2) v povezavi s celičnimi dejavniki prepisovanja pride do sinteze velike in male plaščne beljakovine in izgradnje virionov. Novonastali virusni delci se iz okuženih celic sproščajo s celično lizo in so sposobni okužiti sosednje celice (Campo, 2002).

Pomnoževanje PV je tesno povezano s proliferacijo epidermalnega sloja kože in se lahko kaže v obliki akantoze (hiperplazija spinognega sloja), parakeratoze (prisotnost celičnih jader v roženem sloju), hiperkeratoze (zadebeljenem roženem sloju) ter papilomatoze (valovito spremenjen epitelij) (Longworth in Laimins, 2004). Značilno morfološko spremenjene epitelijske celice, ki nastanejo zaradi intenzivnega razmnoževanja PV v spinognem in granulognem sloju epidermisa in za katere so tipična skrčena hiperkromna jedra različnih oblik in perinuklearni halo efekt, se imenujejo koilociti (zur Hausen, 1996) (Slika 2).



Slika 2: Koilocitozno spremenjen epitelij anogenitalne bradavice (puščici) (Foto: Mario Poljak).

Figure 2: Koilocytotic changes in the epithelium of an anogenital wart (arrows).

Pri nastanku fibropapilomov, značilnih predvsem za govedo, prihaja tudi do proliferacije fibroblastov v usnjici kože, vendar v njih ne poteka izražanje poznih virusnih genov in podvojevanje virusnega genoma (Sanders in Stenlund, 2001).

2.4 Povezava papilomavirusov s karcinogenezo

Največ raziskav vloge PV pri maligni preobrazbi okuženih celic je osredotočenih na okužbe z visokorizičnimi HPV. V skladu z modelom karcinogeneze, ki temelji na primeru raka materničnega vratu, maligna preobrazba celic poteka preko treh stopenj (zur Hausen, 1996). V prvi stopnji pride do okužbe tarčnih celic s HPV. Ob dolgotrajni okužbi z visokorizičnimi HPV sledi druga stopnja pri kateri pride do vključevanja virusne DNA v človeški genom. V tretji stopnji maligne preobrazbe celic poleg virusov sodelujejo tudi različni kemični in fizikalni dejavniki, ki s svojim delovanjem vzpodbujujo nastanek točkastih mutacij v celičnem genomu in vzpodbudijo s HPV-okužene celice k nesmrtnosti in k maligni preobrazbi (zur Hausen, 1996).

Fizikalno stanje virusne DNA se v posameznih tipih neoplazij razlikuje. Pri benignih tumorjih in intraepitelijskih novotvorbah nižje stopnje se virusni dedni zapis nahaja v episomalni obliki, pri malignih neoplazijah pa je virusni genom vključen v genom gostiteljske celice. Virusna DNA se z namenom vključitve v celični genom ponavadi prekine v genu E2, ki je pomemben negativni regulator izražanja genov E6 in E7. S povečanim izražanjem genov E6 in E7 pride do kopiranja virusnih beljakovin E6 in E7 in njune vezave na številne celične beljakovine, od katerih sta najpomembnejši tumor-zavirajoči beljakovini p53 in pRb. Beljakovini E6 in E7 z vezavo na p53 in pRb omenjeni celični beljakovini razgradita, kar vodi v neprekinjeno razmnoževanje okuženih epitelnih celic in kopiranje sekundarnih mutacij (zur Hausen, 2002; Duensing in Munger, 2004).

Virusna beljakovina E6 se v gostiteljskih celicah s p53 in celično ubikvitinsko ligazo E6AP poveže v tridelni kompleks, kar vodi v hitro razgradnjo p53 s proteasomi. Z inaktivacijo celične beljakovine p53 celice nenadzorovano prehajajo iz faze G1 v fazo S in se nenadzorovano delijo (Munger in sod., 2001). Virusna beljakovina E7 ima sposobnost kompetitivne vezave s celično beljakovino pRb in sorodnima beljakovinama p107 in p130. Pri vezavi E7 na pRb pride do proteolitske razgradnje celične beljakovine po ubikvitinski poti s pomočjo ribosoma 26S. Za razliko od proteolize p53 je proces razgradnje in inhibicije pRb

odvisen od količine vezane virusne beljakovine E7. Z inaktivacijo beljakovine pRb je v gostiteljski celici motena njena vloga represorja dejavnikov prepisovanja E2F, ki s svojim prekomernim izražanjem vplivajo na nadaljevanje celičnega cikla neodvisno od ciklina odvisnih kinaz in tako celičnim popravljalnim mehanizmom omejijo možnost preverjanja in popravljanja okvarjenih odsekov DNA (Loignon in Drobetsky, 2002; Munoz in sod., 2003).

Odsotnost delovanja tumor-zavirajočih beljakovin p53 in pRb v celici tako omogoča škodljivo delovanje različnih karcinogenih dejavnikov v tretji stopnji razvoja novotvorb in povzroča nekontrolirano delitev celic s poškodovano DNA. Rezultat je povečano število mutacij in maligna preobrazba s HPV-okuženih celic. Kljub temu do pojava malignih tumorjev pride redko, presledek med okužbo in nastankom malignih sprememb pa je ponavadi dolg in odvisen tudi od sinergističnih rakotvornih dejavnikov.

Nizkorizične HPV povezujemo predvsem z nastankom anogenitalnih bradavic in papilomov grla (Fujs Komloš in sod., 2012; Cubie, 2013), v posameznih primerih pa lahko okužba s HPV6 in HPV11 vodi tudi do maligne preobrazbe okuženih celic in nastanka raka analnega kanala, penisa in vulve (Insinga in sod., 2008; Miralles-Guri in sod., 2009; Cornall in sod., 2013). V nasprotju z visokorizičnimi HPV je zaenkrat malo podatkov o modelu karcinogeneze, ki sledi okužbi z nizkorizičnimi HPV. Na podlagi enega primera HPV6-pozitivnega raka grla in dveh primerov HPV11-pozitivnega sinonazalnega karcinoma so dokazali, da lahko nizkorizični HPV maligno preobrazbo celic povzročijo z insercijsko inaktivacijo posameznih človeških onkogenov (npr. AKR1C3) (Huebbers in sod., 2013) ali področij, ki nosijo zapis za majhne uravnalne molekule RNA (Scheel in sod., 2015). Zaenkrat še ni znano, ali je model karcinogeneze, ki sledi okužbi z živalskimi PV, bolj podoben modelu visokorizičnih HPV ali modelu nizkorizičnih HPV, kljub temu pa lahko molekularni model karcinogeneze visokorizičnih *Alpha*-PV z določenimi odstopanjimi upoštevamo tudi pri razvoju neoplazij pri živalih (Campo, 2002).

2.5 Papilomavirusi pri živalih in s PV-povezane spremembe

Trenutno je uradno opredeljenih 139 genotipov PV, ki povzročajo okužbe pri 68 različnih živalskih vrstah, vključno s sesalci, pticami, želvami in kačami (Rector in Van Ranst, 2013; Van Doorslaer in sod. 2013), ter se razvrščajo v 48 virusnih rodov, nekateri pa predstavljajo nove, še neimenovane in nerazvrščene rodove PV. Ker pri dvoživkah zaenkrat še niso dokazali okužbe s PV, predvidevajo, da so PV omejeni samo na amniotske vrste živali (Benton in Donoghue, 2007). Znotraj bolj intenzivno preučevanih vrst vretenčarjev, kot so opice makaki, domače govedo in psi, je bilo odkritih več različnih genotipov PV (*Macaca fascicularis* papillomavirus types 1-11; *MfPV1-11*, *Bos taurus* papillomavirus types 1-13; *BPV1-13*, *Canis familiaris* papillomavirus types 1-20; *CPV1-20*). Slednje nakazuje na to, da so lahko tudi nehumanji vretenčarji nosilci svojega seta vrstno-značilnih genotipov PV (Rector in Van Ranst, 2013).

Kljub temu, da so PV visoko vrstno značilni, je občasno s tesnim kožno-služničnim stikom mogoč tudi medvrstni prenos virusov pri genetsko sorodnih živalskih vrstah. Nekateri PV (npr. BPV1) so poleg okužbe epitelija sposobni neproduktivno okužiti tudi nižje ležeče fibroblaste, kar vodi v nastanek fibromov oz. fibropapilomov. Zaradi te lasnosti imajo omenjeni PV širši spekter gostiteljev in so zmožni transformacije in nevegetativnega pomnoževanja tudi v celicah drugih živalskih vrst. BPV1 tako lahko povzroča sarkoide pri konjih in obenem transformira celice glodavcev (Morgan in Campo, 2000).

PV so epiteliotropni virusi, ki se razmnožujejo v epitelijskih celicah kože ali sluznice. Čeprav večina okužb s PV poteka asimptomatsko, so nekateri PV povezani z nastankom benignih ali malignih novotvorb. HPV etiološko povezujemo z nastankom raka materničnega vratu, hkrati pa tudi z nastankom deleža ostalih rakov anogenitalnega področja, predela glave in vratu ter kože, in z nastankom različnih benignih sprememb, od katerih so najpomembnejše anogenitalne in kožne bradavice ter papilomi grla (Cubie, 2013). Podobno je bilo mnogo benignih epitelijskih neoplazij, etiološko povezanih z okužbo s PV (npr. kožne bradavice in fibropapilomi, papilomi ustne votline ter anogenitalne bradavice), odkritih tudi pri številnih vrstah živali, vključno z zlatim hrčkom (Rector in Van Ranst, 2013). Prav tako lahko PV pri nekaterih vrstah živali (netopirjih, mačkah, psih, konjih, glodavcih, kuncih in ovcah) povzročajo maligne neoplastične lezije na koži (področje glave, prhuti, uhljev in genitalij) ter oralni in anogenitalni sluznici (Rector in Van Ranst, 2013; Garcia-Perez in sod., 2014).

Največ raziskav je bilo izvedenih na PV, ki okužijo govedo (predvsem genotipa BPV1 in BPV4²), belorepe kunce (*Sylvilagus floridanus* papillomavirus type 1, SfPV1), pse (CPV1-20) in opice *Rhesus* (*Macaca mulata* papillomavirus type 1, MmPV1).

BPV1 pri govedu povzroča kožne fibropapilome in se pogosto prenaša preko direktnega stika s poškodovano kožo med posameznimi živalmi v okuženih rejah. BPV1 pripada nenavadnemu razredu PV s širšim spektrom gostiteljev in sposobnostjo tvorbe fibropapilomov pri vseh predstavnikih iz naddružine kopitarjev (Chen in sod., 1982). Omenjeni virus lahko naravno okuži konje (povzroča nastanek sarkoidov), spodbuja nastanek novotvorb pri različnih vrstah hrčkov ter je sposoben morfološke transformacije mišjih fibroblastov v kulturi. BPV1 predstavlja prvi molekularni prototip za preučevanje vloge virusov v procesu transformacije celic, za preučevanje podvojevanja virusne DNA in uravnavanja prepisovanja virusnih genov (Morgan in Campo, 2000).

SfPV1 lahko povzroča okužbe kožnega epitelija belorepih in nekaterih drugih vrst kuncev. Odvisno od imunskega odziva gostitelja lahko s SfPV1-povzročeni papilomi spontano izginejo ali pa se ohranijo daljše časovno obdobje. Perzistentni papilomi lahko napredujejo v karcinome tako pri domačih kot tudi pri divjih kuncih (Giri in sod., 1985). Na podlagi preučevanja SfPV1 je bil postavljen prvi model vloge virusnih beljakovin pri maligni transformaciji gostiteljskih celic, poleg tega pa je bil virus uporabljen tudi za izdelavo prvega preventivnega in terapevtskega cepiva proti PV (Han in sod., 1998).

CPV1 pri psih spodbuja nastanek papilomov ustne sluznice, ki ob aktivaciji imunskega odziva ponavadi spontano izginejo. Virus predstavlja dober model pri preučevanju sluzničnih okužb, v raziskavah imunskega odziva gostitelja na okužbe s PV in pri razvoju cepiv (Lange in sod., 2013).

MmPV1 so osamili iz ploščatoceličnega karcinoma penisa opice *Rhesus* in ga povezujejo z genitalnimi spolno prenosljivimi boleznimi primatov. Patogeneza z MmPV1-povzročenih bolezni je zelo podobna okužbam s HPVs, saj je virus filogenetsko soroden visokorizičnim

² Virus BPV4 pri govedu povzroča nastanek benignih papilomov prebavnega trakta. V določenih predelih Škotske, kjer se govedo pase na področjih z rastjo praproti, lahko ti papilomi hitro napredujejo v maligne karcinome, saj tamkajšnja praproto vsebuje flavenoid imenovan kvercentin, ki deluje kot ko-karcinogen in promotor maligne transformacije papilomov (O'Brien in Campo, 1998).

genotipom HPV, ki jih povezujemo z nastankom raka materničnega vratu (Joh in sod., 2009; Chen in sod., 2009).

2.6 Papilomavirusi pri glodavcih

Papilomaviruse, ki jih povezujemo z okužbami živali iz reda glodavcev, uvrščamo v štiri različne robove: *Iota*-PV, *Pi*-PV in *Sigma*-PV ter v pred kratkim opisan rod *Dyosigma*-PV. Od slednjih je trenutno največji rod *Pi*-PV, v katerem je šest predstavnikov PV, in sicer MmuPV1 (*Mus musculus* papillomavirus type 1), AsPV1 (*Apodemus sylvaticus* papillomavirus type 1), McPV2 (*Mastomys coucha* papillomavirus type 2), MmiPV1 (*Micromys minutus* papillomavirus type 1), RnPV1 (*Rattus norvegicus* papillomavirus type 1) in MaPV1 (*Mesocricetus auratus* papillomavirus type 1) (Rector in Van Ranst, 2013; Van Doorslaer in sod., 2013; Rogovskyy in sod., 2014).

MmuPV1 je bil osamljen iz tkivnega vzorca obraznih papilomov gole laboratorijske miši (sev, NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}), vzrejene iz serije hišnih miši (*Mus musculus*) (Joh in sod., 2011). AsPV1 je bil osamljen iz klinično zdrave kože ušes gozdne miši (*Apodemus sylvaticus*) (Schultz in sod., 2012), medtem ko je bil McPV2 osamljen iz anogenitalnih bradavic in številnih klinično zdravih tkiv (npr. jeter, ledvic, vranice in črevesja) mnogosesne miši (*Mastomys coucha*) (Nafz in sod., 2008). MmiPV1 je bil osamljen iz papilomatozno spremenjene kožne lezije pritlikave miši (*Micromys minutus*), RnPV1 pa iz ustne votline zdrave prostoziveče sive podgane (*Rattus norvegicus*) (Schulz in sod., 2009).

Prvi PV (MaPV1), odkrit pri hrčkih, je bil osamljen iz tkivnega vzorca papiloma jezika odraslega sirijskega oz. zlatega hrčka (*Mesocricetus auratus*), ki so najbolj razširjena in preučevana vrsta ljubiteljskih hrčkov. Novotvorba na sluznici jezika živali je bila inducirana z aplikacijo 9,10-dimetil-1,2-benzantracena (DMBA) in dodatno ekszizijsko travmatizacijo. Iz koilocitno spremenjene lezije, značilne za okužbo s PV, so pridobili celotno nukleotidno zaporedje (velikosti 7.647 bp) novega virusa, ki je pripadal novi vrsti PV (Iwasaki in sod., 1997). MaPV1 je z našega stališča zanimiv predvsem zato, ker je najblžje soroden novo-odkritemu virusu PsuPV1 pri sibirskih hrčkih (*Phodopus sungorus*).³

³ Eden od razlogov za podobnost med virusoma je visoka genetska sorodnost med živalskima vrstama (Miedel in Hankenson, 2015).

2.7 Sibirski hrček in pojavljanje spontanih neoplastičnih sprememb

Druga skupina hrčkov, ki jih pogosto najdemo v ujetništvu, so hrčki iz rodu *Phodopus*, v katero spadajo sibirski (*P. sungorus*), ruski pritlikavi (*Phodopus campbelli*) in roborovski hrček (*Phodopus roborovskii*). Med omenjenimi vrstami sta si v najbližjem medsebojnem sorodstvu predvsem sibirski in ruski pritlikavi hrček, ki se zelo težko ločita zgolj po morfoloških značilnostih. Ena od pomembnejših fenotipskih razlik med vrstama je odsotnost spremembe obarvanja kožuha v odgovor na krajšo fotoperiodo pri ruskem pritlikavem hrčku (kožuh ostane sive barve, medtem ko se pri sibirskem hrčku obarva belo) (Miedel in Hankenson, 2015). Veliki morfološki podobnosti gre pripisati tudi dejstvo, da je bil do leta 1993 ruski pritlikavi hrček taksonomsko uvrščen kot podvrsta sibirskega hrčka (Carelton in Musser, 1993). Posamezne vrste hrčkov lahko ločimo na podlagi filogenetske analize 1.112 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, kar je podrobneje opisano v poglavju 3.2.2 Določanje vrste hrčka.

Kljub temu, da so bili laboratorijski hrčki kot model uporabljeni v mnogih raziskavah, še posebej pri preučevanju vloge PV pri procesu karcinogeneze, do danes ni bilo objavljenih veliko raziskav o pojavljanju spontanih tumorjev pri hrčkih. V strokovni literaturi so bili v večini opisani in objavljeni le posamezni primeri.

Eno od obširnejših raziskav o pojavljanju spontanih tumorjev pri hrčkih so izvedli Kondo in sod. leta 2008 na Japonskem, kjer so v raziskavo vključili 85 ljubiteljskih hrčkov (od tega 70 sibirskih in 15 sirijskih oz. zlatih) in histološko pregledali 90 tumorjev. V sklopu raziskave so pri 70 sibirskih hrčkih odkrili 64 novotvorb in 11 ostalih obolenj. Podobno kot pri laboratorijskih hrčkih, so tudi pri sibirskih domačih hrčkih dokazali visoko prevalenco neoplastičnih bolezni, od katerih jih je večina izvirala iz integumentalnega sistema. Med najpogostejšimi neoplazijami so bili maligni in benigni tumorji mlečnih žlez (adenomi in adenokarcinomi), atipični fibromi in fibrosarkomi (na področju vratu, hrbta in na trebuhi), kožni papilomi (na področju glave in uhljev ter na prsnem košu in okončinah) ter ploščatocelični karcinomi (na področju glave, vratu in na trebuhi). Večino tumorjev mlečnih žlez so odkrili pri živalih ženskega spola, medtem ko atipične fibrome identificirali predvsem pri moškem spolu. V petih primerih so pri hrčkih odkrili tudi po dve vrsti sprememb, in sicer atipični fibrom/trihoepiteliom, atipični fibrom/papilom, papilom/epidermalno cisto ter atipični fibrosarkom/feokromocitom. Povprečna starost obolelih živali je bila 19,8 mesecev in je bila

glede na njihovo življenjsko dobo (v povprečju 18 – 24 mesecev) precej visoka (Kondo in sod., 2008).

Pri laboratorijskih sibirskih hrčkih prevladujejo tumorji mlečnih žlez, kože in pljuč. Tumorji mlečnih žlez se pogosteje pojavljajo pri samicah, pri katerih so izvedli tudi več raziskav, vendar so relativno pogosti tudi pri hrčkih moškega spola (Cooper in sod., 1991). Ker je nastanek atypičnih fibromov povezan z delovanjem androgenih hormonov, so te neoplazije pogostejše pri hrčkih moškega spola, kljub temu pa se pojavljajo tudi pri samicah. Za atypične fibrome je značilno, da so sestavljeni iz proliferajočih celic kože, ki so podobne gangljiskim celicam (Kashida in sod., 2003); pri sibirskih hrčkih te celice izvirajo iz intrinzičnih nediferenciranih mezenhimskih celic kože in podkožnega maščobnega tkiva. Atypični fibromi se najpogosteje pojavijo na torakoabdominalnem področju (Baba in sod., 2003), medtem ko se različne vrste papilomov najpogosteje pojavljajo na glavi in uhljih laboratorijskih in domačih sibirskih hrčkov (Kondo in sod., 2008).

2.8 Mikrobiološka diagnostika okužb s papilomavirusi

Mikrobiološke metode, ki jih lahko uporabimo za dokazovanje okužbe s PV delimo na tradicionalne in molekularne metode. Tradicionalne metode temeljijo na opazovanju značilnih citopatskih sprememb epitelijskih celic s svetlobnim mikroskopom, opazovanju virusnih delcev s pomočjo elektronske mikroskopije in dokazovanju virusnih strurnih beljakovin z imunohistokemičnimi metodami (Poljak in sod., 1998). Slab imunski odziv gostitelja na okužbo s PV omejuje uporabo seroloških diagnostičnih metod, prav tako pa virusa ne moremo osamiti na celični kulturi, saj se razmnožuje le v popolnoma dozorelih epitelijskih celicah (Nicholls in Stanley, 2000). Tradicionalne metode se zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti ter nezmožnosti genotipizacije PV redko uporabljajo v diagnostiki okužb s PV. V nadaljevanju se bomo osredotočili na molekularne metode, ki se uporabljajo pri odkrivanju novih genotipov PV in pri opredeljevanju etiološke povezave PV z nastankom značilnih benignih in malignih sprememb.

