

Značilnosti okužbe s HPV

Mario Poljak, Boštjan J. Kocjan, Anja Oštrbenk, Lea Hošnjak

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana

Povzetek

Papilomavirusi predstavljajo zelo heterogeno skupino DNA virusov, ki jih povezujemo z nastankom različnih novotvorb pri ljudeh in živalih. Genom papilomavirusov predstavlja krožna dvojnovijačna DNA, velikosti približno 8 kbp, ki je sestavljena iz kodirajočega (beljakovine E1, E2, E4, (E5), E6, E7, L1 in L2) in nekodirajočega območja (LCR). V skupino človeških papilomavirusov (HPV) trenutno uvrščamo več kot 190 različnih genotipov HPV, ki so razvrščeni v pet rodov (alfa, beta, gama, mu in nu). HPV se prenašajo spolno in z neposrednim stikom kože s kožo. Okužba z visokorizičnimi genotipi iz rodu alfa, najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18, je tesno povezana z nastankom malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela v anogenitalnem predelu, in sicer z rakom materničnega vratu (>99 %), rakom zadnjika in nožnice (70–90 %) ter rakom vulve in penisa (40–47 %). Nizkorizični genotipi iz rodu alfa so povezani z nastankom anogenitalnih bradavic in papilomov grla. HPV iz rodu beta pri imunsko kompetentnih osebah najpogosteje vzpostavijo prikrito okužbo in redkeje povzročajo benigne novotvorbe na koži. Genotipi HPV iz rodov gama, mu in nu, predvsem pri imunsko oslabljenih osebah, povzročajo različne benigne spremembe na koži.

Ključne besede: Papilomavirusi, človeški papilomavirusi, razvrščanje, zgradba in pomnoževanje, molekularna patogeneza okužbe, model karcinogeneze, imunologija okužbe

Razvrščanje in splošne lastnosti HPV

Virusi iz družine *Papillomaviridae* ali papilomavirusi (PV) so zelo heterogena in široko razprostranjena skupina DNA-virusov, ki povzročajo različne novotvorbe pri ljudeh in živalih. Na podlagi skladnosti nukleotidnih zaporedij PV razvrščamo v različne virusne genotipe, ki predstavljajo tudi osnovno taksonomsko enoto pri njihovi klasifikaciji. PV najdemo pri večini sesalcev in ptičev ter nekaterih plazilic. Nekateri, predvsem evolucijsko nižji sesalci, imajo samo en za vrsto značilen genotip, medtem ko je raznolikost PV pri opicah in ljudeh mnogo večja. Skupino genotipov PV, ki so pomembni v humani medicini, imenujemo človeški papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) (1–3).

Kot novi genotip PV opredelimo vsak izolat, katerega nukleotidno zaporedje gena L1 se razlikuje za več kot 10 % od gena L1 vseh predhodno opredeljenih genotipov PV. V primeru, ko je neskladnost med dvema zaporedjema gena L1 med 2 in 10 %, je to virusni podtip. Če je razlika manjša od 2 %, novi virus opredelimo kot podtipsko (genetsko) različico enakega genotipa PV. Vse genotipe PV (do avgusta 2014 je bilo popolnoma opredeljenih več kot 280 genotipov) razvrščamo v 37 rodov, od katerih jih je 23 označenih z grškimi črkami alfa–omega. Ker je število novoodkritih virusov presežilo število črk v grški abecedi, preostale rodove označujemo

z grškimi črkami *delta–rho*, ki imajo dodano predpono *dys*. Skladnost nukleotidnih zaporedij v celotnem genu L1 je med različnimi rodovi PV manjša kot 60 %. Virusne vrste znotraj posameznega rodu izkazujejo 60–70 % nukleotidno skladnost v genu L1, medtem ko genotipi znotraj posamezne vrste izkazujejo 71–89 % nukleotidno skladnost v genu L1. Za večino genotipov HPV, uvrščenih v eno vrsto, velja, da imajo podobne biološke lastnosti, to je tropizem za specifična tkiva in/ali organe ter podoben tumorogeni potencial (1, 2).