2.8.1 Molekularne metode za odkrivanje novih papilomavirusov

Kot posledica razvoja sodobnejših molekularnih metod, med katerimi so najpogosteje v uporabi visoko občutljiva verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*; PCR), pomnoževanje nukleinskih kislin po principu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle amplification*; RCA) in globoko sekveniranje oz. sekveniranje naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*; NGS), je bilo v zadnjih dveh desetletjih odkritih veliko novih genotipov PV.

2.8.1.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času

PCR je trenutno najbolj občutljiva in najpogosteje uporabljeni metoda pri odkrivanju novih genotipov PV. Dokazovanje virusne DNA temelji na *in vitro* pomnoževanju kratkega dela virusnega genoma s ponavljanjem temperaturnega cikla sestavljenega iz treh osnovnih inkubacij: denaturacija dvojnoverižne DNA poteka pri približno 95 °C, prileganje komplementarnih oligonukleotidnih začetnikov (OZ) pri približno 55 °C in pomnoževanje DNA s termostabilno DNA polimerazo pri približno 72 °C (Templeton, 1992).

Vsaka novonastala kopija DNA v naslednjem ciklu PCR reakcije služi kot matrica, kar omogoča, da se koncentracija virusne DNA med reakcijo eksponentno povišuje (Poljak in sod., 1994). Specifičnost pomnoževanja tarčne molekule je odvisna od izbire OZ, zato pri odkrivanju novih genotipov PV uporabljamo predvsem širokospektralne oz. skupinsko-značilne OZ, ki omogočajo pomnoževanje že znanih in uradno priznanih PV ter odkrivanje potencialno novih genotipov PV. Večina opisanih skupinsko-značilnih OZ, kot so FAP59/FAP64, FAP6085/FAP6319, CUT, CODEHOP, CPI/CPIIg(s), Ma/Ha, ARL1(E1) in različni CP in CN OZ, s katerimi so bili odkriti tudi številni živalski PV, cilja na visoko ohranjeni genomske področji L1 in E1, ki v krožnem virusnem genomu ležita na nasprotnih koncih (Forsslund in sod., 1999; Claus in sod., 2008; Staheli in sod., 2009; Stevens in sod., 2013; Munday in sod., 2015). S pomočjo omenjenih OZ dobimo kratka virusna zaporedja (120 – 700 bp), na podlagi katerih lahko razvijemo tipsko-značilne OZ s katerimi lahko, z uporabo reverzne reakcije PCR (angl. *inverted long range PCR*), pomnožimo celotni virusni genom potencialno novega genotipa PV.

Po končani klasični reakciji PCR pridelke najpogosteje ovrednotimo s pomočjo elektroforeze v gelu, encimske razgradnje ali s hibridizacijskimi metodami, kot so reverzni dot-blot, reverzni line-blot in mikromreže. Nukleotidno zaporedje virusega genoma pridobimo s kloniranjem pridelkov PCR v plazmidne vektorje in z metodo pomikanja OZ oz. s sekveniranjem (angl. *primer walking*) (Rector in sod., 2008). Občutljivost klasične PCR lahko izboljšamo z uporabo vgnezdenе PCR znotraj ene reakcijske posodice (angl. *single tube nested “hanging droplet” PCR*) (Chouhy in sod., 2013) ali s PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*; RT-PCR).

RT-PCR predstavlja nadgradnjo klasične metode PCR, kjer opredeljevanje specifičnosti pridelkov RT-PCR poteka hkrati s pomnoževanjem tarčne virusne DNA (MacKay, 2004). Prisotnost pridelkov RT-PCR lahko med samim potekom reakcije zaznamo s številnimi fluorescentnimi označevalci: nespecifičnimi barvili (npr. SYBR Green), hidroliznimi lovki TaqMan, hibridizacijskimi lovki FRET (angl. *fluorescence resonance energy-transfer*) in molekularnimi svetili (angl. *molecular beacons*) (Espy in sod., 2006). Hidrolizne lovke imajo na 5' koncu vezan reporterski fluorofor, na 3' koncu pa dušilec. Intaktna hidrolizna lovka ne fluorescira, ker se reporterski fluorofor in dušilec nahajata preblizu skupaj, ob podaljševanju novo-nastale verige DNA s Taq DNA polimerazo, ki ima 5' eksonukleazno aktivnost, pa lovka razpade, fluorofor pa začne z oddajanjem fluorescence, katere intenzivnost merimo v vsakem ciklu RT-PCR s pomočjo posebnega računalniškega programa (Cockerill in sod., 2003). Po končani reakciji RT-PCR lahko rezultat pomnoževanja kvalitativno ovrednotimo na podlagi sigmoidnih krivulj in vrednosti Ct (angl. *cycle threshold*), ki predstavlja točko, ko jakost signala preseže prag zaznavanja in je obratno sorazmerna začetni koncentraciji tarčne molekule (Mackay, 2004). V primeru kvantitativne različice RT-PCR na podlagi rezultatov pomnoževanja redčitvene vrste tarčne DNA (standardne krivulje) dobimo tudi informacijo o koncentraciji tarčne molekule v preiskovanem vzorcu.

2.8.1.2 Pomnoževanje po principu kotalečega se kroga (RCA)

Pred izvedbo reakcije PCR lahko koncentracijo tarčnih krožnih molekul DNA povišamo z uporabo metode RCA, ki omogoča nespecifično izotermalno pomnoževanje s pomočjo bakteriofagne phi29 DNA polimeraze in poljubnih heksamernih OZ (Rector in sod., 2004; Kocjan in sod., 2015).

Prednost omenjene metode je pomnoževanje krožnih molekul brez predhodne informacije o njihovem nukleotidnem zaporedju. Z uporabo tipsko-značilnih OZ lahko RCA usmerimo tudi k pomnoževanju točno določenih tarčnih zaporedij (Marincevic-Zuniga in sod., 2012; Kocjan in sod., 2015).

Posamezen pridelek RCA predstavlja velika količina linearnih molekul, sestavljenih iz zaporedno nanizanih ponovitev virusnega genoma, ki omogočajo neposredno določanje nukleotidnega zaporedja (sekveniranje), restrikcijsko analizo (angl. *restriction fragment lenght polymorphism*), kloniranje in nadaljnjo pomnoževanje s PCR (Johne in sod., 2009). RCA so uporabili pri odkritju in opredeljevanju številnih novih HPV, predvsem iz rodov *Beta-* in *Gamma-PV*, ter nekaterih živalskih PV (Rector in Van Ranst, 2013; de Villiers, 2013). Kljub temu, da je metoda namenjena pomnoževanju krožnih molekul, lahko z RCA pomnožimo tudi del linearnih DNA molekul, kar predstavlja oviro pri opredeljevanju novih genotipov PV, ki se v kliničnih vzorcih nahajajo v nizkih koncentracijah ob pribitku genomske DNA. Z namenom preprečevanja nezaželenega pomnoževanja genomske DNA so bile razvite številne tehnike, kot so predhodna obdelava vzorca z encimom endonukleaza V, ki dvojnovijačno DNA razgradi na posamezne deoksinukleotide, ločevanje virusnega genoma s pomočjo elektroforeze ter centrifugiranje v cezijevem kloridu (Bzhalava in sod., 2014).

2.8.1.3 Sekveniranje naslednje generacije (NGS)

NGS ali globoko sekveniranje je izraz za skupek tehnologij neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja, za katere je značilno vzporedno, večkratno sekveniranje večjega števila različnih DNA molekul v zelo kratkem času. Na tržišču obstajajo številne NGS platforme, ki se razlikujejo v uporabljeni tehnologiji, stroških določanja nukleotidnega zaporedja in količini pridobljenih podatkov (Bahassi in Stambrook, 2014). Metoda NGS je primerna za analizo kratkih odsekov DNA, pridobljenih z nebulizacijo, določanje nukleotidnega zaporedja PCR/RCA pridelkov in predvsem za opredeljevanje nukleotidnega zaporedja tarčnih molekul/mutant, ki se v vzorcu nahajajo v nizkih koncentracijah, saj lahko z NGS zaznamo tudi mutacije, ki so prisotne v manj kot 5 % populacije (Huang, 2011; Johansson in sod., 2013).

Z NGS lahko analiziramo dolge pridelke PCR, ki jih pridobimo s tipsko-značilnimi OZ, s čimer se izognemo zapletenemu in časovno zamudnjemu postopku kloniranja in selekcije

ustreznih bakterijskih kolonij, zato je bilo v zadnjih letih s pomočjo NGS pridobljenih mnogo delnih in celotnih nukleotidnih zaporedij potencialno novih genotipov PV iz različnih kliničnih vzorcev (Ekström in sod., 2011; Tse in sod., 2012; Mokili in sod., 2013). Kljub temu je za uradno priznanje novega genotipa HPV potrebno njegov celotni genom še vedno vklonirati v plazmidni vektor, ponoviti sekveniranje s tradicionalnimi metodami in njegovo nukleotidno zaporedje dodati v gensko banko in klon oz. klone deponirati v Referenčnem centru za HPV na Švedskem. Ker zaenkrat še ni uradnega referenčnega centra za živalske PV, njihovo odkrivanje spremljajo v sklopu podatkovne baze PaVE (Van Doorslaer in sod., 2013), kjer nove genotipe živalskih PV priznajo in pojmenujejo ne glede na tehniko s katero je bilo pridobljeno celotno nukleotidno zaporedje (Kocjan in sod., 2015). Ker metoda NGS postaja cenovno ugodnejša in zanjo ne potrebujemo predhodnega znanja o nukleotidnem zaporedju tarčnih virusov, bi lahko ob nadgradnji trenutnih pravil o opredeljevanju novih genotipov HPV močno spremenila obliko filogenetskega drevesa vseh do sedaj odkritih HPV in živalskih PV (Kocjan in sod., 2015).

2.8.2 Molekularne metode za opredeljevanje povezave med okužbo s PV in nastankom značilnih sprememb

Za opredeljevanje etiološke povezave PV z nastankom patoloških sprememb najpogosteje uporabljamo *in situ* hibridizacijo (angl. *in situ hybridization*; ISH), lasersko mikrodisekcijo (angl. *laser capture microdissection*; LCM) v kombinaciji s PCR in določanje virusnega bremena/celico, s pomočjo kvantitativnega RT-PCR.

Hibridizacijske metode temeljijo na povezavi med komplementarnimi deli majhnih označenih delcev nukleinskih kislin ali lovki in tarčno DNA. DNA ali RNA lovke so najpogosteje označene z neradioaktivnimi označevalci (biotin, digoksigenin, fluorescentna barvila) ter so lahko tipsko ali skupinsko značilne. Trdnost vezave med lovkami in tarčno DNA je odvisna od skladnosti nukleotidnega zaporedja obeh verig in od samih pogojev hibridizacije. ISH je edina molekularna metoda, s katero lahko PV zanesljivo dokažemo znotraj jeder okuženih celic (v episomalni obliki ali v integrirani obliki) in na ta način potrdimo etiološko povezavo med okužbo in nastankom patološke spremembe (povzeto v Poljak in Kocjan, 2010). V primeru episomalne oblike virusa s pomočjo ISH v jedru celice zaznamo razpršeni signal, v primeru integrirane oblike pa posamezne točkovne signale (Hopman in sod., 2005). Pogosto

uporabljena različica ISH je fluorescentna *in situ* hibridizacija (angl. *fluorescence in situ hybridization*; FISH).

Metoda LCM z uporabo mikroskopa in laserja omogoča, da v arhivskih ali sveži zamrznjenih tkivnih vzorcih (rezinah) označimo samo tarčni del vzorca in za nadaljnje analize s PCR osamimo DNA samo iz tarčnih celic, ne pa tudi iz okoliškega tkiva (Curran in sod., 2002).

Za opredeljevanje etiološke vloge virusa pri nastanku posameznih patoloških sprememb lahko uporabimo tudi tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR v kombinaciji s kvantitativenim RT-PCR za določanje koncentracije genomskeh celic. V primerjavi s povzročitelji neoplastičnih sprememb je virusno breme virusnih kontaminantov (npr. na površini tumorja) ponavadi veliko nižje (Hošnjak in sod., 2015). Ker se virusi lahko nahajajo samo na površini ali v okolini sprememb in niso etiološko povezani z njimi je določanje virusnega bremena/celico smiselno izvesti le na tkivnih vzorcih, po možnosti takih, ki imajo odstranjen večji del klinično nepomembnega tkiva (Hošnjak in sod. 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

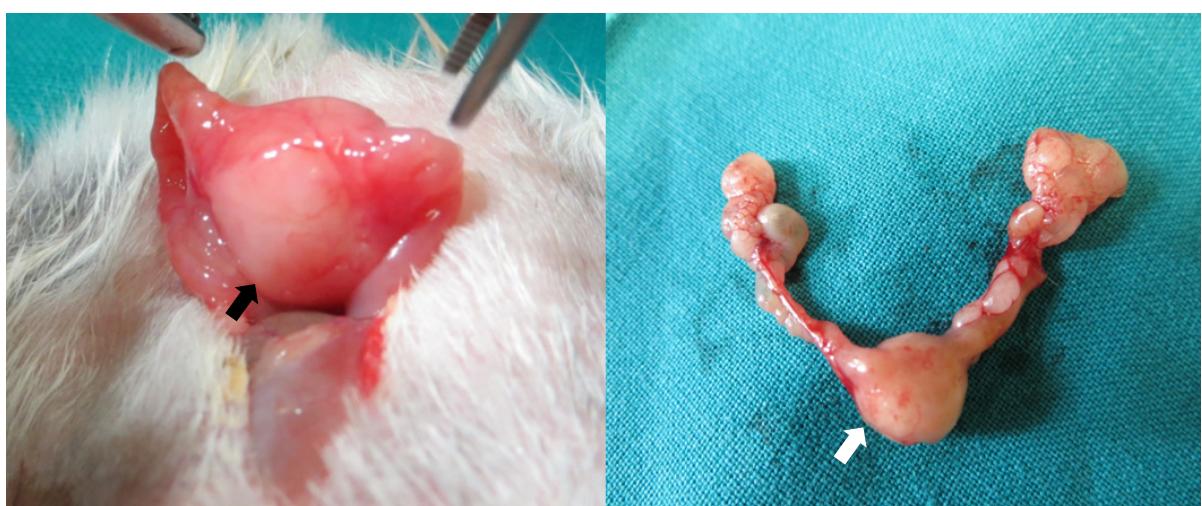
3.1.1 Tumorski vzorci

Leta 2013 smo pri dve leti stari samici sibirskega hrčka (90812 mž; kartototečna številka pacienta) s terapevtskim kirurškim posegom odvzeli dva sveža tkivna vzorca; vzorec tvorbe na maternici smo odvzeli ob ovariohisterektomiji, vzorec tumorja s podkožja ob prednji levi noge na področju mlečne žleze pa s kirurškim izrezom mase (Slike 3, 4 in 5).



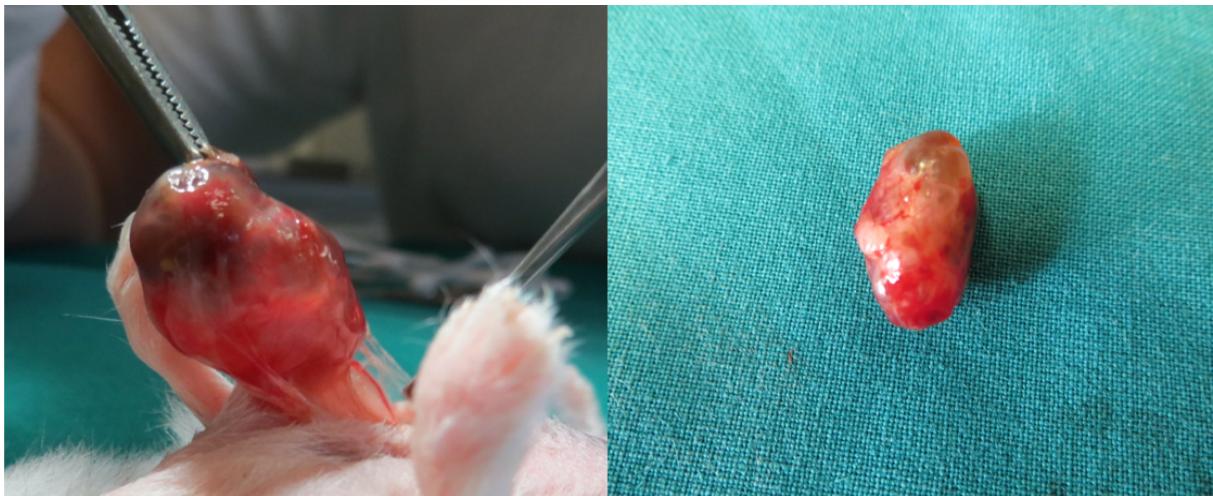
Slika 3: Samica sibirskega hrčka v splošni plinski anesteziji. Ob prednji levi nogi vidimo dobro omejeno maso
(Foto: IPPMP VFUL).

Figure 3: Female Siberian hamster in general gaseous anaesthesia. Soft tissue mass near the front left leg.



Slika 4: Tvorba na maternici samice sibirskega hrčka (puščici) (Foto: IPPMP VFUL).

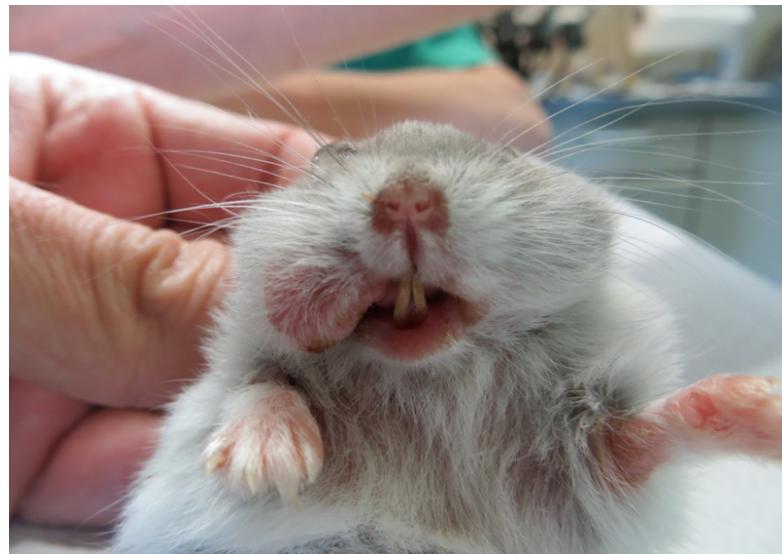
Figure 4: Mass on the uterus of a female Siberian hamster (arrows).



Slika 5: Tumor ob prednji levi nogi na področju mlečne žleze samice sibirskega hrčka (Foto: IPPMP VFUL).

Figure 5: Tumor located near the front left leg in the mammary gland region of a female Siberian hamster.

Tretji sveži tkivni vzorec smo leta 2014 odvzeli pri triletnem samcu sibirskega hrčka (19914 mž; kartototečna številka pacienta) med terapevtskim kirurškim posegom odstranitve tumorja. Sibirski hrček je imel tumor v ustni votlini (Slike 6 in 7).



Slika 6: Samec sibirskega hrčka z oralno neoplazijo (Foto: IPPMP VFUL).

Figure 6: Male Siberian hamster with oral neoplasia.



Slika 7: Sibirski hrček s tumorjem v ustni votlini v splošni plinski anesteziji (levo) in kirurško odstranjevanje tumorja (desno) (Foto: IPPMP VFUL).

Figure 7: Siberian hamster with oral tumor in general gaseous anaesthesia (left) and surgery of the oral neoplasia (right).

Naknadno smo pridobili več dodatnih svežih tkivnih vzorcev 9 odraslih sibirskih hrčkov, vključno z vzorci enega tumorja vagine, 3 tumorjev jajčnikov, 3 tumorjev maternice, 3 tumorjev mlečne žleze, 3 tumorjev glave ter vrata (eden tumor ustne votline in dva tumorja s področja ušesa). Mase so bile pri sedmih živalih odstranjene s terapevtskimi kirurškimi posegi, pri dveh poginjenih sibirskih hrčkih pa smo tumorske spremembe odstranili ob patoanatomski preiskavi.

Za potrebe osamitve celokupnih nukleinskih kislin smo del vsakega tkivnega vzorca shranili pri - 80 °C, preostanek tkiva pa fiksirali z 10 % formalinom in vklopili v parafin (angl. *formalin fixed and paraffin embedded, FFPE*). Iz parafinskih blokov smo narezali tkivne rezine debeline 4 µm ter jih tako pripravili za patohistološke preiskave (obarvanje s hematoksilinom in eozinom; HE) in PstuPV-značilno FISH. Ker so bili vzorci pridobljeni med rutinskimi terapevtskimi kirurškimi posegi, opravljenimi z namenom odstranitve neoplastičnih sprememb ali s patoanatomska preiskavo, dovoljenja za poskuse na živalih nismo potrebovali.

3.1.2 Brisi klinično normalne sluznice anogenitalnega predela in ustne votline

Z vzorčenjem prve kolonije sibirskih hrčkov smo pridobili 55 anogenitalnih brisov, ki so bili odvzeti enakemu številu mladih živali (24 samcev in 31 samic), starih od 4 do 6 tednov (Slika 8).



Slika 8: Vzorčenje anogenitalne sluznice pri mladih hrčkih (Foto: IPPMP VFUL).

Figure 8: Mucosal sampling of the anogenital region in young hamsters.

Istočasno smo v drugi koloniji 55 sibirskih hrčkov (25 samcev in 30 samic), prav tako starih od 4 do 6 tednov, vsaki živali odvzeli tako bris anogenitalnega predela (penisa oz. vagine) kot tudi bris ustne votline. Dodatno smo parne brise anogenitalnega predela in ustne votline pridobili tudi pri štirih odraslih živalih (dva samca in dve samic). Slednje živali so bile stare od 24 do 36 mesecev in so živele pri lastnikih kot hišni ljubljenčki. Vse brise normalne anogenitalne in ustne sluznice smo odvzeli s sterilnimi brisi EUROTUBO Collection Swab (Deltalab, Barcelona, Španija). Pridobljeni vzorci so bili pred osamitvijo celokupne DNA največ dva dni shranjeni pri 4 °C.

3.2 Metode

3.2.1 Osamitev celokupne DNA in preverjanje kakovosti osamljenih nukleinskih kislin

Celokupno DNA smo iz svežih in arhivskih tkivnih vzorcev osamili z uporabo komercialnega kompleta kemikalij QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po predhodno objavljenem protokolu za osamitev nukleinskih kislin iz svežih tkivnih vzorcev (Fujs Komloš in sod., 2012) oz. arhivskih tkivnih vzorcev (Kocjan in sod., 2016). Celokupno DNA smo iz brisov anogenitalnega predela in ustne votline osamili z uporabo komercialno dostopnega kompleta kemikalij EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen) na aparaturi EZ1 Advanced robot (Qiagen), po predhodno opisanem postopku (Hošnjak in sod., 2015). Končni elucijski volumen vezane nukleinske kisline je za tkivne vzorce znašal 100-200 µl, za vzorce brisov pa 50 µl. Koncentracijo celokupne DNA (v ng/µl) smo v tkivnih vzorcih ocenili s pomočjo spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Integriteto oz. kvaliteto osamljene DNA smo pri vseh vzorcih preverili z uporabo kvantitativnegaga RT-PCR, s katerim lahko pomnožimo 65 bp dolg del gena za tubulin. Za pomnoževanje dela gena za tubulin smo uporabili predhodno objavljene OZ (Pimenoff in sod., 2015), hidrolizno (TaqMan) lovko pa smo dodatno razvili s pomočjo prosto dostopne spletne aplikacije Primer3web (v4.0.0, <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). S primerjavo nukleotidnih zaporedij OZ z vsemi dostopnimi nukleotidnimi zaporedji v genski banki GenBank smo dokazali, da lahko z omenjenimi OZ pomnožimo tarčno zaporedje gena za tubulin številnih živalskih vrst: šimpanzov (*Pan troglodytes*), makakov (*Macaca fascicularis*), gibonov (*Hylobates lar*), goril (*Gorilla gorilla*), orangutanov (*Pongo pygmaeus*), žabe krempljarke (*Xenopus laevis*) in kitajskega hrčka (*Cricetulus griseus*).

Za izvedbo kvantitativnega RT-PCR smo uporabili komercialno dostopen komplet kemikalij QuantiTect Probe PCR + UNG Kit (Qiagen). Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 20 µl, mešanica pa je vsebovala:

- 5 µl osamljene DNA (do 100 ng DNA iz tkivnih vzorcev)
- 10 µl 2× QuantiTect Probe PCR Master Mix

- po 0,5 µM vsakega od OZ⁴
- 0,2 µM TaqMan lovke
- deionizirano vodo (ddH₂O, prosta RN-az in DN-az) do končnega volumena reakcijske mešanice

Pomnoževanje 65 bp dolgega dela gena za tubulin smo izvedli na aparaturi LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Manheim, Nemčija) pod sledečimi pogoji:

- Aktivacija polimeraze in denaturacija dvojnovidne DNA je potekala 15 minut pri 95 °C.
- Pomnoževanje kratkega dela gena za tubulin smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla RT-PCR, sestavljenega iz dveh inkubacij: 0 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C.
- Pomnoževanju je sledila ohladitev reakcijske mešanice na 40 °C.

S testiranjem triplikatov redčitvene vrste človeške DNA (Promega, Madison, WI) smo občutljivost testa ocenili na najmanj 10 pg človeške DNA na reakcijo. Korelacijski koeficient standardne krivulje (angl. *correlation coefficient; R²*) med Ct (angl. *cycle threshold*) in logaritmom začetnega števila kopij virusa skozi vsaj 6 velikostnih razredov (100 ng do 1 pg) smo ocenili na R² = 0,996. Učinkovitost (angl. *efficiency; E*) pomnoževanja je bila 91,4 %.

3.2.2 Določanje vrste hrčka

Vrsto hrčka smo določili na podlagi morfoloških značilnosti in filogenetske analize 1.112 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, ki je bilo sestavljeno iz delnega zapisa za citokrom b in tRNA-Thr; tarčna nukleotidna zaporedja smo pridobili po predhodno opisanem postopku (Meshchersky in Feoktistova, 2009). V filogenetsko analizo smo vključili 32 tarčnih nukleotidnih zaporedij, ki smo jih pridobili iz vzorcev hrčkov v naši raziskavi (16 jih je pripadalo odraslim živalim, 16 pa mladim živalim iz prve in druge vzorčene kolonije) in 17 tarčnih zaporedij *P. sungorus* (EU677453-EU677465, AY041201, KF673394, EF025540, AJ973390), 25 zaporedij *P. campbelli* (EU677431-EU677452, KF673395, EF025538,

⁴ Nukleotidno zaporedje uporabljenih začetnih oligonukleotidov Tub-F: 5'-TCC TCC ACT GGT ACA CAG GC-3' ter Tub-R: 5'-CAT GTT GCT CTC AGC CTC GG-3' in TaqMan lovke: 5'-FAM-AGG GCA TGG ACG AGA TGG AGT TCA-BBQ-3'.

AJ973389), dve zaporedji *P. roborowskii* (AJ973391 in EF025539) ter 13 tarčnih zaporedij drugih vrst hrčkov (AJ973378-AJ973388, AJ973392, QHPV4562), ki smo jih pridobili iz genske banke GenBank.

Vsa tarčna nukleotidna zaporedja smo med seboj poravnali z uporabo algoritma MAFFT (v6.846) (Katoh in Toh, 2010) ter drevo največje verjetnosti narisali s pomočjo algoritma RAxML HPC2 (v7.6.3) (Stamatakis in sod., 2008) na podlagi modela nukleotidnih zamenjav GTRCAT. Za določanje zanesljivosti drevesnih razvejišč smo izvedli 1000 ponovnih vzorčenj izhodiščnih podatkov. Filogenetsko drevo (Priloga A) smo vizualno prikazali in pridobili s programskim paketom MEGA5 (Tamura in sod., 2011).

3.2.3 Opredeljevanje prisotnosti virusne DNA

Prisotnost virusne DNA smo v DNA izolatih svežih tkivnih vzorcev tumorjev anogenitalnega predela, mlečnih žlez in ustne votline sibirskih hrčkov opredelili s predhodno opisanima OZ E1Gamma-F in E1Gamma-R (Chouhy in sod., 2013), ki omogočata pomnoževanje 500 bp dolgega dela gena E1 širokega spektra genotipov PV iz rodu *Gamma-PV*; pomnoževanje dela gena E1 smo izvedli po predhodno opisanem postopku (Hošnjak in sod., 2015). Dodatno smo za vgnezdeno PCR znotraj ene reakcijske posodice (angl. *single tube nested “hanging droplet” PCR*) uporabili OZ FAP64 in FAP6085 (Forslund in sod., 2003), ki omogočata pomnoževanje 380 bp dolgega dela gena L1 širokega spektra genotipov PV iz rodov *Beta-* in *Gamma-PV* (Li in sod., 2013). “Hanging droplet” PCR smo izvedli na napravi Mastercycler proS thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij HotStarTaq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija).

Končni volumen prve reakcijske mešanice je znašal 25 µl, mešanica pa je vsebovala:

- 1 - 5 µl osamljene DNA (do 100 ng DNA iz tkivnih vzorcev)
- 2,5 µl 10× CoralLoad PCR pufra s 15 mM MgCl₂
- 2 µl dodatnega MgCl₂ (25 mM)
- 0,25 µM vsakega od OZ
- 200 µM mešanice deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP)
- 0,625 U HotStarTaq Plus DNA polimeraze
- ddH₂O do končnega volumna reakcijske mešanice

Prvo reakcijsko mešanico smo prekrili s 40 µl mineralnega olja M5904-5ML (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Pred zaprtjem reakcijske posodice smo v njen pokrovček dodali 25 µl enake reakcijske mešanice, le da je slednja vsebovala 0,25 µM OZ in 1 U DNA polimeraze. Prva stopnja PCR je potekala pod naslednjimi pogoji brez vklopljenega ogrevanja pokrova PCR naprave:

- Aktivacija polimeraze in denaturacija dvojnovidne DNA je potekala 5 minut pri 95 °C.
- Pomnoževanje dela gena L1 smo izvedli s 25-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij:
 - 50 sekund pri 94 °C;
 - 50 sekund pri 49 °C;
 - 50 sekund pri 72 °C.
- Sledilo je končno podaljševanje novonastalega pridelka PCR (10 minut pri 72 °C).

Po končani prvi stopnji PCR smo reakcijsko posodico eno minuto centrifugirali na 2.000 g ter tako obe reakciji združili v skupno reakcijo s skupnim reakcijskim volumenom 50 µl. Druga stopnja PCR je potekala pod enakimi pogoji kot prva, a s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR in končno ohladitvijo reakcijske mešanice na 8 °C. Pridobljene pridelke PCR smo analizirali na 2 % agaroznem gelu in jih pred avtomatskim določanjem nukleotidnega zaporedja z metodo po Sangerju očistili s pomočjo komercialno dostopnega kompleta kemikalij QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja smo izvedli po predhodno opisanem postopku (Kocjan in sod., 2005).

3.2.4 Pomnoževanje, določanje nukleotidnega zaporedja in kloniranje celotnega genoma virusa PsuPV1

Za pomnoževanje celotnega virusnega genoma potencialno novega genotipa PV smo razvili dva tipsko-značilna seta OZ (PsuPV1_LNGL1-F/PsuPV1_LNGL1-R ter PsuPV1_LNGE1-F/PsuPV1_LNGE1-R) (Preglednica 1), ki nalegata na genomski regiji L1 in E1.

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje celotnega virusnega genoma potencialno novega genotipa PV.

Table 1: Primers used for PsuPV1 inverted long-range PCR.

Ime oligonukleotidnega začetnika (OZ)	Nukleotidno zaporedje (5'- 3')	Genomsko področje (nt)*	Smer OZ**
PsuPV1-LNG-L1-F	CGTTGCTAACAAACTAGGTGAC	6.058-6.081	cw
PsuPV1-LNG-L1-R	GATGTCCGGTTGTCCCTAC	6.058-6.039	ccw
PsuPV1-LNG-E1-F	GCATAGAGCCCCCACACA	2.571-2.589	cw
PsuPV1-LNG-E1-R	TTCATATCCAATGATATGGGATT	2.571-2.548	ccw

*Genomsko področje glede na referenčno PsuPV1 nukleotidno zaporedje (pristopna št. HG939559);

**cw – smer urinega kazalca; ccw – smer nasproti urinemu kazalcu.

Novo-razvita seta OZ smo uporabili v dveh ločenih reverznih reakcijah PCR (angl. *inverted long-range PCR*) in pridobili dva prekrivajoča se pridelka PCR in tako pomnožili celotni virusni genom. Obe reverzni reakciji PCR smo izvedli na aparaturi Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) z uporabo kompleta kemikalij Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 25 µl, mešanica pa je vsebovala:

- 1 - 5 µl osamljene DNA (do 100 ng DNA iz tkivnih vzorcev)
- 2,5 µl 10× High Fidelity PCR pufra
- 1 µl MgSO₄ (50 mM)
- 0,2 µM vsakega od OZ
- 200 µM mešanice dNTP
- 0,5 U Platinum Taq DNA polimeraze
- ddH₂O do končnega volumna reakcijske mešanice

Pomnoževanje je bilo izvedeno pod sledečimi pogoji:

- Aktivacija polimeraze in denaturacija dvojnovijačne DNA je potekala 2 minuti pri 94 °C.
- Pomnoževanje smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij:
 - 30 sekund pri 94 °C;
 - 30 sekund pri 54 °C;
 - 8 minut pri 68 °C.

- Sledilo je končno podaljševanje novonastalega pridelka PCR (7 minut pri 68 °C) in ohladitev reakcijske mešanice na 8 °C.

Pridobljene pridelke PCR smo očistili s pomočjo komercialnega dostopnega kompleta kemikalij QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) in jih vklonirali v plazmidne vektorje z uporabo kompleta kemikalij TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen), v skladu z navodili proizvajalca. Rekombinantne plazmide smo transformirali v kemično kompetentne celice One Shot TOP10 *E. coli* (Invitrogen), jih nacepili na gojišče Luria-Bertani (LB) z nizko vsebnostjo soli in s 50 µg/ml kanamicina, ter jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Nasledji dan smo uspešnost kloniranja preverili z reakcijo PCR, v katero smo vključili posamezne bakterijske kolonije in komercialno dostopne OZ M13 Forward (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') in M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), ki nalegajo na plazmidno DNA; omenjeno reakcijo PCR smo izvedli z uporabo komercialno dostopnega kompleta kemikalij Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit (Invitrogen), v skladu z zgoraj opisanim postopkom. Prisotnost ustreznih pridelkov PCR (velikosti 7 – 8 kbp) smo preverili na 0,8 % agaroznem gelu in njihovo specifičnost opredelili z avtomatskim določanjem nukleotidnega zaporedja po predhodno opisanem postopku (Kocjan in sod., 2005). Bakterijske kolonije, ki so vsebovale plazmide z ustreznimi vključki, smo precepili v 4 ml tekočega gojišča LB s 50 µg/ml kanamicina in jih inkubirali 16 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo iz posameznih tekočih gojišč s pomočjo komercialno dostopnega kompleta kemikalij QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) osamili plazmidno DNA, spektrofotometrično določili koncentracijo DNA in plazmide poslali v podjetje Microsynth AG (Balgach, Švica), kjer so določili nukleotidno zaporedje celotnega virusnega genoma s pomočjo metode pomikanja OZ; vsi uporabljeni OZ so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Oligonukleotidni začetniki za določanje celotnega nukleotidnega zaporedja virusa PsuPV1.

Table 2: Primers used for PsuPV1 whole genome sequencing.

Ime oligonukleotidnega začetnika (OZ)	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Genomsko področje (nt)*	Smer OZ**
PsuPV1-seq-F1	GTCTGCTGCCACTGCC	2.964-2.980	cw
PsuPV1-seq-F2	GTCAAGAGGCAGCGACA	3.548-3.565	cw
PsuPV1-seq-F3	AGGCACAAACACTTGCTGAT	4.149-4.168	cw
PsuPV1-seq-F4	GGTAGGGTGTAAATAGGGT	4.822-4.842	cw
PsuPV1-seq-F5	TTCCCAGACATTGATACCG	5.503-5.522	cw
PsuPV1-seq-R1	GTTGGGAGGGCAGTGG	2.988-2.972	ccw
PsuPV1-seq-R2	GGGACCATATATAACGAGACA	2.356-2.335	ccw
PsuPV1-seq-R3	ATACGCACAATGTGTCGG	1.696-1.678	ccw
PsuPV1-seq-R4	TCTTGTCAGCCATCGTAC	1.044-1.025	ccw
PsuPV1-seq-R5	CATAAGCGCGACCCCT	389-373	ccw
PsuPV1-seq-R6	GGAGACAAGGCATGGTCA	7.388-7.370	ccw
PsuPV1-seq-R7	GTTCTGAGCAGCATAATCATC	6.786-6.765	ccw
M13f1	GTTTAATCGTCCTTCTG	6.629-6.647	cw
M13r1	GCAGGAGAACATTAGTC	5.562-5.544	ccw
M13f2	ATGACCATGCCTTGTCTC	7.369-7.387	cw
M13r2	TCAGCAGTCCACCTGTG	4.812-4.794	ccw
M13f3	GAGCATGATTTGTAGAG	421-439	cw
M13r3	TGTATAGATTGAAGCAG	4.097-4.079	ccw
M13f4	TGTCTGAGGCTGAATGTG	1.085-1.103	cw
M13r4	AGGATTGTCGGAGCTAG	3.417-3.399	ccw
M13f5	TCATCTGCTGTTAGTAG	1.733-1.751	cw
M13f6	ACAGCCACTCATAGACAG	2.451-2.469	cw

*Genomska lokacija glede na referenčno PsuPV1 nukleotidno zaporedje (pristopna št. HG939559);

**cw – smer urinega kazalca; ccw – smer nasproti urinemu kazalcu.

3.2.5 Molekularna in filogenetska opredelitev genoma PsuPV1

Celotni virusni genom PsuPV1 smo sestavili z uporabo programa Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). S pomočjo slednjega in prosto dostopne spletnne aplikacije ORF Finder Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) smo nato opredelili domnevne odprte bralne okvirje (angl. *open reading frame*; ORF) virusnega genoma. Značilne funkcionalne domene virusnega genoma smo opredelili v skladu s predhodno objavljenim postopkom (Hošnjak in sod., 2015).

PsuPV1 smo med ostale PV filogenetsko uvrstili na osnovi primerjave celotnega nukleotidnega zaporedja gena L1 PsuPV1 z nukleotidnimi zaporedji gena L1 vseh uradno priznanih PV iz rodu *Pi-PV* ter drugih sorodnih PV rodov, vključno z *Gamma*-, *Dyoxi*-, *Phi*- in *Tau*-PV (Rector in Van Ranst, 2013; Rogovskyy in sod., 2014). Vsa nukleotidna zaporedja PV smo pridobili iz genske banke GenBank in iz podatkovne baze Papillomavirus Episteme (PaVE) (Van Doorslaer in sod., 2013) ter filogenetsko analizo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.2.2 Določanje vrste domačega hrčka.

3.2.6 PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR

Oligonukleotidna začetnika (PsuPV1_RTPCR-F in PsuPV1_RTPCR-R; Preglednica 3) za PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR (PsuPV1 RT-PCR), s katerima lahko pomnožimo približno 100 bp dolg del tarčnega virusnega genoma, smo ročno razvili na podlagi nukleotidnega zaporedja gena L1 PsuPV1 (pristopna št.: HG939559).

Preglednica 3: Oligonukleotidna začetnika za pomnoževanje dela gena L1 PsuPV1.

Table 3: Primers used for PsuPV1-specific RT-PCR.

Ime oligonukleotidnega začetnika (OZ)	Nukleotidno zaporedje (5'- 3')	Genomsko področje (nt)*	Smer OZ**
PsuPV1-L1-RT-F	GATCCCAAGCAGACTCAAATG	6.141-6.162	cw
PsuPV1-L1-RT-R	ACCTGCATTAATTGGTTACAAGG	6.237-6.213	ccw

*Genomska lokacija glede na referenčno PsuPV1 nukleotidno zaporedje (pristopna št. HG939559);

**cw – smer urinega kazalca; ccw – smer nasproti urinemu kazalcu.

Specifičnost razvitih OZ smo preverili na podlagi poravnave obeh OZ z vsemi nukleotidnimi zaporedji PV glodavcev, ki so bila v genski banki GenBank ter podatkovni bazi PaVE dostopna dne 07. 04. 2015 (pristopne št.: HQ625440, DQ664501, HG530528, DQ269468, GU808564, GQ180114, U01834, JF755418, HQ625441, AY684126 in KC020689) ter s pomočjo prosto dostopnih spletnih aplikacij BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/index.cgi>). Kemijske in termodinamične lastnosti novo-razvitih OZ smo preverili s prosto dostopno spletno aplikacijo Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>).

PsuPV1 RT-PCR smo izvedli z uporabo komercialnega kompleta kemikalij QuantiTect SYBR Green PCR + UNG Kit (Qiagen). Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 20 µl, mešanica pa je vsebovala:

- 1 - 5 µl osamljene DNA (do 100 ng DNA iz tkivnih vzorcev)
- 10 µl 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 0,5 µM vsakega od OZ
- ddH₂O dopolnjeno do končnega volumna reakcijske mešanice

Pomnoževanje dela gena L1 PsuPV1 je potekalo na aparaturi LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics) pod sledečimi pogoji:

- Aktivacija polimeraze in denaturacija dvojnovijačne DNA je potekala 15 minut pri 95 °C.
- Pomnoževanje dela gena L1 smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz dveh inkubacij:
 - 15 sekund pri 94 °C;
 - 60 sekund pri 60 °C.
- Pomnoževanju DNA je sledila analiza specifičnosti pridelkov RT-PCR z metodo talilne krivulje (angl. *melting curve analysis*), ki smo jo izvedli z enkratnim temperaturnim cikлом: 0 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 45 °C in 0 sekund pri 95 °C.
- Sledila je ohladitev reakcijske mešanice na 40 °C.