Tradicionalno so genomska zaporedja PV pridobivali iz epitelnih novotvorb s pomočjo klasičnih tehnik kloniranja, ki so primerne predvsem za opredeljevanje genotipov HPV, ki so v kliničnem vzorcu prisotni v zelo visokih koncentracijah. Z napredovanjem molekularne biologije in razvojem tehnik, kot so PCR, podvojevanje celotnega genoma s pomočjo tehnike kotalečega se kroga (angl. *rolling circle amplification*) in shotgun sekveniranje, so za identifikacijo novih PV postale veljavne tudi te metode. Uporaba novejših metod je pripeljala do identifikacije in karakterizacije številnih novih PV, ki so v kliničnih vzorcih praviloma prisotni v zelo nizkih koncentracijah (4, 5).

Odkrivanje novih genotipov HPV spremljajo v Referenčnem centru za HPV (Human papillomavirus Reference Center, Karolinska Institutet) v Stockhol-

mu (Švedska), kjer določajo tudi zaporedne številke novo opredeljenih genotipov HPV. Genotipi HPV so (na žalost) oštevilčeni popolnoma naključno, glede na vrstni red osamitve, in ne glede na biološke lastnosti virusov ali njihovo genomsko podobnost. Tako npr. genotip HPV 16 oz. krajše HPV-16, predstavlja šestnajsti po vrsti odkriti genotip HPV. Do avgusta 2014 je bilo popolnoma opredeljenih 195 različnih genotipov HPV, po podatkih nedavno objavljenih raziskav, pa obstaja 200–300 potencialno novih genotipov, ki čakajo na dokončno molekularno in filogenetsko opredelitev. V zadnjih letih je naša raziskovalna skupina odkrila in dokončno opredelila devet novih uradno priznanih genotipov HPV, in sicer HPV-120, HPV-125, HPV-150, HPV-151, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184 in HPV-199 ter delno opredelila več kot 30 kandidatnih izolatov za nove genotipe. Za opredelitev in uradno priznanje novega genotipa HPV je treba še vedno celotni genom izolata HPV (lahko tudi po delih) vklonirati v plazmidne vektorje in mu določiti nukleotidno zaporedje oz. za PV značilna genomska področja. Celotni genom potencialno novega genotipa HPV lahko pridobimo s PCR ali s tehniko klasičnega kloniranja (1, 2).

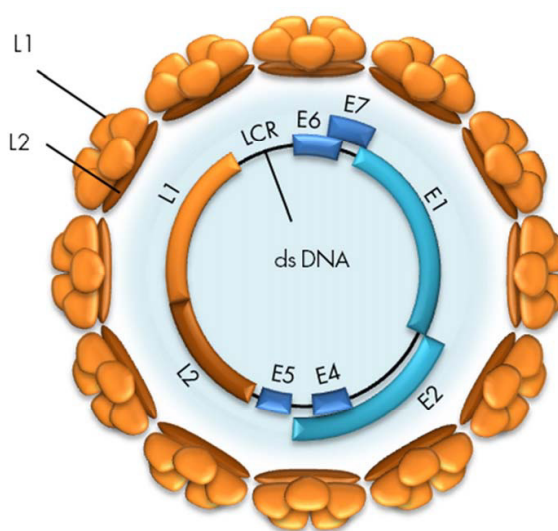
Nedavno je bila ustanovljena prosto dostopna podatkovna baza PaVE (PapillomaVirus Episteme), z namenom zagotovitve organiziranega in ažurnega vira informacij znanstveni skupnosti, ki se ukvarja z raziskavami na področju papilomavirusov. Trenutno vsebuje 303 referenčne genome PV, 3.126 posameznih genov in regij genoma, 2.823 zaporedij virusnih beljakovin in 48 trodimenzionalnih struktur virusnih beljakovin, ki jih lahko uporabniki brezplačno prenesejo, raziskujejo in analizirajo (6). Uporabniki lahko brezplačno prenesejo podatke o novoodkritih genotipih HPV tudi iz podatkovne baze Referenčnega centra za HPV - <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>.

195 do sedaj znanih genotipov HPV uvrščamo, skupaj še z nekaterimi opičjimi PV, v 5 rodov (alfa, beta, gama, mu in nu). Posamezni rodovi HPV izkazujejo dokaj značilen tropizem za določeno vrsto epitela. Največji in za človeka klinično najbolj pomemben je rod alfa (sestavlja ga 14 virusnih vrst), v katerega so uvrščeni genotipi HPV, povezani z nastankom številnih benignih in malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela. Približno 40 genotipov HPV iz rodu alfa izkazuje tropizem za epitel sluznic in se glede na vrsto novotvorb, ki jih povzročajo, deli na visokorizične in nizkorizične genotipe HPV. Visokorizični genotipi HPV (najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18) so odgovorni za nastanek več kot 99 % primerov raka materničnega vratu, 70–90 % raka zadnjika in nožnice, 40 % raka ženskega zunanje genitalije (vulve), 47 % raka penisa ter 25–30 %

raka ustnega dela žrela. Nasprotno so nizkorizični genotipi HPV iz rodu alfa (najpomembnejša sta HPV-6 in HPV-11) odgovorni za nastanek vseh primerov anogenitalnih bradavic in papilomov grla. V rod alfa so uvrščeni tudi nekateri genotipi HPV (npr. HPV-2, HPV-27 in HPV-57), ki okužijo predvsem večskladni ploščatocelični epitel kože. Najpogosteje povzročajo navadne kožne bradavice in anogenitalne bradavice pri otrocih. Rod beta (sestavlja ga 5 virusnih vrst) združuje genotipe HPV, povezane z nastankom različnih benignih in malignih novotvorb na koži pri imunsko oslabljenih osebah in pri bolnikih z redko dedno boleznijo, imenovano bradavičasta epidermodisplazija. Pri osebah, ki niso genetsko predisponirane, ti virusi najpogosteje vzpostavijo t. i. prikrito (latentno) okužbo in redko povzročajo benigne novotvorbe kože. Genotipi HPV iz rodov gama (17 virusnih vrst), mu (2 virusni vrsti) in nu (1 virusna vrsta) povzročajo različne benigne spremembe na koži (1, 7–11).

Zgradba in pomnoževanje HPV

HPV so majhni DNA-virusi brez ovojnice, ki v premeru merijo približno 55 nm. Dedni material je obdan z dvoplastno beljakovinsko sredico. Virusna sredica (kapsida) ima ikozaedrično simetrijo in je sestavljena iz 72 morfoloških enot, t. i. kapsomer, ki jih sestavljata dva tipa strukturnih beljakovin, in sicer velika (L1) in mala (L2) plaščna beljakovina. Vsaka od 72 kapsomer je sestavljena iz petih beljakovin L1 molekulske mase 54 kDa, ki se navzkrižno povežejo z disulfidnimi mostički, in ene, aksialno vstavljene beljakovine L2 (74–80 kDa), ki pomaga oblikovati in vzdrževati strukturo kapsomere (1).



Slika 1. Organizacija genoma HPV. (Vir: Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 41-60.)

Virusni genom je krožna, zaprta, dvojnovična molekula DNA, velikosti 7,5–8 kbp in molekulske mase $5,2 \times 10^6$ Da (Slika 1). Genom je sestavljen iz kodirajočega in nekodirajočega območja. Kodirajoče območje genoma delimo na zgodnje območje E (angl. *early*) in pozno območje L (angl. *late*) (1).

Območje E vsebuje zapise (gene) za beljakovine, pomembne za uravnavanje podvojevanja virusne DNA, uravnavanje izražanja virusnih genov in interakcijo s celičnimi beljakovinami gostitelja. Večina do sedaj opredeljenih genotipov HPV ima do šest različnih genov E, in sicer E1, E2, E4, E5, E6 in E7. Ti se prepisujejo kot različne bi- ali policistranske molekule mRNA – vsebujejo bralne okvirje za več različnih beljakovin – iz zgodnjega promotora P1 (HPV-11), ki se nahaja v nekodirajočem območju LCR (angl. *long control region*). Izjema so nizkorizični genotipi HPV, pri katerih se mRNA-beljakovine E7 prepiše posebej, in sicer s promotora P2 (HPV-11), ki se nahaja v genu E6 (1, 12).

Gena E6 in E7 sta med vsemi območji genoma HPV najbolj raziskana, saj imata najpomembnejšo vlogo v onkogenezi novotvorb, katerih nastanek se povezuje s HPV. Virusni beljakovini E6 in E7 vplivata na številne celične procese, ki lahko vodijo do maligne transformacije s HPV okuženih celic. Med njimi so najpomembnejši spodbujanje oz. vzdrževanje celične proliferacije, zaviranje zaščitnega delovanja celičnih tumor zavirajočih beljakovin ter indukcija celične nesmrtnosti. Onkogeno delovanje beljakovin E6 in E7 je podrobneje opisano v poglavju *Molekularna patogeneza okužbe s HPV* (1, 12).