Kot PsuPV1-pozitivne smo opredelili vse vzorce z vrednostjo talilne temperature pridelkov PCR T_m = 77,5 °C. Specifičnost približno 35 % vseh pridelkov RT-PCR smo naknadno preverili z neposrednim določanjem nukleotidnega zaporedja.

Ponovljivost rezultatov in občutljivost PsuPV1 RT-PCR smo opredelili s testiranjem triplikatov redčitvene vrste plazmidne DNA PsuPV1. Analitično občutljivost PsuPV1 RT-PCR smo ocenili na najmanj 10 virusnih kopij/reakcijo, učinkovitost pomnoževanja na E = 97,4 % in koreacijski koeficient standardne krivulje skozi vsaj devet velikostnih razredov (10^{10} – 10 virusnih kopij/reakcijo) na $R^2=0,999$.

3.2.7 Izračun virusnega bremena PsuPV1

Število celic sibirskega hrčka v PsuPV1-pozitivnih vzorcih smo ocenili z merjenjem koncentracije tubulina. Ker celotno nukleotidno zaporedje sibirskega hrčka še ni na voljo, smo predpostavili, da je količina genomske DNA, prisotne v gostiteljski celici, podobna tisti pri drugih vrstah hrčkov. Pri slednjih količina genomske DNA v celicah niha od 2,80 do 4,62 pg nukleinske kisline na diploidno celico (v povprečju 3,46 pg) (Gregory, 2016). Virusno breme PsuPV1 smo izrazili kot razmerje med številom kopij virusnega genoma in številom genomskeh celic (Hazard in sod., 2006).

3.2.8 Pi-PV skupinsko-značilen PCR oz. pan-Pi-PV PCR

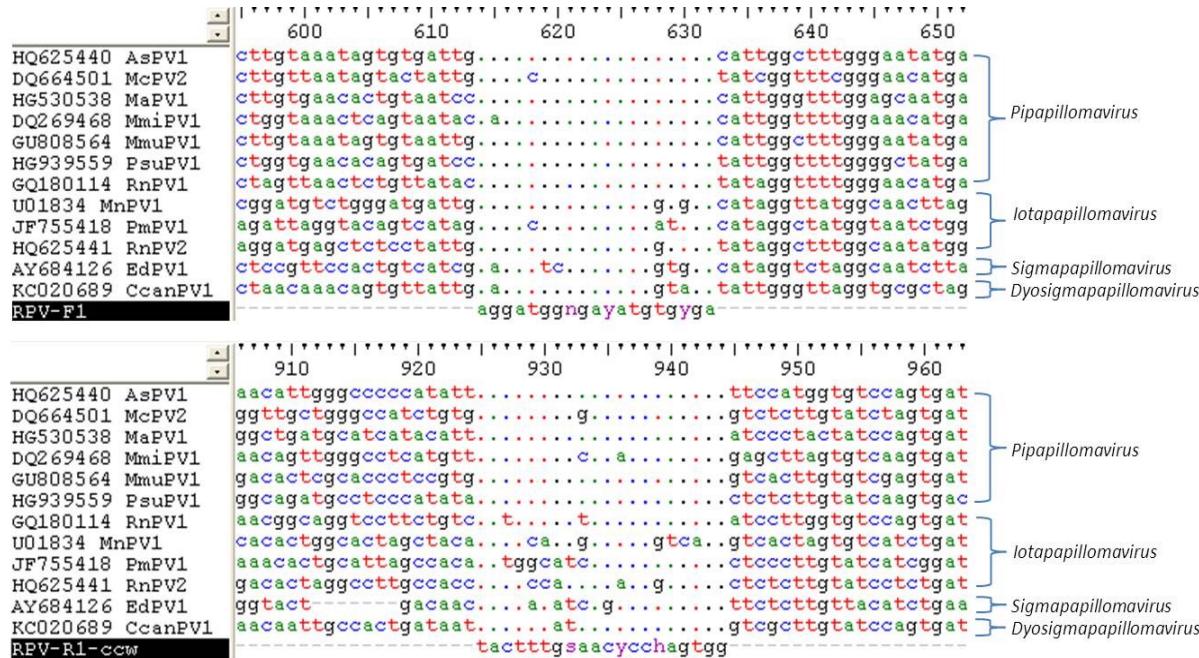
Na podlagi poravnave celotnih nukleotidnih zaporedij gena L1 vseh PV glodavcev smo razvili dva širokospektralna OZ, ki omogočata specifično pomnoževanje 330 bp velikega dela gena L1 vseh do sedaj znanih PV iz rodu *Pi-PV* (Preglednica 4 in Slika 9).

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki za pan-*Pi-PV* PCR.

Table 4: Primers used for *Pi-PV* broad-range PCR or pan *Pi-PV* PCR.

Ime oligonukleotidnega začetnika (OZ)	Nukleotidno zaporedje (5'- 3')	Smer OZ**
RPV-F1	AGGATGGNGAYATGTGYGA	cw
RPV-R1	CCACTDGGRGTTSCAAAGTA	ccw

**cw – smer urinega kazalca; ccw – smer nasproti urinemu kazalcu.



Slika 9: Izbira OZ za pan-*Pi*-PV PCR.

Figure 9: Selection of PCR primers for the *Pi*-PV broad-range PCR based on a multiple alignment of L1 gene sequences of all rodent PVs.

Specifičnost izbranih OZ smo dodatno preverili s pomočjo prosto dostopnih spletnih aplikacij BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/index.cgi>).

Širokospektralen pan-*Pi*-PV PCR smo izvedli z uporabo komercialnega kompleta kemikalij HotStarTaq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen). Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 25 µl, posamezna mešanica pa je vsebovala:

- 1 - 5 µl osamljene DNA (do 100 ng DNA iz tkivnih vzorcev)
 - 2,5 µl 10× CoralLoad PCR pufra s 15 mM MgCl₂
 - 0,5 µM vsakega od OZ
 - 200 µM mešanice dNTP
 - ddH₂O dopolnjeno do končnega volumna reakcijske mešanice

Pomnoževanje smo izvedli na aparaturi Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) pod sledećimi pogojima:

- Aktivacija polimeraze in denaturacija dvojnovidne DNA je potekala 5 minut pri 95 °C.

- Pomnoževanje dela gena L1 smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij:
 - 50 sekund pri 94 °C;
 - 50 sekund pri 54 °C;
 - 45 minut pri 72 °C.
- Končno podaljševanje je trajalo 10 minut pri 72 °C.
- Sledila je ohladitev reakcijske mešanice 8 °C.

Pridobljene pridelke PCR smo analizirali na 2 % agaroznem gelu in jih očistili z uporabo komercialnega kompleta kemikalij QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ter jim določili nukleotidno zaporedje, kot je opisano v poglavju 3.2.3 Opredeljevanje prisotnosti virusne DNA.

Analitično občutljivost pan-*Pi*-PV PCR smo testirali s pomnoževanjem triplikatov redčitvene vrste (1 - 10⁷ virusnih kopij/reakcijo) plazmidov PsuPV1 in MaPV1 in jo ocenili na vsaj 10 virusnih kopij/reakcijo za oba virusa. Specifičnost pan-*Pi*-PV PCR smo preverili s testiranjem naključno izbranih DNA izolatov iz brisov klinično normalne ustne in anogenitalne sluznice mladih živali, pri katerih smo okužbo s PsuPV1 opredelili tudi s PsuPV1 RT-PCR. V vseh brisih, ki smo jih opredelili kot PsuPV1-pozitivne oz. kot PsuPV1-negativne s PsuPV1 RT-PCR, smo prisotnost oz. odsotnost PsuPV1 dokazali tudi s pan-*Pi*-PV PCR.

3.2.9 PsuPV1-značilna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Lovko za PsuPV1-značilno FISH smo z biotinom (Bio) označili s pomočjo standardnega označevanja nukleotidov s pomikanjem zareze ter jo uporabili v koncentraciji 1 ng/µl v mešanici 60 % formamida, 2× SSC pufra, 10 % dekstran sulfata in 50× presežka nosilne nukleinske kisline (DNA lososove sperme). FISH smo izvedli na 4 µm debelih FFPE tkivnih rezinah, nanešenih na objektna stekelca Superfrost Plus (ThermoFisher Scientific). Z namenom izboljšanja celične adhezije na objektna stekelca med celotnim postopkom FISH smo rezine najprej 15 minut segrevali pri 80 °C. Sledilo je razvoskanje, hidriranje in 10-minutno segrevanje v mikrovalovni pečici pri 100 °C skupaj z 10 mM Na-Citratnim pufrom. Po 20-minutnem ohlajanju na sobni temperaturi smo vzorce sprali v deionizirani vodi in splaknili z 0,01 M raztopino HCl ter razgradili z dodatkom pepsina (2,5 mg). Objektna

stekelca smo nato sprali z raztopino 0,01 M HCl in 1× pufra PBS ter fiksirali v 1 % formamidu in pufru PBS 5 minut na sobni temperaturi. Sledilo je spiranje stekelc s pufrom in deionizirano vodo ter dehidriranje v alkoholu. Nato smo pod pokrov dodali označeno lovko, istočasno izvedli 10-minutno denaturacijo pri 80 °C; sledila je prekonočna hibridizacija pri 37 °C. Po končani hibridizaciji smo stekelca 2-krat po 5 minut spirali z 2× SSC pufrom, 0,05 % fluorescentnim barvilom Tween-20 (Janssen Chimica, Beerse, Belgija) in 0,1× SSC pufrom, segretim na 61 °C. Vezano lovko smo zaznali z uporabo troslojne detekcijske metode, ki je vključevala s FITC-konjugiran avidin (Av-FITC, redčitev 1:100; Vector Laboratories, CA, ZDA), biotiniliran kozji anti-avidin (Bio-GaA, redčitev 1:100; Vector Laboratories) ter Av-FITC. Sledilo je spiranje stekelc s pufrom PBS, ki je vseboval 0,05 % barvila Tween-20, in dehidracija stekelc z naraščajočo koncentracijo etanola ter fiksacija v mediju Vectashield (Vector Laboratories), kateremu je bilo dodano fluorescentno barvilo DAPI (Sigma: 0,5 µg/µl). Slike smo posneli s sistemom Metasystems Image Pro (črno bela CCD kamera; Sandhausen, Nemčija), ki je vključen v fluorescentni mikroskop Leica DM-RE, opremljen s FITC/DAPI enopasovno-prepustnim filtrom za enobarvno analizo. Slike so bile posnete z uporabo avtomatske časovne integracije, ki je omogočala semi-kvantitativno analizo (uporabljen je bil poln dinamični razpon kamere brez signalne ojačitve nasičenosti; TIF 8-bitne slike).

3.2.10 Patohistološka preiskava tumorskih vzorcev

Za potrebe patohistološke preiskave smo tkivne vzorce fiksirali z 10 % formalinom in vklopili v parafin (FFPE). Proces obdelave tkivnih vzorcev je zajemal dehidracijo z naraščajočimi koncentracijami alkohola, čiščenje z organskim topilom ter infiltracijo vzorcev s parafinskim voskom. Dobljene parafinske bloke smo ohladili in z mikrotomom narezali tkivne rezine debeline 4 µm, ki smo jih položili v toplo vodno kopel. Tkvne rezine smo zajeli z objektnimi stekelci Superfrost Plus (ThermoFisher Scientific) in jih v nekaj urah posušili pri 37 °C. Vzorce smo nato obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE), prekrili s krovnimi stekelci ter jih opazovali pod mikroskopom pri 40× in 100× povečavi.

3.2.11 Statistična analiza podatkov

Za statistično analizo in grafični prikaz podatkov o prevalenci PsuPV1 pri mladih in odraslih sibirskih hrčkih smo uporabili program Microsoft Excel. Za potrjevanje prevalence smo uporabili testiranje hipotez s t-testom, pri katerem smo upoštevali statistično pričakovano vrednost: 1 pozitivni rezultat na 10 testov. Za potrditev hipoteze smo uporabili 95 % stopnjo zaupanja.

4 REZULTATI

4.1 Določanje vrste hrčka

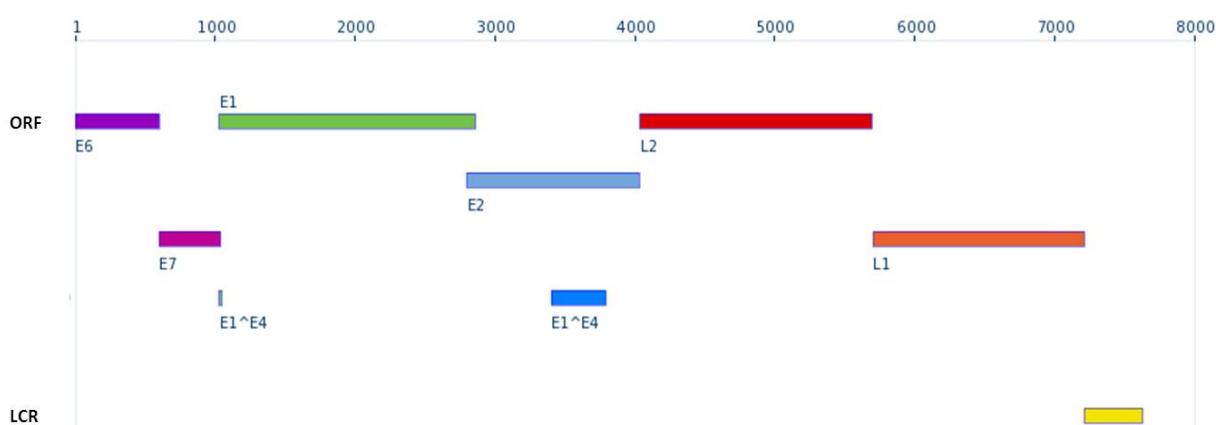
Morfološko opredelitev vrste hrčka smo potrdili na podlagi filogenetske analize 1.112 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, ki je bilo sestavljeni iz delnega zapisa za citokrom b in tRNA-Thr. Kot je razvidno iz filogenetskega drevesa v prilogi A, smo vseh 32 hrčkov (16 odraslih živali in 16 mladih živalih iz prve in druge vzorčene kolonije), ki smo jih naključno izbrali izmed vseh hrčkov vključenih v raziskavo, uvrstili v vrsto *P. sungorus*. *P. sungorus* je najbližje soroden ruskemu pritlikavemu hrčku (*P. campbelli*).

4.2 Pomnoževanje celotnega virusnega genoma PsuPV1

Septembra 2013 smo z uporabo E1Gamma-F/E1Gamma-R PCR (Chouhy in sod., 2013) in FAP64/FAP6085 PCR (Li in sod., 2013) v vzorcu novotvorbe maternice in v vzorcu tumorske mase s področja mlečne žleze dve leti stare samice (90812 mž; št. vzorca: APV12 in APV13) dokazali prisotnost delnih nukleotidnih zaporedij genov L1 in E1 potencialno novega genotipa PV iz rodu *Pi-PV*. Ker smo iz obeh tkivnih vzorcev osamili popolnoma enako nukleotidno zaporedje obeh genov, smo v nadaljevanju s pomočjo dveh PsuPV1-značilnih reverznih reakcij PCR celotni virusni genom pomnožili iz vzorca novotvorbe maternice. Celotno nukleotidno zaporedje novega genotipa PV - *Phodopus sungorus papillomavirus type 1* (PsuPV1) - smo vklonirali v plazmidni vektor in ga februarja 2014 vnesli v gensko banko GenBank pod pristopno številko HG939559. V nadaljevanju smo prisotnost PsuPV1 dokazali tudi pri dveh nepovezanih živalih in sicer pri triletinem samcu z oralnim tumorjem (19914 mž; št. vzorca: APV34) ter pri 4-6 tednov stari samici (v vzorcu klinično zdrave ustne sluznice; št. vzorca: APV105). V obeh omenjenih vzorcih smo pomnožili celotno nukleotidno zaporedje PsuPV1 in obe dobljeni sekvenci vnesli v gensko banko GenBank pod pristopnima številkama LM653111 (APV34) in KP099578 (APV105).

4.3 Molekularna opredelitev genoma PsuPV1 in podtipske različice PsuPV1

Celotno nukleotidno zaporedje virusnega genoma PsuPV1 (pristopna št. HG939559; v prilogi) je dolgo 7.630 bp in vsebuje 47,7 % baznih parov gvanin-citozin (G + C). Virusni genom je sestavljen iz petih zgodnjih ORF: E1, E2, E4, E6 in E7 ter dveh poznih ORF: L1 in L2, nima pa zapisa za virusno beljakovino E5 (Slika 10).



Slika 10: Organizacija genoma PsuPV1 (povzeto po Van Doorslaer in sod., 2013).

Figure 10: Genomic organization of PsuPV1 showing genomic positions of viral genes E6, E7, E1, E2, E4, L1, L2 and the non-coding long control region (LCR) located between L1 and E6 (Van Doorslaer in sod., 2013).

Nekodirajoče področje virusnega genoma LCR leži med genoma L1 in E6 ter vsebuje potencialno poliadenilacijsko mesto (AATAAA; nt, 7.349-7.354) za pozne virusne mRNA, dve palindromni vezavni mesti za virusno beljakovino E2 (ACC-N₆₋₇-GGT; nt, 7.495-7.506; 7.566-7.578), vezavno mesto za virusno beljakovino E1 (ATTTTCAGAAATAT; nt, 7.462-7.479; Slika 11) in številna potencialna vezavna mesta za celične dejavnike prepisovanja, kot so AP-1, C/EBPalpha, NF-1 ter SP-1 (Bernard, 2013). Kljub temu, da v LCR nismo dokazali prisotnosti ohranjenega zaporedja TATA (TATAAAA) promotorja za gen E6, smo na komplementarni verigi dokazali vezavno mesto za TATA-vezavno beljakovino (angl. *TATA-binding protein (TBP)*; GATAAA; nt, 7.605-7.601), ki se nahaja v neposredni bližini potencialnega začetka prepisovanja beljakovine E6.

HPV16	A T T G T A G T T	T A G T A T T A T	A l p h a
HPV11	A T T G T T A T T	A A C T A T A A G	A l p h a
HPV8	G T T A T T G C C	A A C A A C C A T	B e t a
BPV1	A T T G T T G T T	A A C A A T A A T	D e l t a
OvPV1	A T T G T T G T T	A A C A A T A A T	D e l t a
HPV1	A T G G T A G T T	A A C A A C A A C	M u
HPV4	A T C A T A G T T	G G C A A C A A T	G a m m a
CRPV	G T T G T T G C T	A A C A A T A A T	K a p p a
PsuPV1 HG93955	A T T T T T C T T	C A G A A A T A T	P i
PsuPV1 KP09957	A T T T T T C T T	C A G A A A T A T	P i
PsuPV1 LM65311	A T T T c T C T T	C A G A A A T A T	P i

Slika 11: Palindromno vezavno mesto za E1 v nekodirajoči regiji LCR treh celotnih genomov PsuPV1, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, in posameznih genotipov PV iz drugih rodov (McBride, 2008)

Figure 11: The palindromic E1 binding origin sequence from three PsuPV1 isolates completely sequenced in this study and a range of PV types from other PV-genera. All non-PsuPV1 E1 protein binding sequences were adopted from a publication of McBride, 2008.

Gen E1 nosi zapis za največjo virusno beljakovino, ki je sestavljena iz 609 aminokislin (ak). Na karboksilnem koncu beljakovine E1 (nt, 2.350-2.373; kodoni, 441-445) smo dokazali prisotnost ohranjenega ATP-vezavnega mesta (GPSDTGKS), ki predstavlja značilno lastnost ATP-odvisne DNA helikaze. Na aminskem koncu beljakovine E1 (nt, 1.261- 1.377; kodoni, 78-116) smo dokazali prisotnost značilnega, bipartitnega jedrnega lokalizacijskega signala (angl. *nuclear localization signal*; NLS), ki je sestavljen iz dveh kratkih zaporedij ak (KRK in KKKL), ločenih z 32 ak. Znotraj NLS (nt, 1.315-1.344; kodoni 96-105) smo dokazali prisotnost z levcinom bogatega jedrnega eksportnega signala (angl. *nuclear export singal*; NES; L-X₍₂₋₃₎-L-X₂-(L/I/V)-X-(L/I)).

Znotraj beljakovine E2 smo dokazali prisotnost značilne transaktivacijske domene, DNA-vezavne domene in visoko ohranjenega KRXR motiva (nt, 3.446-3.457; kodoni, 216-219), nismo pa dokazali prisotnosti značilne levcinske zadrge (L-X₆-L-X₆-L-X₆-L), ki je potrebna za dimerizacijo gena E2.

ORF E4 se v celoti nahaja znotraj ORF E2 (nt, 3.369-3.794) in ne vsebuje svojega start kodona. Zaradi prisotnosti visoko ohranjenega spojitenega donorskoga mesta RNA (AAG/GUASNR) v genu E1, in spojitenega akceptorskega mesta RNA (GUYACYAG/YU) v genu E2, se E4 najverjetneje prepisuje iz procesirane mRNA, ki je sestavljena iz prvih nekaj nukleotidov gena E1 (nt, 1.030-1.045) in večine zapisa za gen E4 (nt, 3.403-3.794) (Slika 11). Vsebnost proлина v beljakovini E1/E4 je značilno visoka in predstavlja 19,3 % vseh ak.