Transformirajoče lastnosti izraža tudi virusna beljakovina E5, za katero domnevamo, da bi lahko sodelovala v začetni stopnji onkogeneze, posredovane s HPV iz rodu alfa. Beljakovina E5 spodbuja receptorje celičnih rastnih dejavnikov EGF (angl. *epidermal growth factor*) in PDGF (angl. *platelet derived growth factor*) ter na ta način povišuje nivo mitogenih dejavnikov, ki spodbujajo celično proliferacijo. Najnovejše raziskave ji pripisujejo tudi pomembno vlogo pri spodbujanju angiogeneze in antiapoptotsko delovanje. Poleg tega E5 omogoča tudi izmikanje HPV imunskemu odgovoru, saj ovira zorenje molekul PHK razreda I. Zapis za beljakovino E5 manjka pri večini genotipov HPV iz rodov beta in gama. E5 je trenutno ena najbolj raziskovanih virusnih beljakovin (1, 12).

Virusna beljakovina E1 je pomembna za začetek podvojevanja virusne DNA in vzdrževanje HPV v obliki zunajkromosomskih krožnih DNA-delcev ali episomov. E1 se veže skupaj z beljakovino E2 v bližino *ori* mesta podvojevanja virusnega genoma (angl. *origin of replication*) v nekodirajočem obmo-

čju LCR in deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo (1, 12).

Beljakovina E2 se veže na značilna zaporedja DNA v nekodirajočem področju LCR in uravnava podvojevanje, segregacijo in izražanje virusnega genoma. Vezava E2 je nujna za pritrditev beljakovine E1 na *ori* mesto, ki v naslednjem koraku veže celične beljakovine, potrebne za podvojevanje virusne DNA, vključno z beljakovino RPA (angl. *replication protein A*) in DNA-polimerazo alfa primazo. Poleg tega je beljakovina E2 potrebna za pritrditev virusnih episomov na mitotske kromosome in njihovo pravilno segregacijo med celično delitvijo. Beljakovina E2 je izjemno pomembna tudi za uravnavanje izražanja virusnih onkogenov. V nizkih koncentracijah E2 spodbuja izražanje E6 in E7, medtem ko v visokih koncentracijah E2 zavira izražanje E6 in E7 z neposrednim oviranjem vezave celičnih dejavnikov prepisovanja SP1 in TFIID na zgodnji virusni promotor p97 (HPV-16) (1, 12).

Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem znana. Dosedanje raziskave so pokazale, da se E4 veže na citokeratine okuženih celic in na ta način povzroči propad celičnega citoskeleta. Domnevamo, da je porušenje citokeratinske mreže potrebno za lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okuženih celic (1, 12).

Območje L virusnega genoma vsebuje zapisa za strukturni beljakovini virusne kapside (L1 in L2), ki se prepisujeta kot bi- in/ali policistranske mRNA iz poznega promotora P3 (HPV-11), ki se nahaja v genu E7. Omenjeni promotor je pomemben tudi za prepis zgodnjih virusnih beljakovin E1, E2 in E4, ki so pomembne za pomnoževanje virusa v diferencirajočih se epitelih celicah. Gen L1 vsebuje zapis za veliko plaščno beljakovino, ki je skupaj z odprtim bralnim okvirjem za beljakovino E1 najbolj ohranjeni del genoma med različnimi genotipi HPV in predstavlja osnovo za klasifikacijo ter raziskave evolucijske sorodnosti (H)PV. Beljakovina L1 predstavlja najbolj imunogeno virusno beljakovino, ki v gostitelju izzove nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki so značilna za posamezen genotip HPV. Gen L2 ima zapis za malo plaščno beljakovino, ki je pri posameznih genotipih HPV različna. Za beljakovino L2 je značilno, da vsebuje visoko ohranjene epitope, ki v gostitelju izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles, ki ščitijo proti širokemu spektru genotipov HPV. Navzkrižno nevtralizirajoči epitopi so skriti v notranjosti kapside in se razkrijejo šele ob vezavi kapside na gostiteljsko celico (1, 12).