Beljakovina E6 vsebuje dva ohranjena cinkova prsta (angl. *zinc-finger domain*; CxxC(x)₂₉CxxC), ki sta ločena s 36 ak. Znotraj beljakovine E6 smo našli številna PDZ-vezavna mesta (XX(S/T/Y)X(V/L/M); kodoni 28-30 (nt, 82-90), 105-1/7 (nt, 313-321) in 156-158 (nt, 466-474)), ki omogočajo interakcijo beljakovine E6 s številnimi celičnimi beljakovinami.

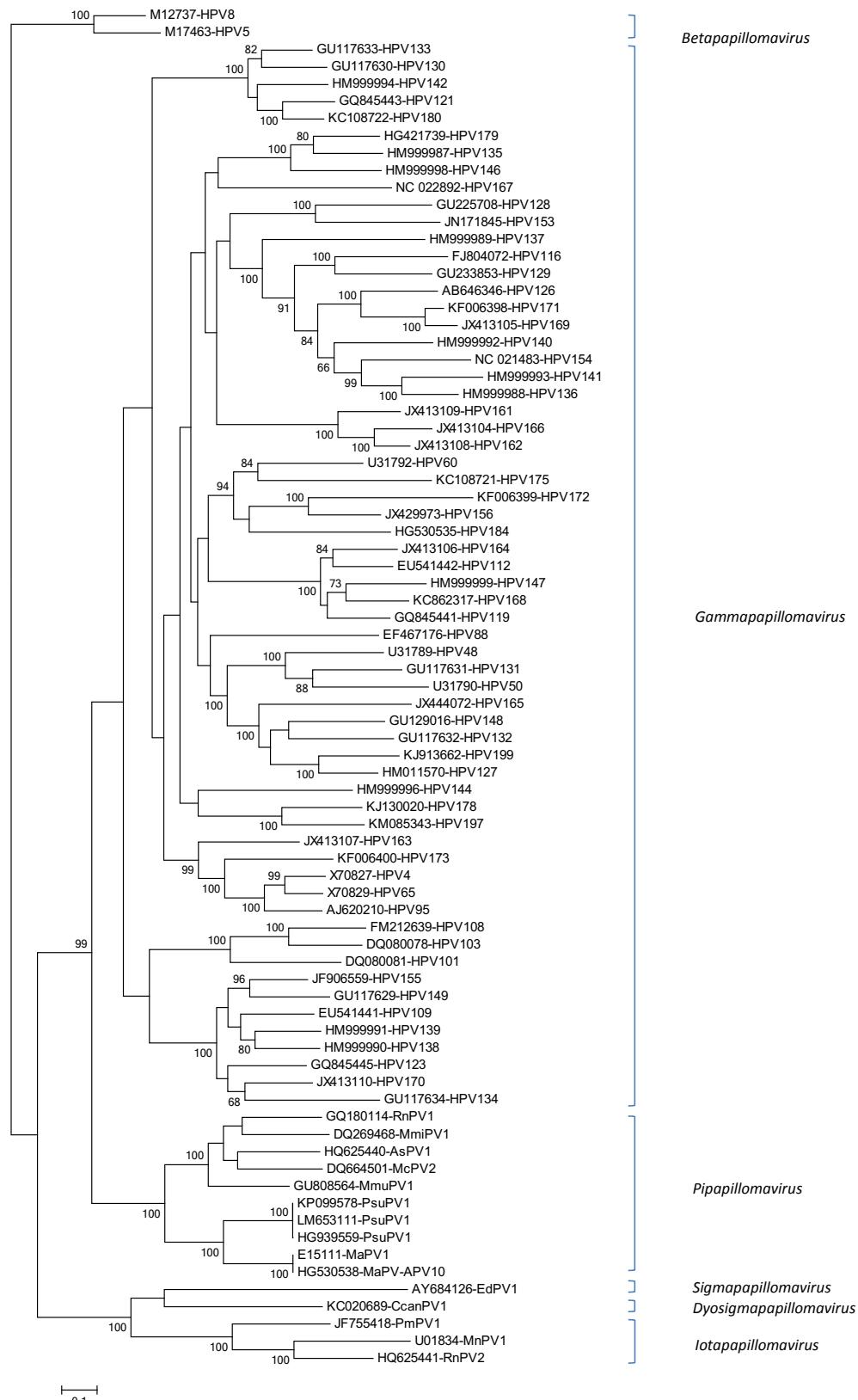
Beljakovina E7 vsebuje en cinkov prst in ne vsebuje ohranjene domene (LxCxE) za vezavo s celično retinoblastomsko beljakovino (pRb).

NLS-podobna zaporedja smo našli tudi na karboksilnih koncih beljakovin L1 in L2. Znotraj beljakovine L2 smo opredelili prisotnost transmembranske domene (ILYLGGIGTGRGSG; kodoni 52-67; nt, 4.192-4.239), na aminskem koncu beljakovine pa tudi prisotnost ohranjene domene, ki predstavlja mesto cepljena beljakovine s celično furinsko proteazo (R-X-K/R-R; kodoni 9-12; nt, 4.063-4.074) in potencialno poliadenilacijsko mesto (AATAAA; nt, 4.138-4.143), ki sodeluje pri procesiranju zgodnjih virusnih mRNA.

S primerjavo nukleotidnega zaporedja PsuPV1 (pristopna št. LM653111) iz tumorja ustne votline sibirskega hrčka (199914 mž; št. vzorca APV34) z referenčnim zaporedjem PsuPV1 (pristopna št. HG939559) smo polimorfizme posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphism*; SNP) dokazali na nt pozicijah 1.012 (E7: C/T – A138V), 1.170 (E1: C/T), 2.922 (E2: C/T – A41V), 6.576 (L1: C/T – H291Y), 7.434 (LCR: A/G), 7.438 (LCR: G/A) in 7.466 (LCR: T/C), medtem ko smo s primerjavo referenčnega genoma PsuPV1 z izolatom PsuPV1 (pristopna št. KP099578) iz klinično normalne ustne sluznice sibirskega hrčka (št. vzorca APV105) dokazali posamezne SNP na nt pozicijah 1.012 (E7: C/T – A138V), 2.922 (E2: C/T – A41V) in 6.576 (L1: C/T – H291Y).

4.4 Filogenetska opredelitev genoma PsuPV1

Na osnovi filogenetskega drevesa, ki smo ga izrisali na podlagi vseh dostopnih nukleotidnih zaporedij gena L1 PV glodavcev, 64 sorodnih HPV in treh nukleotidnih zaporedij PsuPV1, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, smo PsuPV1 uvrstili v rod *Pi-PV*, ki vsebuje PV večine glodavcev (Slika 12).



Slika 12: Filogenetska uvrstitev virusa PsuPV1. Drevo največje verjetnosti zajema L1 nukleotidno zaporedje treh PsuPV1 izolatov, vseh PV glodavcev in 64 sorodnih HPV. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti.

Figure 12: A maximum likelihood algorithm tree inferred from L1 nucleotide sequences of PsuPV1, 11 other rodent PVs, 62 Gamma-PVs and two Beta-PVs, retrieved from GenBank and PAVE sequence databases on May 22 2015. The numbers at the internal nodes represent bootstrap support values, determined for 1000 iterations by the maximum likelihood method.

Kot je razvidno iz slike 12 je PsuPV1 filogenetsko najbolj soroden MaPV1, ki je bil osamljen pri sirijskem oz. zlatem hrčku (*M. auratus*) in ga uvrščamo v vrsto *Pi-1*. V preglednici 5 so prikazani rezultati primerjave posameznih genov (beljakovin) PsuPV1, s posameznimi geni (beljakovinami) filogenetsko najbolj sorodnega genotipa MaPV1 in bližnje sorodnega AsPV1, ki je bil osamljen pri gozdni miši (*A. sylvaticus*) in ga uvrščamo v vrsto *Pi-2*. Kot je razvidno iz preglednice 5 so posamezni geni (beljakovine) PsuPV1 najbolj podobni posameznim genom (delež podobnosti: med 54,8 in 75,9 %) oz. beljakovinam (delež podobnosti: med 48,2 in 94,6 %) MaPV1.

Preglednica 5: Deleži podobnosti med posameznimi geni (beljakovinami) PsuPV1 in geni (beljakovinami) filogenetsko najbolj sorodnih genotipov MaPV1 in AsPV1.

Table 5: Percentage similarity between full genome and individual genes of PsuPV1, MaPV1, and AsPV1.

	PsuPV1 (PsuPV1REF, G939559)	MaPV1 (MaPV1REF, E15111)	AsPV1 (AsPV1REF, HQ625440)
E6			
nt	61,3 %	55,6 %	
ak	63,3 %	59,5 %	
E7			
nt	59,0 %	51,5 %	
ak	61,8 %	52,9 %	
E1			
nt	74,8 %	65,0 %	
ak	89,4 %	76,1 %	
E2			
nt	67,5 %	56,4 %	
ak	71,7 %	58,6 %	
E4			
nt	54,8 %	50,2 %	
ak	48,2 %	46,9 %	
L1			
nt	75,9 %	67,8 %	
ak	94,6 %	84,0 %	
L2			
nt	74,4 %	60,5 %	
ak	89,9 %	69,4 %	

Legenda: nt – nukleotidno zaporedje. ak – aminokislinsko zaporedje.

4.5 Patohistološka preiskava tumorskih vzorcev, PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen-RT-PCR in PsuPV1-značilna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

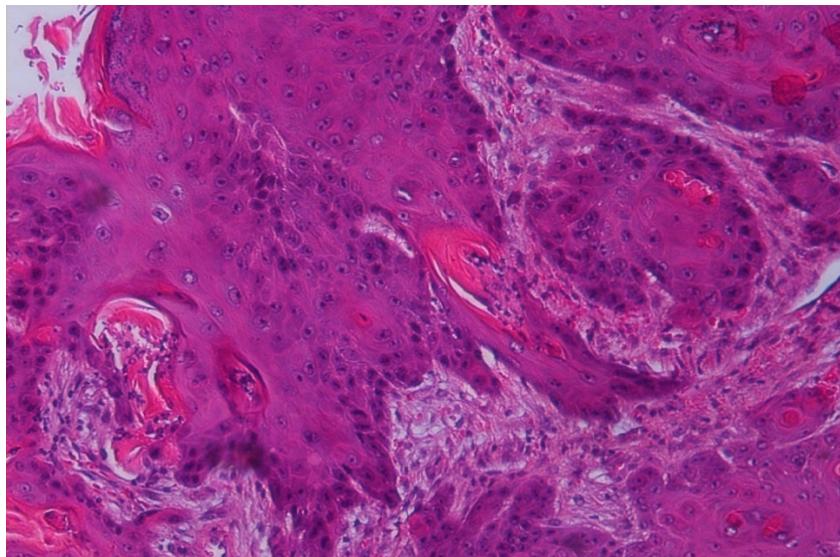
Patohistološka preiskava tumorjev sibirskega hrčka, pri katerem je bil prvotno osamljen virus PsuPV1, je razkrila adenokarcinom maternice na dveh FFPE tkivnih vzorcih, adenomiom maternice na enem FFPE tkivnem vzorcu, hibernom/tumor granularnih celic na dveh FFPE tkivnih vzorcih in normalno tkivo jajčnikov ter jajcevodov na preostalih dveh FFPE tkivnih vzorcih. Z uporabo PsuPV1 RT-PCR je bil virus pri omenjeni živali zaznan v vseh FFPE tkivnih vzorcih, kljub temu pa je bil pri istih vzorcih rezultat PsuPV1-značilne FISH negativen (Preglednica 6).

Preglednica 6: Klinične in patohistološke značilnosti tumorjev ter rezultati PsuPV1 RT-PCR in PsuPV1-značilne FISH.

Table 6: Clinical and histopathological characteristics of tumors and results of PsuPV1 RT-PCR and PsuPV1-specific FISH.

Št. živali	Klinična diagnoza	Tkivni vzorec (FFPE)	Patohistološka diagnoza (organ)	PsuPV1 RT-PCR	PsuPV1 FISH
I. 90812 mž	Tvorba na maternici	OBK 152/13 B1	Adenokarcinom (maternica)	Poz.	Neg.
	Tvorba na maternici	OBK 152/13 B2	Adenokarcinom (maternica)	Poz.	Neg.
	Tvorba na maternici	OBK 152/13 B3A	Adenomiom (maternica)	Poz.	Neg.
	Spremenjeni jajčniki	OBK 152/13 B4A	Normalno tkivo (jajčniki in jajcevod)	Poz.	Neg.
	Spremenjeni jajčniki	OBK 152/13 B4B	Normalno tkivo (jajčniki in jajcevod)	Poz.	Neg.
	Tvorba v podkožju prednje noge	OBK 152/13 B5	Hibernom/Tumor granularnih celic	Poz.	Neg.
2. 19914 mž	Tvorba v podkožju prednje noge	OBK 152/13 B6	Hibernom/Tumor granularnih celic	Poz.	Neg.
	Tvorba v ustni votlini	OBK 38/14 B1	Ploščatocelični karcinom	Poz.	Poz.
	Tvorba v ustni votlini	OBK 38/14 B2	Ploščatocelični karcinom	Poz.	Poz.
	Tvorba v ustni votlini	OBK 38/14 B3	Ploščatocelični karcinom	Poz.	Poz.

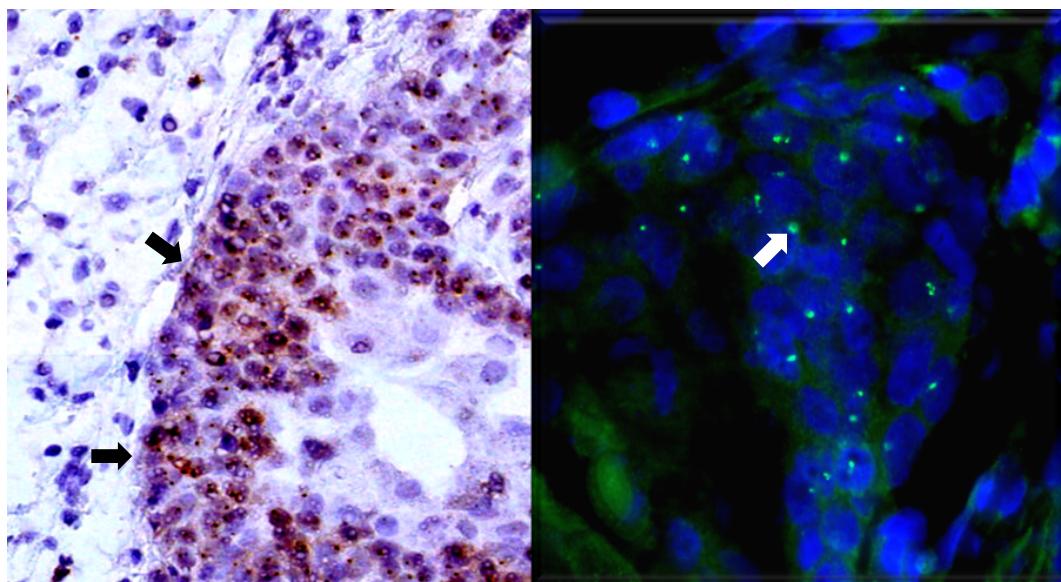
Patohistološka preiskava sibirskega hrčka s papilomu podobno novotvorbo v ustni votlini, je razkrila ploščatocelični karcinom v vseh treh FFPE tkivnih vzorcih (Preglednica 6 in Slika 13).



Slika 13: Ploščatocelični karcinom pri sibirskem hrčku z oralno neoplazijo (100× povečava) (Foto: Tanja Švara).

Figure 13: Squamous cell carcinoma in Siberian hamster with oral neoplasia (100× magnification).

V vseh treh vzorcih smo prav tako dokazali prisotnost PsuPV1 s PsuPV1 RT-PCR in s PsuPV1-značilno FISH (Preglednica 6 in Slika 14).



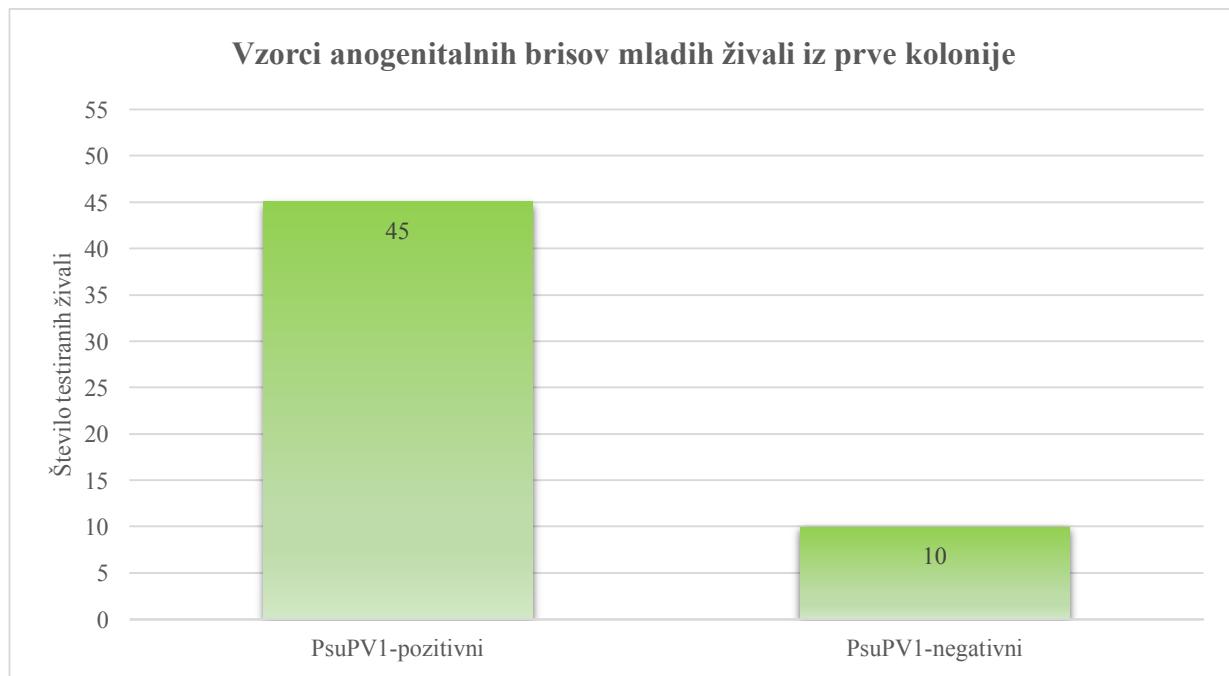
Slika 14: PsuPV1-značilna ISH (levo, črni puščici) in PsuPV1-značilna FISH (desno, bela puščica) v arhivskih tkivnih vzorcih oralne neoplazije sibirskega hrčka (Foto: Anton Hopman).

Figure 14: PsuPV1-specific ISH (left, black arrows) and PsuPV-specific FISH (right, white arrow) in archival tissue samples of oral neoplasia of a Siberian hamster.

Virusno breme PsuPV1 v svežem zamrznjenem tkivnem vzorcu novotvorbe na maternici sibirskega hrčka (90812 mž; oznaka vzorca v preglednici 6: OBK 152/13 B1), iz katerega smo prvotno osamili novi virus, smo ocenili na 2,49 virusnih kopij/gostiteljsko celico, virusno breme PsuPV1 v vzorcu tvorbe na področju mlečne žleže iste živali (oznaka vzorca v preglednici 6: OBK 152/13 B5) na 28,41 virusnih kopij/celico ter virusno breme PsuPV1 v svežem tkivnem vzorcu tumorja ustne votline druge živali (19914 mž; oznaka vzorca v preglednici 6: OBK 38/14 B2) na 22,95 virusnih kopij/celico.

4.6 Prevalenca PsuPV1 pri mladih in odraslih sibirskih hrčkih

Prevalenco okužbe s PsuPV1 smo najprej opredelili pri 110 mladih sibirskih hrčkih brez klinično izraženih sprememb iz dveh neodvisnih kolonij. V prvi koloniji smo prisotnost PsuPV1 DNA dokazali v 19/24 (79,2 %) brisov anogenitalnega predela samčkov in v 26/31 (83,9 %) brisov anogenitalnega predela samičk (Slika 15).

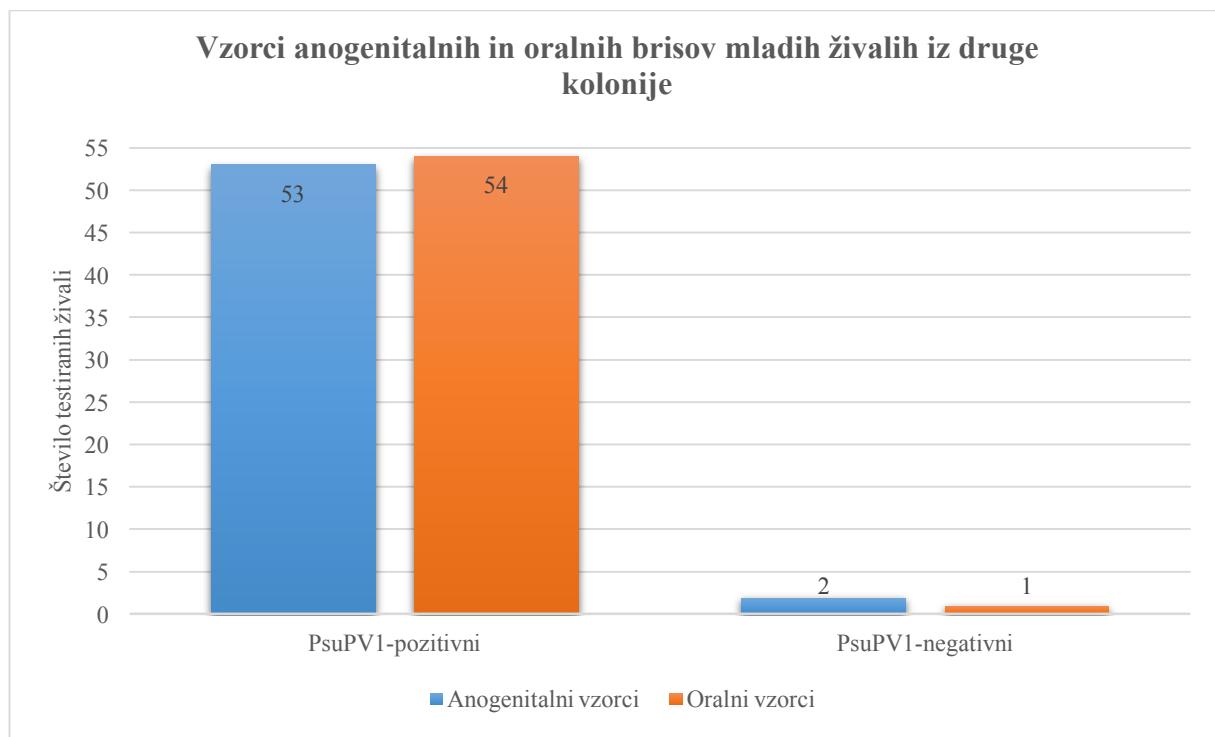


Slika 15: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v anogenitalnih brisih mladih sibirskih hrčkov iz prve kolonije.

Figure 15: Diagram of all anogenital smear specimens taken from young Siberian hamsters in the first colony.

V drugi koloniji smo prisotnost PsuPV1 DNA dokazali v 23/25 (92,0 %) brisov anogenitalnega predela samčkov in v 30/30 (100,0 %) brisov anogenitalnega predela samičk.

Dodatno smo v drugi koloniji prisotnost PsuPV1 dokazovali tudi v brisih ustne votline in PsuPV1 DNA dokazali v 25/25 (100,0 %) brisov ustne votline samčkov in v 29/30 (96,7 %) brisov ustne votline samičk (Slika 16).

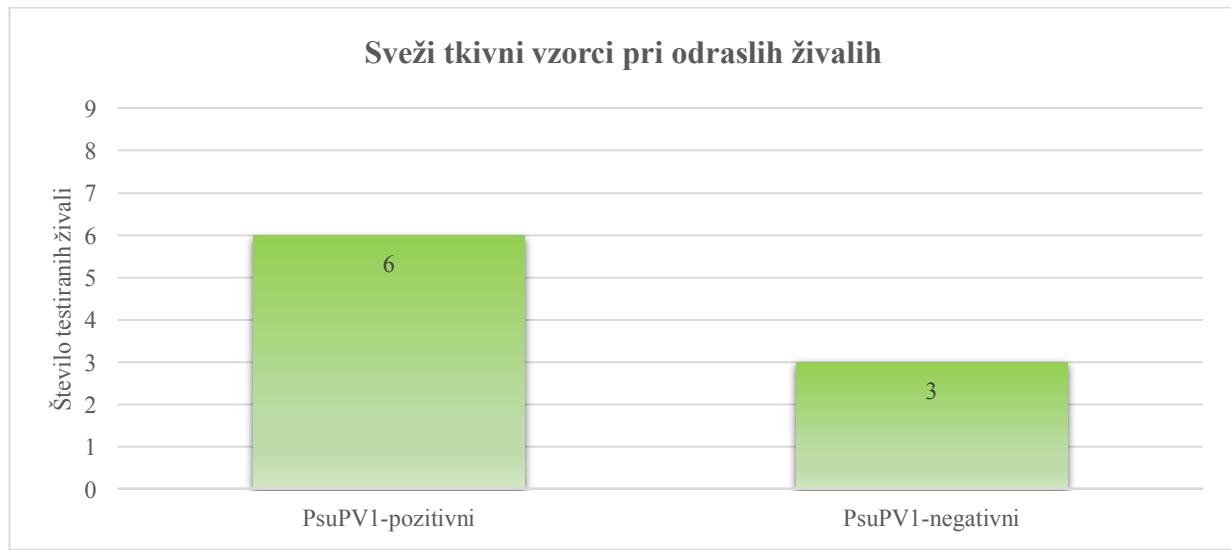


Slika 16: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v anogenitalnih in oralnih brisih mladih sibirskih hrčkov iz druge kolonije.

Figure 16: Diagram of all anogenital and oral smear specimens taken from young Siberian hamsters in the second colony.

Pri štirih odraslih živalih, ki so živele pri lastnikih kot hišni ljubljenčki, smo prisotnost PsuPV1 dokazali v anogenitalnih in oralnih brisih dveh živali, drugi dve živali pa sta bili PsuPV1-negativni.

V svežih tkivnih vzorcih 9 odraslih sibirskih hrčkov, vključno z vzorci enega tumorja vagine, 3 tumorjev jajčnikov, 3 tumorjev maternice, 3 tumorjev mlečne žleze, 3 tumorjev glave ter vrata (eden tumor uste votline in dva tumorja s področja ušesa), smo okužbo s PsuPV1 opredelili pri 6/9 (66,6 %) živali (Slika 17). Natančnejši rezultati so prikazani v preglednici 7.



Slika 17: Grafični prikaz dokazovanja PsuPV1 v svežih tkivnih vzorcih odraslih sibirskih hrčkov.

Figure 17: Diagram of all fresh tissue specimens taken from adult Siberian hamsters.

Preglednica 7: Rezultati PsuPV1 RT-PCR v svežih tkivnih vzorcih.

Table 7: Results of PsuPV1 RT-PCR in fresh tissue samples.

Št. živali	Spol	Način odvzema	Klinična diagnoza	Patohistološka diagnoza	Sveži tkivni vzorec PsuPV1 RT-PCR
1. 31312 mž	♀	Kirurški poseg	Tvorba ob vagini	Karcinom	Poz.
2. 80112 mž	♀	Kirurški poseg	Tvorba v podkožju prednje noge (tumor mlečne žleze)	Adenom	Neg.
			Spremenjeni jačniki	Normalno tkivo	Neg.
			Tvorba na maternici	Normalno tkivo	Neg.
3. 1213 mž	♀	Patoanatomska preiskava	Spremenjeni jajčniki	Normalno tkivo	Poz.
4. 3014 mž	♀	Patoanatomska preiskava	Tvorba na maternici	Adenokarcinom/Tumor granularnih celic	Poz.
			Tvorba na maternici	Tumor granularnih celic	Poz.
5. Brez kartotekе	♀	Kirurški poseg	Tvorba v podkožju prednje noge (tumor mlečne žleze)	Karcinom	Poz.
6. 22315 mž	♂	Kirurški poseg	Tumor ustne votline	Fibrosarkom	Poz.
7. 22214 mž	♂	Kirurški poseg	Tvorba na ušesu	Ploščatocelični karcinom	Neg.
8. 31514 mž	♀	Kirurški poseg	Tvorba v podkožju prednje noge (tumor mlečne žleze)	Adenom	Neg.
			Spremenjeni jajčniki	/	Neg.
9. 22314 mž	♀	Kirurški poseg	Tvorba na ušesu	Adenokarcinom	Poz.

5 RAZPRAVA

Papilomavirusi sestavlajo veliko in izjemno raznoliko skupino majhnih DNA virusov brez zunanje ovojnica in so tesno povezani z nastankom različnih benignih in malignih neoplastičnih sprememb kožnega ter sluzničnega epitelija ljudi in živali.

Hrčki so glodavci, ki se s sedmimi rodovi in 25 različnimi vrstami uvrščajo v poddružino *Cricetinae*. Do danes je bil sirijski oz. zlati hrček edini predstavnik svoje poddružine, pri katerem je bila odkrita okužba s PV (Iwasaki in sod., 1997). Iwasaki in sodelavci so pri omenjeni vrsti odkrili nov genotip PV, ki so ga osamili iz ustne votline odraslega samca ter ga poimenovali oralni papilomavirus hrčkov (angl. *hamster oral papillomavirus*; HOPV); zaradi posodobljenga načina razvrščanja/poimenovanja PV je bil HOPV pozneje preimenovan v *Mesocricetus auratus papillomavirus type 1* (MaPV1; pristopna št. v GenBank: E15111). Dodatno so v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa pred kratkim iz anogenitalne lezije dve leti stare samice zlatega hrčka osamili PV (pristopna št. HG530538) z 99,9 % (7.639/7.647) podobnostjo referenčnemu nukleotidnemu zaporedju MaPV1, kar nakazuje, da MaPV1 lahko okuži tako anogenitalno kot tudi ustno sluznico živali (neobjavljeni podatki).

V sklopu raziskovalne naloge smo odkrili in popolnoma molekularno in filogenetsko opredelili prvi genotip PV, *Phodopus sungorus papillomavirus type 1* (PsuPV1), ki okužuje sibirske hrčke in predstavlja šele drugi osamljen genotip PV v poddružini hrčkov. Izhodiščne izolate PsuPV1 smo pridobili iz novotvorbe maternice in tumorske mase s podkožja ob prednji levi nogi na področju mlečne žleze dve leti stare samice sibirskega hrčka s pomočjo dveh klasičnih reakcij PCR z uporabo predhodno opisanih OZ FAP64/FAP6085F ter E1Gamma-F/E1Gamma-R (Forsslund in sod., 2003; Chouhy in sod., 2013). Na podlagi primerjave pridobljenih delnih nukleotidnih zaporedij genov L1 in E1 z vsemi nukleotidnimi zaporedji v genski banki GenBank smo dokazali, da smo našli potencialno nov genotip PV, ki smo ga preliminarno uvrstili v rod *Pi-PV*, v katerga uvščamo tudi PV, osamljene pri laboratorijski miši, gozdni miši, mnogosesni miši, pritlikavi miši, sivi podgani in sirijskem oz. zlatem hrčku. Celotno nukleotidno zaporedje potencialno novega genotipa PV smo pomnožili s pomočjo reverzne reakcije PCR z uporabo dveh setov novo-razvitih OZ ter v nadaljevanju oba pridelka PCR vklonirali v ločena plazmidna vektorja in z metodo pomikanja OZ določili celotno nukleotidno zaporedje novega virusa.

Analiza nukleotidnega zaporedja PsuPV1 je razkrila virusni genom dolžine 7.630 bp s 47,7 % vsebnostjo G + C bp. Virusni genom nosi zapis za pet zgodnjih (E1, E2, E4, E6 in E7) in dve pozni virusni beljakovini (L1 in L2) ter v skladu z ostalimi PV iz rodu *Pi-PV* ne vsebuje zapisa za virusno beljakovino E5. Nekodirajoče področje virusnega genoma LCR se nahaja med genoma L1 in E6 in vsebuje potencialno poliadenilacijsko mesto za pozne virusne mRNA, vezavna mesta za virusni beljakovini E1 in E2, vezavna mesta za številne celične dejavnike prepisovanja in vezavno mesto za celično beljakovino TBP. Medtem ko vezavno mesto za E1 v nekodirajočem področju LCR omogoča začetek virusnega podvojevanja, ki se začne z vezavo kompleksa E1/E2 na LCR, so vezavna mesta za virusno beljakovino E2 pomembna predvsem za uravnavanje prepisovanja, podvojevanja ter ohranjanja virusnega genoma (McBride, 2013). Na karboksilnem koncu beljakovine E1 smo dokazali prisotnost ohranjenega ATP-vezavnega mesta, ki predstavlja značilno lastnost ATP-odvisne DNA helikaze, ter na aminskem koncu beljakovine E1 prisotnost značilnega bipartitnega NLS, ki posreduje pri vnosu beljakovine E1 v celično jedro. Z izražanjem virusne beljakovine E1 v transfekcijskih celicah so dokazali, da se E1 večinoma kopiči v celičnem jedru, iz česar sledi, da pomnoževanje virusne DNA najverjetneje poteka v omenjenem celičnem organelu (Bergvall in sod., 2013). Ko koncentracija E1 v celičnem jedru doseže kritično mejo, se beljakovina E1 s pomočjo NES, ki smo ga dokazali znotraj zaporedja NLS, prenese v citoplazmo (Bergvall in sod., 2013). Znotraj beljakovine E2 smo dokazali prisotnost značilne transaktivacijske domene, DNA-vezavne domene in visoko ohranjenega KRXR motiva, ki je prisoten pri mnogih *Alpha*-PV in pri HPV6 ter HPV11 omogoča jedrno lokacijo in povezavo beljakovine E2 z jedrnim matriksom (Zou in sod., 2000; McBride, 2013). Beljakovina E2 ne vsebuje značilne levcinske zadrge, ki je potrebna za dimerizacijo gena E2. ORF E4 se v celoti nahaja znotraj ORF E2 in ne vsebuje svojega start kodona. Zaradi prisotnosti visoko ohranjenega spojitelvenega donorskoga mesta RNA (AAG/GUASNR) v genu E1 in spojitelvenega akceptorskega mesta RNA (GUYACYAG/YU) v genu E2 se beljakovina E4 najverjetneje prepisuje iz procesirane mRNA, ki je sestavljena iz prvih nekaj nukleotidov gena E1 in večine zapisa za gen E4. Vsebnost prolina v beljakovini E1/E4 je značilno visoka in predstavlja 19,3 % vseh ak. Beljakovina E6 vsebuje dva ohranjena cinkova prsta, ki najverjetneje sodelujeta pri nastanku multimernih beljakovinskih kompleksov (Narechania in sod., 2004; Roman in Munger, 2013). Znotraj beljakovine E6 smo našli tudi številna potencialna PDZ-vezavna mesta, ki omogočajo interakcijo beljakovine E6 s številnimi

celičnimi beljakovinami. Kljub temu, da se PDZ-vezavne domene ponavadi nahajajo na skrajnjem karboksilnem koncu beljakovine, so v številnih raziskavah poročali tudi o njihovi prisotnosti v notranjosti beljakovine (Vande Pol in Klingelhutz, 2013). Beljakovina E7 vsebuje en cinkov prst in ne vsebuje ohranjene domene za vezavo s pRb. NLS-podobna zaporedja, ki so odgovorna za usmerjanje virusnih beljakovin iz citoplazme v celično jedro, smo našli tudi na karboksilnih koncih beljakovin L1 in L2 (Zhou in sod., 1991; Nelson in sod., 2000; Wang in Roden, 2013).

Znotraj beljakovine L2 smo opredelili prisotnost transmembranske domene, ki kompleksu beljakovine L2 in virusne DNA najverjetneje omogoča pobeg iz endosoma na poti v celično jedro (Bronnimann in sod., 2013; Wang in Roden, 2013). Na aminskem koncu beljakovine L2 smo dokazali prisotnost ohranjene domene, ki predstavlja mesto cepljena beljakovine s celično furinsko proteazo. Cepitev beljakovine L2 s pomočjo celične furinske proteaze omogoča konformacijsko spremembo virusne kapside, ki je nujna za uspešno vključitev virusa v bazalne celice gostitelja (Wang in Roden, 2013). Gen L2 vsebuje tudi potencialno poliadenilacijsko mesto, ki sodeluje pri procesiranju zgodnjih virusnih mRNA. Na osnovi rezultatov molekularne analize virusnega genoma lahko zaključimo, da PsuPV1 nosi zapise za značilne PV-beljakovine z večino ohranjenih funkcionalnih domen, ki virusu omogočajo, da zaključi svoj življenjski krog in okuži nove gostiteljske celice. Virusni genom PsuPV1 prav tako vsebuje visoko ohranjeno nekodirajoče področje LCR, ki vsebuje značilna zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepisovanja genov PV.

V nadaljevanju raziskave smo celotno nukleotidno zaporedje PsuPV1 pridobili tudi iz ploščatoceličnega karcinoma ustne votline tri leta starega samca in iz brisa klinično zdrave ustne sluznice eno leto stare samice sibirskega hrčka. Obe pridobljeni nukleotidni zaporedji PsuPV1 smo primerjali z referenčnim nukleotidnim zaporedjem PsuPV1 (pristopna št.: HG939559) ter dokazali, da razen SNP na nukleotidnem mestu 7.466 (T/C) v nekodirajočem področju LCR, ki leži na potencialnem E1-vezavnem mestu in lahko vpliva na vezavo beljakovine, vsi ostali dokazani SNP ležijo izven pomembnih funkcionalnih domen virusnega genoma, zato je njihova biološka vloga zaenkrat še neznana.

Na osnovi filogenetskega drevesa, ki smo ga izrisali na podlagi vseh dostopnih nukleotidnih zaporedij gena L1 PV glodavcev, 64 sorodnih HPV in treh nukleotidnih zaporedij PsuPV1, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, smo potrdili preliminarно uvrstitev PsuPV1 v rod *Pi-PV*, ki

vsebuje PV večine glodavcev. PsuPV1 je filogenetsko najbolj soroden MaPV1, ki je bil do osamitve PsuPV1 edini predstavnik vrste *Pi-1*.

Genotipe PV poimenujemo po vrsti gostitelja. Kljub visoki vrstni specifičnosti genotipov PV je pri genetsko sorodnih živalskih vrstah s tesnim kožno-sluzničnim stikom občasno možen tudi medvrstni prenos virusov (Rector et al., 2013). Natančno opredeljevanje vrste gostitelja je zato zelo pomembno pri pravilnem poimenovanju novo-odkritih PV in pri opredeljevanju medvrstnih prenosov. Sibirske in ruske pritlikave hrčke težko ločimo na podlagi morfoloških lastnosti, zato smo v naši raziskavi pri vseh vključenih odraslih živalih (n=16) in pri 29,1 % (16/55) vključenih mladičkov vrsto hrčka določili s filogenetsko analizo na podlagi delnega zapisa za citokrom b in tRNA-Thr. Vseh 32 naključno izbranih hrčkov smo uvrstili v vrsto *P. sungorus*.

V sklopu raziskovalne naloge smo razvili *Pi-PV* skupinsko-značilen PCR oz. pan-*Pi-PV* PCR s klinično občutljivostjo vsaj 10 virusnih kopij PsuPV1 oz. MaPV1/celico, ki omogoča specifično pomnoževanje 330 bp velikega dela gena L1 vseh do sedaj znanih PV iz rodu *Pi-PV*. Novo-razvit pan-*Pi-PV* PCR je tako primeren za pomnoževanje že opredeljenih *Pi-PV* in za odkrivanje novih genotipov PV.

S patohistološko preiskavo tumorjev sibirskega hrčka, pri katerem je bil prvotno osamljen virus PsuPV1, smo pri vzorcu tvorbe na maternici razkrili adenokarcinom maternice na dveh FFPE tkivnih vzorcih, adenomiom maternice na enem FFPE tkivnem vzorcu, normalno tkivo jajčnikov ter jajcevodov na preostalih dveh FFPE tkivnih vzorcih, pri tvorbi v podkožju prednje noge v področju mlečne žleze pa hibernom in tumor granularnih celic na dveh FFPE tkivnih vzorcih. Z uporabo PsuPV1 RT-PCR smo virus pri omenjeni živali zaznali v vseh FFPE tkivnih vzorcih in dodatno v sveže zamrznjenem tkivnem vzorcu novotvorbe na maternici sibirskega hrčka ocenili virusno breme PsuPV1 na 2,49 virusnih kopij/celico. Na podlagi negativnega rezultata PsuPV1-značilne FISH in nizkega virusnega bremena PsuPV1 predvidevamo, da PsuPV1 ni bil etiološko povezan z nastankom novotvorbe maternice (adenokarcinom) in tvorbe na področju mlečne žleze (hibernom in tumor granularnih celic). PsuPV1 je bil najverjetnejše v maternici in jajčnikih ter v področju mlečne žleze prisoten le v latentni, klinično neznačilni obliki oz. kot posledica kontaminacije s površine kože med kirurškim posegom, kar je v skladu s predhodno objavljenimi podatki. Večino virusov iz rodov *Gamma-* in *Beta-PV* pri ljudeh povezujemo z latentnimi oz. s klinično neznačilnimi

okužbami kože, za katere je značilna odsotnost ali minimalno nastajanje zrelih virusnih delcev (Doorbar, 2013). *Gamma-* in *Beta-PV* tako najverjetneje sestavlajo del normalne virusne flore pri človeku (Antonsson in sod., 2003; Ure in Forslund, 2014). Podobno kot večino virusov iz rodov *Gamma-* in *Beta-PV* so tudi posamezne viruse, ki okužijo glodavce, osamili iz klinično zdrave kože (AsPV1), iz klinično normalne sluznice ustne votline (RnPV1), iz klinično normalne sluznice anogenitalnega predela in dlačnih mešičkov klinično zdrave kože predela glave in vratu (*Rattus norvegicus* papillomavirus type 2; RnPV2) ter iz številnih klinično zdravih tkiv (npr. jeter, ledvic, vranice in črevesja McPV2) (Nafz in sod., 2008; Schulz in sod., 2009; Schultz in sod., 2012).