Nekodirajoče območje LCR ne vsebuje zapisa za virusne beljakovine, ampak zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje podvojevanja in prepri-

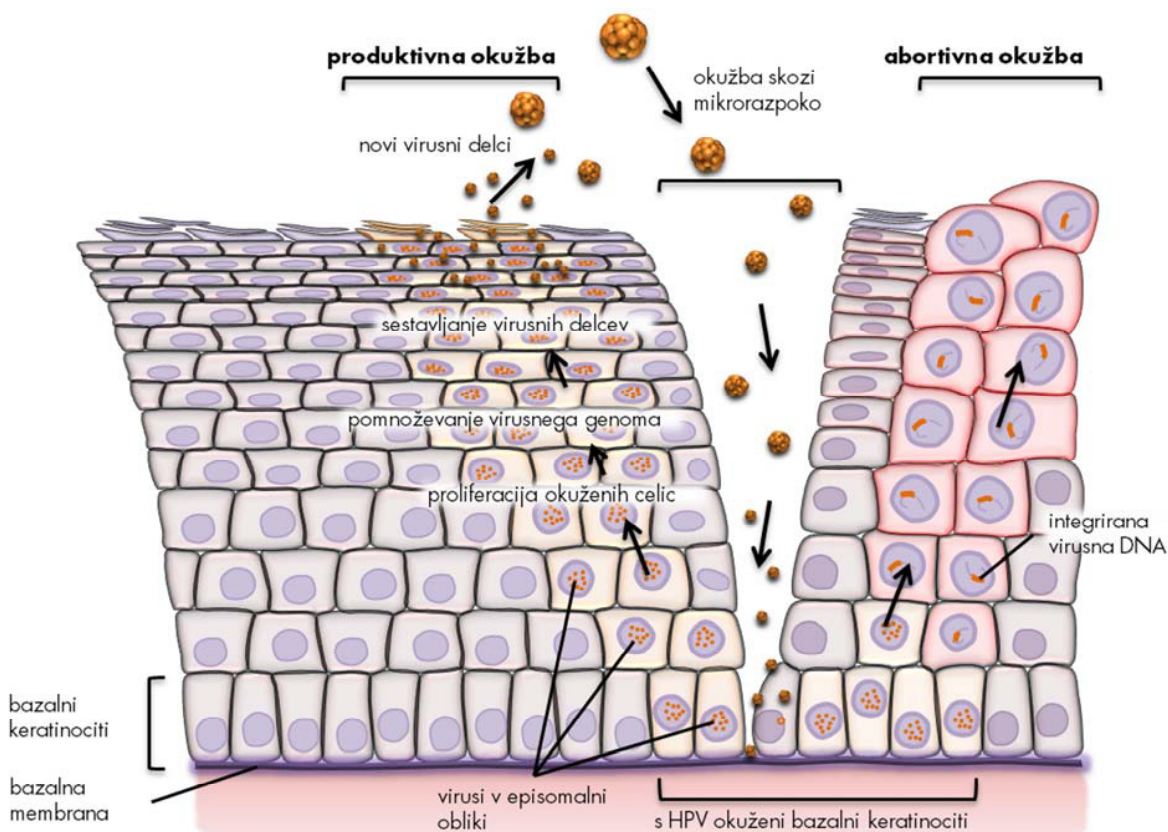
sovanja virusnega genoma: mesto *ori*, zgodnje virusne promotornje, vezavna mesta za dejavnike prepisovanja, ojačevalce in represorske uravnalne beljakovine. LCR se nahaja med genoma L1 in E6. Pomen drugega nekodirajočega območja, ki se nahaja med genoma E5 in L2, še ni znan (1, 12).

Molekularna patogeneza okužbe s HPV

Okužba s HPV se prične z vstopom virusa skozi poškodovani epitel kože ali sluznice, najpogosteje skozi mikroskopsko razpoko v epitelu, in z okužbo bazalnih celic večvrstnega ploščatoceličnega epitela (Slika 2). Domnevamo, da so za vezavo virusa na gostiteljsko celico ključni heparan-sulfatni proteoglikani (HSPG), ki se nahajajo na bazalni membrani in površini epitelnih celic. V začetni stopnji okužbe pride do vezave virusne kapside oz. beljakovin L1 na primarno vezavno mesto, ki ga predstavljajo receptorji HSPG na bazalni membrani. V nadaljevanju se kapsida prenese do sekundarnega vezavnega mesta, ki je na površini celic in ki ga prav tako predstavljajo receptorji HSPG. Pri tem pride do konformacijske spremembe, zaradi katere se izpostavi visokoohranjeni N-terminalni del beljakovine L2, ki ga v nadaljevanju cepi celični encim furin. Ti dogodki privedejo do nadaljnjih konformacijskih sprememb v kapsidi, ki bodisi zmanjšajo