S patohistološko preiskavo obsežne novotvorbe v ustni votline sibirskega hrčka smo razkrili ploščatocelični karcinom v vseh treh FFPE tkivnih vzorcih; v vseh treh vzorcih smo prav tako dokazali prisotnost PsuPV1 s PsuPV1 RT-PCR (virusno breme smo v enem vzorcu ocenili na 22,95 virusnih kopij/celico) in s PsuPV1-značilno FISH, s katero smo dokazali integracijo PsuPV1 v gostiteljski genom. Integracija virusnega genoma v človeški genom je eden izmed ključnih dogodkov pri maligni preobrazbi celic materničnega vratu. Integracija HPV v človeški genom pa predstavlja tudi enega izmed ključnih dokazov virusne etiologije pri nastanku raka v predelu glave in vratu, saj lahko do maligne preobrazbe celic v tem predelu pride tudi zaradi prisotnosti drugih karcinogenih dejavnikov (kajenje, prekomerno uživanje alkohola ipd.) (Pannone in sod., 2012). Na podlagi rezultatov PsuPV1-značilne FISH in predhodno objavljenih podatkov predvidevamo, da je PsuPV1 bil povezan z nastankom ploščatoceličnega karcinoma ustne votline.

Dodatno smo v svežih tkivnih vzorcih odraslih živali, vključno s tumorskimi masami vagine, maternice, novotvorbami mlečnih žlez in tumorji glave ter vratu, okužbo s PsuPV1 opredelili pri 6/9 (66,6 %) živali. Rezultati naše raziskovalne naloge nakazujejo, da se okužbe s PsuPV1 pri sibirskih hrčkih pojavljajo; za opredelitev virusne vloge pri nastanku lezij odraslih živali pa bi v nadaljevanju lahko uporabili novo-razvito PsuPV1-značilno FISH.

V zadnjem delu raziskovalne naloge smo prevalenco okužbe s PsuPV1 najprej opredelili pri 110 mladih sibirskih hrčkih brez klinično izraženih sprememb iz dveh neodvisnih kolonij. V prvi koloniji smo prisotnost PsuPV1 DNA dokazali pri 79,2 % brisov anogenitalnega predela samčkov in pri 83,9 % brisov anogenitalnega predela samičk. V drugi koloniji smo prisotnost PsuPV1 DNA dokazali pri 92,0 % brisov anogenitalnega predela samčkov in pri vseh brisih

anogenitalnega predela samičk. Dodatno smo v drugi koloniji prisotnost PsuPV1 dokazovali tudi v brisih ustne votline in PsuPV1 DNA dokazali pri vseh brisih ustne votline samčkov in pri 96,7 % brisov ustne votline samičk. Od štirih odraslih živalih, ki so živele pri lastnikih kot hišni ljubljenčki, smo prisotnost PsuPV1 dokazali pri dveh vzorčenih živalih, tako v anogenitalnem predelu kot tudi v ustni votlini.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da so sibirski hrčki pogosto okuženi s PsuPV1, ki pri hrčkih povzroča latentne, klinično neznačilne okužbe klinično normalne ustne in anaogenitalne sluznice ter posameznih organov (koža in rodila). Sibirski hrčki se lahko s PsuV1 okužijo že v zgodnji mladosti (starost 4-6 tednov). Domnevamo, da PsuPV1 pri posameznih odraslih živalih povzroča nastanek ploščatoceličnega karcinoma ustne votline. Povezava PsuPV1 z nastankom tumorjev maternice zaenkrat še ni dokončno opredeljena. Podatki naše obsežne raziskave so temelj za nadaljno raziskovanje naravnega poteka bolezni po okužbi s PsuPV1. Natančen začetek in trajanje okužbe ter etiološko povezavo PsuPV1 z nastankom značilnih sprememb bi lahko ugotovili z nekajletnim opazovanjem kolonije s PsuPV1-okuženih hrčkov.

6 SKLEPI

- V sklopu raziskovalne naloge smo odkrili in popolnoma molekularno in filogenetsko opredelili prvi genotip PV, *Phodopus sungorus* papillomavirus type 1 (PsuPV1), ki lahko okuži sibirske hrčke in predstavlja šele drugi osamljen genotip PV v poddružini hrčkov.
- Na osnovi filogenetske analize smo potrdili preliminarno uvrstitev PsuPV1 v rod *Pi-PV*, ki vključuje genotipe PV večine glodavcev. PsuPV1 je filogenetsko najbolj soroden MaPV1, ki lahko okuži zlate hrčke in je bil do osamitve PsuPV1 edini predstavnik vrste *Pi-1*. Na osnovi primerjave delnega zapisa za citokrom b in tRNA-Thr različnih vrst hrčkov smo potrdili, da sta sibirski hrček in zlati hrček tudi v bližnjem medsebojnem sorodstvu.
- Na osnovi rezultatov molekularne analize virusnega genoma smo zaključili, da PsuPV1 nosi zapise za značilne virusne beljakovine z večino ohranjenih funkcionalnih domen, ki virusu omogočajo, da zaključi svoj življenjski krog in okuži nove gostiteljske celice. Virusni genom PsuPV1 prav tako vsebuje visoko ohranjeno nekodirajoče področje LCR, ki vsebuje značilna zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepisovanja genov PV.
- Pridobili smo prve podatke o genetski raznolikosti PsuPV1 in dokazali, da večina mutacij leži izven funkcionalnih domen virusnega genoma, zato predvidevamo, da se opredeljene različice PsuPV1 med seboj patogenetsko ne razlikujejo.
- V sklopu raziskovalne naloge smo razvili in uvedli PsuPV1 tipsko-značilen kvantitativen RT-PCR, z analitično občutljivostjo vsaj 10 virusnih kopij/celico, in PsuPV1-značilno FISH.
- V sklopu raziskovalne naloge smo razvili pan-*Pi-PV* PCR s klinično občutljivostjo vsaj 10 virusnih kopij PsuPV1 oz. MaPV1/celico, ki omogoča pomnoževanje dela gena L1 vseh do sedaj znanih PV iz rodu *Pi-PV*. Novo-razvit pan-*Pi-PV* PCR je tako primeren za pomnoževanje že opredeljenih *Pi-PV* in za odkrivanje novih genotipov PV.
- Z uporabo PsuPV1 RT-PCR smo prisotnost PsuPV1 dokazali v vseh tkivnih vzorcih (adenokarcinom maternice, adenomiom maternice, hibernom/tumor granularnih celic in normalno tkivo jajčnikov ter jajcevodov), ki so bili odvzeti samici sibirskega hrčka

pri kateri smo odkrili nov genotip PV. Kljub temu na podlagi negativnega rezultata PsuPV1-značilne FISH sklepamo, da PsuPV1 ni bil etiološko povezan z nastankom omenjenih sprememb in je bil pri živali prisoten le v latentni, klinično neznačilni obliki.

- V nadaljevanju smo prisotnost PsuPV1, tako s PsuPV1 RT-PCR kot tudi s PsuPV1-značilno FISH, dokazali v vseh treh tkivnih vzorcih ploščatoceličnega karcinoma ustne votline, ki so bili odvzeti samcu sibirskega hrčka, in dokazali, da PsuPV1 v posameznih primerih povzroča nastanek ploščatoceličnega karcinoma ustne votline.
- Prisotnost PsuPV1 smo dodatno dokazali v 6/9 (66,6 %) svežih tkivnih vzorcih odraslih živali, vključno s tumorskimi masami vagine, maternice, novotvorbami mlečnih žlez in tumorji glave ter vrata; zaenkrat virusna vloga pri nastanku teh novotvorb še ni opredeljena.
- Z uporabo PsuPV1 RT-PCR smo v zbirki vzorcev klinično normalne anogenitalne in ustne sluznice mladih živali iz dveh neodvisnih kolonij ($n=110$) in odraslih živali ($n=4$) dokazali, da PsuPV1 pogosto povzroča latentne, klinično neznačilne okužbe (102/114; 89,5 %).

7 ZAHVALE

Iskrena zahvala gre mentorju doc. dr. Jošku Račniku, dr. vet. med., ki mi je predstavil drugačno stran študija Veterine in me uvedel v zanimivi svet znanstvenega raziskovanja. Zahvaljujem se mu predvsem za ves vložen trud in pokazano navdušenost nad delom, njegovo usmerjanje, veliko mero potrpežljivosti, stalno dostopnost ter za vse dodeljene nasvete tako v zvezi z raziskovalnim delom, kot tudi tiste bolj življenske. Zahvala gre tudi dr. Marku Zadravcu, dr. vet. med., prav tako zaposlenega na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete v Ljubljani, ki je aktivno sodeloval kot klinik in Blažu Ciglerju, dr. vet. med., iz Veterinarskega centra Miklavžin, čigar paciente smo vključili v našo raziskovalno nalogo.

Zahvaljujem se tudi svojemu somentorju prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med. in vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki so omogočili sodelovanje obeh fakultet in na široko odprli okno raziskovanja na tem skupnem veterinarskem in medicinskem področju. Prav posebna zahvala gre znan. sod. dr. Boštjanu Kocjanu, univ. dipl. mikr. in asist. razisk. dr. Lei Hošnjak, univ. dipl. mikr., ki sta mi razkrila vse poprej neznane čare molekularne mikrobiologije. Brez njiju to raziskovalno delo zagotovo ne bi bilo mogoče.

Hvala doc. dr. Tanji Švari, dr. vet. med. za strokovno opravljeno patohistološko preiskavo na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani in dr. Antonu Hopmanu, univ. dipl. biokem. ter Monique Ummelen iz Inštituta za molekularno celično biologijo Univerze v Maastrichtu na Nizozemskem, za opravljeno FISH analizo tkivnih vzorcev v naši raziskavi.

Nenazadnje gre največja zahvala za vso podporo, skrb, zaupanje in pomoč tudi družini in prijateljem, predvsem pa sestri Nini in punci Ines.

8 LITERATURA

- Antonsson A, Erfurt C, Hazard K Holmgren V, et al. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 2003; 84: 1881–6.
- Baba Y, Takahashi K, Nakamura S. Androgen-dependent atypical fibromas spontaneously arising in the skin of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Comp Med* 2003; 53: 527–31.
- Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* 2014; 29: 303–31.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology* 2013; 445(1/2): 35–56.
- Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 2013; 445(1/2): 197–204.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens – part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009; 10: 321–2.
- Bronnimann MP, Chapman JA, Park CK, Campos SK. A transmembrane domain and GxxxG motifs within L2 are essential for papillomavirus infection. *J Virol* 2013; 87(1): 464–73.
- Bzhalava D, Mühr Ls, Lagheden C, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 2014; 4: 5807.
- Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002; 89: 249–61.
- Carelton MD, Musser GG. Murid rodents. In: Anderson SK, Jones JK, eds. Recent mammals of the world. New York: John Wiley & Sons, 1993: 289–314.
- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982; 299: 529–34.
- Chen Z, Van Doorslaer K, DeSalle R, et al. Genomic diversity and interspecies host infection of alpha12 *Macaca fascicularis* papillomaviruses (MfPVs). *Virology* 2009; 393: 304–10.

- Chouhy D, Bolatti EM, Piccirilli G, Sánchez A, Fernandez Bussy R, Giri AA. 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. *J Gen Virol* 2013; 94: 524–33.
- Claus MP, Lunardi M, Alfieri AF, Ferracin LM, Fungaro MH, Alfieri AA. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Vet Microbiol* 2008; 132: 396–401.
- Cockerill FR. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1112–20.
- Cooper JE, Knowler C, Pearson AJ. Tumours in Russian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Rec* 1991; 128: 335–6.
- Cornall AM, Roberts JM, Garland SM, et al. Anal and perianal squamous carcinomas and high-grade intraepithelial lesions exclusively associated with “low-risk” HPV genotypes 6 and 11. *Int J Cancer* 2013; 133: 2253–8.
- Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 2013; 445: 21–34.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
- de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013; 445: 2–10.
- Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109: 157–62.
- Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 2013; 3: 416–21.

Ekström J, Bzhalava D, Svenback D, Forslund O, Dillner J. High throughput sequencing reveals diversity of human papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer* 2011; 129: 2643–50.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 166–70.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71: 2449–56.

Forslund O, Antonsson A, Nordi P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999; 80: 2437–43.

Forslund O, Ly H, Higgins G. Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested 'hanging droplet' PCR. *J Virol Methods* 2003; 110(2): 129–36.

Fujs Komloš K, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumour-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: a study on 574 tissue specimens. *J Med Virol* 2012; 84: 1233–41.

García-Pérez R, Ibáñez C, Godínez JM, et al. Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: virus-host coevolution, strict host specificity, and hints for recombination. *Genome Biol Evol* 2014; 6(1): 94–104.

Giri I, Danos O, Yaniv M. Genomic structure of the cottontail rabbit (Shope) papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1580–4.

Gravitt PE, Manos MM. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci* 1993; 43: 5–10.

Gregory TR. Animal Genome Size Database. 2016. <http://www.genomesize.com> (21. 3. 2016).

Grissmann L. Linking human papillomaviruses to cervical cancer: a long and winding road. In: Campo MS, ed. Papillomavirus research: from natural history to vaccines and beyond. Norfolk: Caister Academic Press, 2006: 1–10.

Han R, Cladel NM, Reed CA, Christensen ND. Characterization of transformation function of cottontail rabbit papillomavirus E5 and E8 genes. *Virology* 1998; 251: 253–63.

Hazard L, O'Connor J, Scaife C. Role of radiation therapy in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12(10): 1511–20.

Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* 2005; 115(3): 419–28.

Hošnjak L, Kocjan BJ, Pirš B, Seme K, Poljak M. Characterization of two novel *Gammapapillomaviruses*, HPV179 and HPV184, isolated from common warts of a renal-transplant recipient. *PLoS One* 2015; 10: e0119154.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25748516>

Huang T. Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy. *Curr Protoc Hum Genet* 2011; 71: 19.8.1–19.8.12.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21975941>

Huebbers CU, Preuss SF, Kolligs J, et al. Integration of HPV6 and downregulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset laryngeal papillomatosis. *PLoS One* 2013; 8: e57207.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437342>

Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epi Bio Prev* 2008; 17: 1611–22.

Iwasaki T, Maeda H, Kameyama Y, Moriyama M, Kanai S, Kurata T. Presence of a novel hamster oral papillomavirus in dysplastic lesions of hamster lingual mucosa induced by application of dimethylbenzanthracene and excisional wounding: molecular cloning and complete nucleotide sequence. *J Gen Virol* 1997; 78: 1087–93.

Joh J, Hooper K, Van Doorslaer K, Sundberg JP, Jenson AB, Ghim SJ. *Macaca fascicularis* papillomavirus type 1: a non-human primate betapapillomavirus causing rapidly progressive hand and foot papillomatosis. *J Gen Virol* 2009; 90: 987–94.

Joh J, Jenson AB, King W, et al. Genomic analysis of the first laboratory-mouse papillomavirus. *J Gen Virol* 2011; 92(3): 692–8.

Johansson H, Bzhalava D, Ekström J, Hultin E, Dillner J, Forslund O. Metagenomic sequencing of HPV-negative condylomas detects novel putative HPV types. *Virology* 2013; 440: 1–7.

Johne R, Müller H, Rector A, Van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol* 2009; 17: 205–11.

Kashida Y, Ishikawa K, Arai K, Mitsumori K. Morphological characterization of skin ganglion-like cells in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Pathol* 2003; 40: 548–55.

Katoh K, Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 2010; 26(15): 1899–900.

Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J, Poljak M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(9): 808–16.

Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, Potočnik M, Fujs K, Babic DZ. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 255–9.

Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *J Clin Virol* 2016; 76 (Suppl. 1): S88–97.

Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumor-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: a study on 574 tissue specimens. *J Med Virol* 2012; 84: 1233–41.

Kondo H, Onuma M, Shibuya H, Sato T. Spontaneous tumors in domestic hamsters. *Vet Pathol* 2008; 45: 674–80.

Lange CE, Tobler K, Schraner, et al. Complete canine papillomavirus life cycle in pigmented lesions. *Vet Microbiol* 2013; 162: 388–95.

Li J, Pan Y, Xu Z, et al. Improved detection of human papillomavirus harbored in healthy skin with FAP6085/64 primers. *J Virol Methods* 2013; 193: 633–8.

Loignon M, Drobetsky EA. The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis* 2002; 23: 35–45.

Longworth MS, Laiminis LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol and Mol Biol* 2004; 68: 362–72.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190–212.

Marincevic-Zuniga Y, Gustavsson I, Gyllensten U. Multiply-primed rolling circle amplification of human papillomavirus using sequence-specific primers. *Virology* 2012; 432: 57–62.

McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 2008; 72: 155–205.

McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 2013; 445(1/2): 57–79.

Meshchersky IG, Feoktistova NY. Intraspecific organization of dwarf hamsters *Phodopus campbelli* and *Phodopus sungorus* (*Rodentia: Cricetinae*) basing on mtDNA analysis. *Dokl Biol Sci* 2009; 424: 35–8.

Miedel EL, Hankenson FC. Djungarian Hamster. In: Anderson LC, Otto G, Pritchett-Corning KR, Whary MT, Fox JG, eds. *Laboratory animal medicine: biology and diseases of hamsters*. 3rd ed. London: Elsevier Inc., 2015: 235–7.

Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; 62: 870–8.

Mokili JL, Dutilh BE, Lim YW, et al. Identification of a novel human papillomavirus by metagenomics analysis of samples from patients with febrile respiratory illness, *PLoS One* 2013; 8: e58404.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554892>

Morgan IM, Campo MS. Recent developments in bovine papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 2000; 11: 127–32.

Munday JS, Tucker RS, Kiupel M, Harvey CJ. Multiple oral carcinomas associated with a novel papillomavirus in a dog. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27(2): 221–5.

Munger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 7888–98.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.

Nafz J, Schafer K, Chen SF, et al. A novel rodent papillomavirus isolated from anogenital lesions in its natural host. *Virology* 2008; 374: 186–97.

Narechania A, Terai M, Chen Z, DeSalle R, Burk RD. Lack of the canonical pRB-binding domain in the E7 ORF of artiodactyl papillomaviruses is associated with the development of fibropapillomas. *J Gen Virol* 2004; 85(5): 1243–50.

Nelson LM, Rose RC, LeRoux L, Lane C, Bruya K, Moroianu J. Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* 2000; 79(2): 225–38.

Nicholls PK, Stanley MA. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol and Immunopathol* 2000; 73: 101–27.

O'Brien V, Campo MS. BPV-4 E8 transforms NIH3t3 cells, up-regulates cyclin A and cyclin A-associated kinase activity and de-regulates expression of the cdk inhibitor p27Kip1. *Oncogene* 1998; 17: 293–301.

Orth G. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin in Immunol* 2006; 18: 362–74.

Pannone G, Rodolico V, Santoro A, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 immunohistochemistry, consensus PCR HPV-DNA, and in situ hybridization. *Infect Agent Cancer* 2012; 29; 7: 4.

Peh WL, Middleon K, Christensen N, et al. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 2002; 76: 10401–16.

Pimenoff VN, Felez-Sanchez M, Tous S, et al. Disagreement in high-grade/low-grade intraepithelial neoplasia and high-risk/low-risk HPV infection: clinical implications for anal cancer precursor lesions in HIV-positive and HIV-negative MSM. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(6): 605.e11–e9.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X15002979>

Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 143–9.

Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo: nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.

Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Adv Anatomic Pathol* 1998; 5: 216–34.

Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses (HPV). *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(10): 1139–62.

Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology* 2013; 445: 213–223.

Rector A, Stevens H, Lacave G, et al. Genomic characterization of novel dolphin papillomaviruses provides indications for recombination within the *Papillomaviridae*. Virology 2008; 378: 151–61.

Rector A, Tachezy R, Van Ranst M. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. J Virol 2004; 78: 4993–8.

Rogovskyy AS, Chen Z, Burk RD, Bankhead T. Characterization of the North American beaver (*Castor canadensis*) papillomavirus genome. Vet Microbiol 2014; 168(1): 214–20.

Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. Virology 2013; 445(1/2): 138–68.

Sanders CM, Stenlund A. Mechanism and requirements for bovine papillomavirus, type 1, E1 initiator complex assembly promoted by the E2 transcription factor bound to distal sites. J Biol Chem 2001; 276: 23689–99.

Scheel A, Lin GC, McHugh JB, et al. Human papillomavirus infection and biomarkers in sinonasal inverted papillomas: clinical significance and molecular mechanisms. Int Forum Allergy Rhinol 2015; 5: 701–7.

Schneider A. Natural history of genital papillomavirus infections. Intervirology 1994; 37: 201–14.

Schulz E, Gottschling M, Ulrich RG, Richter D, Stockfleth E, Nindl I. Isolation of three novel rat and mouse papillomaviruses and their genomic characterization. PLoS One 2012; 7(10): e47164.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047164>

Schultz E, Gottschling M, Wibbelt G, Stockfleth E, Nindl I. Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) papillomavirus and its phylogenetic position within Pipapillomavirus, primarily infecting rodents. J Gen Virol 2009; 90: 2609–14.

Staheli JP, Ryan JT, Bruce AG, Boyce R, Rose TM. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) for the detection of novel viruses in non-human primates. Methods 2009; 49: 32–41.

Stamatakis Z, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. Syst Biol 2008; 57(5): 758–71.

Stevens H, Heylen E, De Keyser K, et al. Complete genome sequence of the *Crocuta crocuta* papillomavirus type 1 (CcrPV1) from a spotted hyena, the first papillomavirus characterized in a member of the Hyaenidae. Genome Announc 2013; 1(1): pii: e00062–12.
<http://genomea.asm.org/content/1/1/e00062-12.long>

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011; 28: 2731–9.

Templeton NS. The polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 1992; 1: 58–72.

Tse H, Tsang Ak, Tsui HW, et al. Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. PLoS One 2012; 7(8): e43986 (11.str).
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058404>

Ure AE, Forslund O. Characterization of human papillomavirus type 154 and tissue tropism of gammapapillomaviruses. PLoS One 2014; 9(2): e89342.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089342>

Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, et al. The papillomavirus episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. Nucleic Acids Res 2013; 41: D571–8.

Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. Virology 2013; 445(1/2): 115–37.

Venuti A, Paolini F, Nasir L, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. Mol Cancer 2011; 10: 140.

Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 2013; 445(1/2): 175–86.

Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2005; 79: 6732–40.

Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–302.

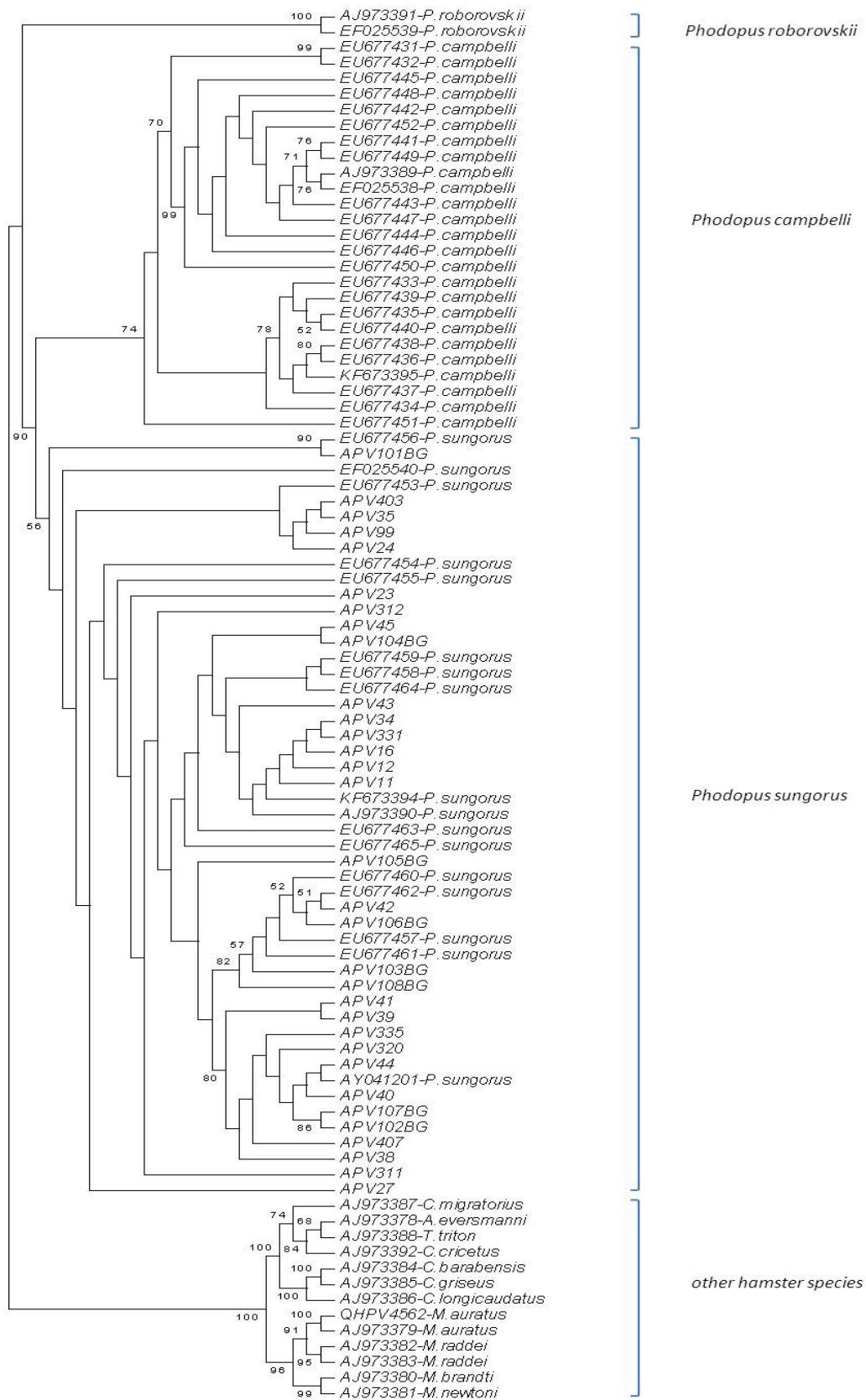
Zhou J, Doorbar J, Sun XY, Crawford LV, McLean CS, Frazer IH. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 199; 185(2): 625–32.

Zou N, Lin BY, Duan F, et al. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 2000; 74(8): 3761–70.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–50.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(2): F55–78.

9 PRILOGE



Priloga A: Filogenetska uvrstitev različnih vrst domačih hrčkov na podlagi filogenetske analize 1.112 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, sestavljenega iz delnega zapisa za citokrom b in tRNA-Thr. V filogenetsko analizo smo vključili 32 tarčnih nukleotidnih zaporedij, ki smo jih pridobili iz vzorcev hrčkov v naši raziskavi (16 jih je pripadalo odraslim živalim, 16 pa mladim živalim iz prve in druge vzorčene kolonije) in 17 tarčnih zaporedij *Phodopus sungorus* (EU677453-EU677465, AY041201, KF673394, EF025540, AJ973390), 25 zaporedij *Phodopus campbelli* (EU677431-EU677452, KF673395, EF025538, AJ973389), dve zaporedji *Phodopus roborowskii* (AJ973391 in EF025539) in ter 13 tarčnih zaporedij drugih vrst hrčkov (AJ973378-AJ973388, AJ973392, QHPV4562), ki smo jih pridobili iz genske banke GenBank. Ob glavnih razvejiščih so prikazani deleži *bootstrap* vrednosti.

Supplemental Material A: Phylogenetic comparison of different domestic hamster species. A maximum likelihood algorithm tree inferred from 32 concatenated cytochrome b and tRNA-Thr nucleotide sequences obtained in the present study (labeled as APV) and from 17 nucleotide sequences of *Phodopus sungorus*, 25 nucleotide sequences of *Phodopus campbelli*, two nucleotide sequences of *Phodopus roborowskii* and 13 nucleotide sequences from other hamster species, retrieved from the GenBank database on March 11 2014. The numbers at the internal nodes represent bootstrap support values, determined for 1000 iterations by the maximum likelihood method.

Priloga B: Celotno nukleotidno zaporedje novega genotipa PV - Phodopus sungorus papillomavirus type 1 (PsuPV1), odkritega pri sibirskega hrčku:

Supplemental Material B: The complete nucleotide sequence of Phodopus sungorus papillomavirus type 1 (PsuPV1) isolated from a Siberian hamster:

NUKLEOTIDNO MESTO

1 atgttgggtg ttgttcgcattagtctgccactaggagtg ccaagtatgacaccgagacc
61 ggtgcaggca tgaataaacc ttcaagcatg attgttacca acaatcttct catgatagtt
121 ttagaggagg agcccgtaac ggtcggataaaacggagac ggtcgcgacc actctttggg
181 agaccaatgg atctaccat aggcttgag gagctgcttag atgctcttaa gattgatgtg
241 aagcttctgc tggtgccttg tttgttctgt ggacacttgt gtaatgagca ggataagttt
301 gatttctgc aatcaggact gaaggtggtc tggaaaaatt tatgctatca tattgcttgc
361 caagcttgcgcagggtcgc cgcttatgtt gagcacgcta aatgcagggt ctgtgtgggg
421 gagcatgatt ttgttagagcg tatgacaggc aaatgtattc tgcaaactac tatgcgctgc
481 atagcgtgca tgaaagagtt aggtgcgtct gagaaactgt tggctgtttc ccagcgcgt
541 ccatttatac tcgtgcgaaa gctgtggcgt ggctattgta ggaactgctt cgtgtataa
601 tgaagggacc ggagaaccct aagttgctca ctgtggagag agcaatgcag gagatatctc
661 tgaaagacat agagctgatt ctgggaccac tggatccat gcctagctt attcctacga
721 taccagagcc acaacctgca gtggcatttc gctaccaca agtggcaacc tcgcgaccaa
781 cagtcgcgca gccgcagcca gattgtgtgg acataggaac gtcgtcactg tcaccagacc
841 aggagggaga ggaggagccg taccttgcgt tgctcgaccc atataaaatt aagacgaggt
901 gtccttcctg tcgcccgaacc ctgaggttcg ttgttgcgtc tcggcgcctt tctatccgag
961 tcctgcagga ctgtcttcg gggatctac acttcgtgt ccctacttgt gcgaaacaaa
1021 acgtgtacga tggctgacaa agaaggtaa gatggaggag aagggtatag tggctggat
1081 attgtgtctg aggctgaatg tgccgatggg gatgattcgt tagaggaccc agaggcattg
1141 tttgatcaga gtacccagga atccacattc atagatactg acgaggtgga tcagggaaat
1201 tccctgtctt tattccaaca gcagttattt caggatgatg aagaacaggta agccagccta
1261 aaacgaaagt atgcagcaac tccttccaag gaacagtcgt tagacatagc aaccttaagt
1321 ccccgattag cttctgtttc gatatcgccc cgtagtagaa cgagcaagaa gaagctctt
1381 caggacagtg gcttaggaca tgaaactcaa gattctgctt cgccggagga aacacaggag
1441 gtactatctt tgccgctgtt ctctgagccg agcagtgca cagaaaatgc agatacagcc
1501 ttactgaggt ctagcaatgt ctttgctaca tgtcttgcta ggtttaagac cgctttgg
1561 tgtagctttc cagagctgac gaggcaaataaaaggcgaca agacatgttag cccccactgg
1621 gtggtgaccg ttttcggcgc acccgaggca atggtgagg ctgccaaatt ggcttgccg
1681 acacattgtg cgtattgcca gatgagtgct gcgtatgctg acagtcggcg ggtcatcttgc
1741 ctgttagtag agtttaaggc aagcaagagc agggagacgc tccggaaatcttgc
1801 atgtttgggtg tagatgagag ctttagtgatc gcagaaccgc caaaagagcg tagcgtgc
1861 agtgcgttgtt ttttctataa gaaagtaatg ttcccttaact cgggcacatt ccagagtgg
1921 cagatgccag aatggatagc aaagcagacc ctcgtgaaac atcaggcagc ctctgcagaa
1981 tcatttgatc tcagtgcata gatacagtgg gcatacgcata atgattatgt tgatgaaagc

2041 caagtagcat ataactatgc cttgttatgcg gaagcagatg caaacgccga ggcattttta
2101 aagagcaatt gtcaggcgaa gtatgttaag gactgctgca ccatggtcag gctataacaag
2161 agacaggaaa tgagggaaat gtctatgggg cagtgggtga agaaatgctg tgaatccgta
2221 gatgaagagg gggactggaa agttatcgca gggttcctaa gatatcaagg gttaatgtt
2281 gtatgtctgc taagcgcctt acggcattta ttccctggta ctcctaagaa acattgtctc
2341 gttatatatg gtccctctga cactggaaaa tcatacttt gtaactcgct agtgcacattt
2401 ctgaggggaa aagtcatatc cttcatgaat agcaaaagcc agttctgggt acagccactc
2461 atagacagta aaataggatt tttggatgat gccacttcag catgtggca gtttatggac
2521 gtctatatgc gaaatgcatt ggatggcaat cccatatcat tggatatgaa gcataagagcc
2581 cccacacagg tcaaattgcc cccattacta gtcaccacaa atgtggatgt gcttgcaaat
2641 gatgcataca ggttctgca tagccgctt caggtgtttg cttttgagag gcctatgcc
2701 tttgatgagg atggcaatcc tcaatttcca ttgaccaaag ctaactggcg gtctttttt
2761 acaaggctgg gtaaggcagtt aggattacaa gacgaagaag atgcccaccc tgacagagcg
2821 tttcgatgca gtgcaagatc agattctcag cctaatttag agaggcagca caaggcttgc
2881 agaccacgtt gtatattggg accttgttag aaaggaaggt gccttgcaat actatgcacg
2941 ggcggccaaat atgaccagac ttggctgct gccactgccc tcccaactag gggcggaaaca
3001 caaggccaaa aaagctatac agatgggcct tctgttaagg tcccttgcag aatcaccatt
3061 tgcaaatgaa acctggactg ttacagacac tagtggtagt gtctatgaac agacagaccc
3121 tgaaaagact tttaaaaaaaaa atggtcagac tattgaggtg tggtagtaca atgacccaga
3181 gaacagtgtg gcctatactt tgtggcgcta tatctataag caggacgaaa atggacaatg
3241 gcataaatttgc gaaaggagag tggactatgc aggactgtat tatattgatc ctagtggcat
3301 gcgggtatat tatgaagatt ttttcaaga tgctgaccga tatggtcact cttcaacctg
3361 gacagtaaaa ggtgataaag atatttctgc ccctgtcaact agctccgaca aatcctggcg
3421 agcccaagag gaacagccccaa accccaagag aaggagagac aaccccacca catcgacccc
3481 ggagtggac tatccgaaaa cctccgagca agaagaacgg ccccaaacct ccaccgacac
3541 accacgagtc aagaggcagc gacaagctga ctccccctcc ggacgacgag gacgaccttgc
3601 gagtgagtcc actcccgaaa acggacgagg aggaaggaa caaagagaac cttcccccg
3661 cacctcgccc atcaacggcg gtggactctc ttatgaccag attgggtcaa gccatacaac
3721 agttccgca cgaggtattt gacgaggcca gagactgctc ctcgaggctc gggatcccc
3781 cgtcatactt ataacaggtc ctgctaattc tctaaagtgc tggcgtaata gagtcaag
3841 gaggcctgtg aggcttttgc atagaatttgc cacatgtttc ttctgggttgc tgaagggtc
3901 tggtgatggt gctggacac agagactttt aattgcatttcaaaagcaga cacaacgaga
3961 actgtttctt aagactgttc ctctaccaag gggctctaag ttttcaagg gcaatctaga
4021 cggctgtaa catcaatcat ggtcgctgta aataggccac gcagaaccaa aagagattct
4081 gcttcaaatc tatacaggca atgtcaagtc actggcaact gtcccccctga tggatggccat
4141 aaaatcgaag gcacaacact tgctgataag ctttcaaaga tatttgcag cattctataat
4201 ctggggggcc tggcattgg aacagggagg ggaagtgggg ggcacagg gatggccat
4261 ataaaccctg gtggtgcccg tataacaggc acaggcacgg ttatgaggcc tggatggcc
4321 attgatccag ttggccctaa tgatatcatt actgttgccc ccactgacag ctccatagtc
4381 cctctttgg aggcaacacc tgatatccct atagaggggg ggcctgaggt tccccggca

4441 ggtccggacg ttagcacagt tgatgtgaca gctaattgtgg accccataag tgaggtaat
4501 gtcaccacag gcagcacaat cacaatcct gactctgcag taatagatgt gcagcctgca
4561 cccagtggc ctagacgtgt cacagtatcc agaagtgaat tccagaatgc atcctatgtt
4621 tcagtcacac atccttcca gggctgggt gagagtggtg gggcccttgt ctctgccgac
4681 agcagtggat ccttgttgc ctctggccat gaactggaca taggcattat aataggtgaa
4741 aggccacttg gggaaaccaa ctttgggccc attgagctt gtaataggg taggacctag tacaagcaca
4801 ggaactgctg agtttgcacat aggtgagggt gttaataggg taggacctag tacaagcaca
4861 ccggacaatt atcttgggag ggcttaagt cgcttcagg agatatatga caggcctagg
4921 gacctgtaca acaggagggt ccagcaggc agggtgcgaa atcgggatca gtttctgggt
4981 gcacctggc ggttggtcac atacgaattt gacaatccc ctttgcagg ggtcgaggat
5041 gaggtcagcc tgatcttca acaagatctg aatgaggtcc aggccgcacc tgacacggat
5101 ttcatggaca ttattaggct tggcagggag aggatagctg agacagcaga tggtaaccgtg
5161 agaatcagca ggcttggaca gagaggcact attagaacaa ggagtggcct ccaaatttgg
5221 gggaaagtgc acttctatac agacctatca cccatagcta ctgaaaacat tgagctgtct
5281 accctgggg aggttcagg ggagtcaatg acaatagatg cattaaatga atattcactc
5341 atttctgaat ctggcattga gccggtaacc ttccctgatg aggaccttt agatgtacac
5401 agtgaagatt tctcaggctc acgcttacat attttcggg gtgggaacac acgcttggc
5461 gttgttatg agccatctga aagtttaggc gccagaacta tttcccaga cattgataacc
5521 ggtgactttg taagatatcc gcagactaat gtttctcctg ctgatatccc tggtagggac
5581 cttgtacctg ttgacccagg caccacac atagtggct ctgaattttc ttctgttgat
5641 tattatttgc atcctagctt aagacggcgc aaaagaaaac gtaattttca ttaatcttt
5701 gcaggatgtg gatgcaacca tctggaaagc tttacccccc cccagccaag cctattgcac
5761 gtgtcaaaa cacagatgaa tatatacagc ctacgtctt cctctgtcat gcaagcactg
5821 agagattgct tactgtcgga caccctact tcgaaattaa acaggacgat aaggtggtgg
5881 taccaaggt ctctggaaat cagtataggg tggcagggtt gaaactgcct gatccaaaca
5941 agttgcact tgcacagcct gacttgcata atcctgacag ggagcggta gtatggcgtc
6001 tcagaggtct agaaataggg agaggcggc ccttaggcgt agggacaacc gcacatccgt
6061 tgctaaacaa actaggtgac acggagaacc caaacaatg gcagaattcg tctaaggaca
6121 ataggcaaaa catttcaactt gatcccaagc agactcaaattt gttttaggtt gtttgtgctc
6181 cttgtacagg agaacactgg gacattgcaaa agccttgcata ccaaattaat gcaggtgatt
6241 gccccctat ccaactggg aacacagtga tccaggatgg ggacatgtgc gatattgggt
6301 ttggggctat gaacttcaag accttacagg aggacaagtc aggtgtccct ctggacataa
6361 taacctcagc ttgcaaatgg cctgacttt tgaaaatgac aaacgagata tatggggaca
6421 ggctgttctt cttcgacga aggaaacagg tctacgctag acattactt gtccgcaatg
6481 gtaatgttgg agaaaagttt ccagaacttg ctggtggcac cagttagttc tataatcaa
6541 cctctgtga tcaggaccaa aaggcagatg cctccatatacatttttgc actcccagtg
6601 gctctttgt atcaagtgc gggcaattgt ttaatcgcc tttctggctt caacgggcac
6661 agggcaataa taacggata tggaaaca atgatctgtt tataactttg gtagataata
6721 ctcgtatgt gaactttact attaattcaga agaatgctca cacagatgat tatgtgctc
6781 agaactttac gcagttaccc agacatgtgg aacagttga aatatcatgtt atatttcaga

6841 tctgcaaagt acctcttgat gctgatgttc ttgcccacct taatgtatg aatcctgaga
6901 ttctcgagga ctggAACCTG ggatttatac ctcctccaa tattccaatc cacgatgaat
6961 acagggtcat agactctctg gccactagat gccctgacca aaaccctcca aaggagaagg
7021 aagatcccta taaggattat accttctgga cggtggatct tactgagaga ttttctcagg
7081 agtagacca attcctctt ggccgtaaat acctctacca ggctgggtc agaacagtgg
7141 ccagagctgt gaagcgtaca agtactacct ctggcgctac ctaaaagagg gttgttaagc
7201 gccgtaagaa gtaattgtt tttgttgtt tttgttgtt acccatgtgc aatatttaac
7261 ctacctctgt aatttcctc attacctgct tgtgactgag cctattat tttctgctgg
7321 acattgagcc tctgtacgac tcccacctaa taaaatgtga ctaagaacat gaccatgcct
7381 tgtctcctcc ctttgcgtgc acacctgggt gtcagttgcg ccagataacct tcaagggaa
7441 ggagggttaag ctcctgctct tattttctt cagaaatatg cactttgatc aaggaccgga
7501 ttccggctga gcttgcgtc ggtgtttcta gacagttgtg taacttttag gctctgagtc
7561 aagacaactt ttggcggttt ctggcaagtt tacccgaccg ttatcgttac agtaagctct
7621 tggcagaaca