afiniteto kapside do receptorjev HSPG ali pa vodijo do izpostavitve mest, ki so potrebna za vezavo kapside oz. beljakovine L1 na še nepoznane sekundarne receptorje, ki sprožijo endocitozo. HPV vstopa v celico relativno počasi (prve prepise virusnih genov lahko zaznamo šele po 12–24 urah). HPV-16 vstopa v celice s pomočjo klatrinsko posredovane endocitoze. Ta mehanizem vstopa najverjetneje ni univerzalen za vse HPV, saj se lahko razlikuje med posameznimi genotipi. Tako npr. HPV-31 v celice vstopa s pomočjo kaveolnega endocitotskega sistema, neodvisnega od klatrina. Poleg tega so ugotovili, da se lahko nekateri HPV, ki v celico vstopijo s pomočjo klatrinskega endocitotskega sistema, znotrajcelično prenašajo tudi s kaveosomi. Po vstopu v celico se virusni delci razgradijo v poznih endosomih in/ali lizosomih; s pomočjo virusne beljakovine L2 se genom HPV na še neznan način (najverjetneje s pomočjo mikrotubulov) prenese v jedro bazalnih celic (1, 12–14).

V nadaljevanju HPV okužba lahko poteka kot (i) klinično nema, (ii) produktivna ali (iii) nepopolna (transformirajoča, abortivna). Proces pomnoževanja HPV je natančno uravnan in je odvisen od prisotnosti oz. odsotnosti določenih virusnih beljakovin in tudi od stopnje zrelosti epitelnih celic gostitelja. Tako je npr. pomnoževanje HPV v bazal-



Slika 2. Potek okužbe s HPV. (Vir: Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 41-60.)

nih epitelnih celicah močno omejeno. Pozneje se sočasno z dozorevanjem okuženih celic povečuje tudi sposobnost pomnoževanja HPV, kompletni virioni pa se sproščajo le iz popolnoma dozorelih celic. V jedrih bazalnih celic se genom HPV nahaja izključno v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev oz. v t. i. episomih. Bazalne celice z episomi so nosilke latentne HPV-okužbe in jih histološko ni mogoče razlikovati od neokuženih celic. Kmalu po okužbi bazalnih celic se število kopij virusnega genoma poveča na od 50 do 100 kopij na celico, neodvisno od celičnega cikla. Podvojevanje virusnega genoma nato tesno sledi celičnemu ciklu gostiteljske celice. Navadno se pri eni celični delitvi virusni genom podvoji le enkrat. Ko je HPV v bazalnem sloju, je sinteza virusnih beljakovin minimalna. V glavnem se sintetizirata beljakovini E6 in E7, poleg minimalne količine drugih virusnih beljakovin, predvsem E1 in E2, ki sta potrebni za začetek podvojevanja in oddvojitve virusnega genoma (episoma). S pomočjo beljakovin E6 in E7, katerih izražanje spodbuja nizka raven E2 (v tem primeru beljakovina E2 deluje kot aktivator prepisovanja E6 in E7), HPV v nadaljevanju okužbe spremeni celično okolje z namenom, da ustvari pogoje za podvojevanje virusa med potekom diferenciacije okuženih celic v keratinocite. V fizioloških pogojih (to je brez prisotnosti HPV) bazalne celice, ki vstopijo v suprabazalne epitelne sloje, po določenem številu delitev izstopijo iz celičnega ciklusa in začnejo proces terminalne diferenciacije s ciljem, da vzpostavijo zaščitni keratinski sloj, ki ga normalno zagotavlja koža. Nasprotno se zaradi vpliva beljakovin E6 in E7 ter delno tudi E5 s HPV okužene celice suprabazalnega sloja delijo večkrat kot običajno, preden preidejo v višje sloje epitela. Ko pridejo v *stratum spinosum*, v njih naraste količina beljakovin HPV, ki so nujne za podvojevanje virusa (E1 in E2). Povišana raven beljakovine E2 zavre izražanje virusnih onkogenov, kar zaustavlja proliferacijo epitelnih celic in omogoča njihovo diferenciacijo v keratinocite. Glede na to, da je izražanje genov E6 in E7 zavrt, se beljakovini E1 in E2 vezeta na značilna zaporedja DNA v območju LCR in aktivirata celične beljakovine oz. mehanizme, potrebne za podvojevanje virusne DNA. Predvideva se, da tu podvajanje virusnega genoma poteka po načinu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle*), tako da v gostiteljskih celicah nastaja na tisoče kopij virusnega genoma. Ko okuženi keratinociti pridejo v zgornje sloje epitela (*stratum granulosum*), podvojevanju virusnega genoma sledi sinteza virusnih beljakovin, ki so potrebne za sestavljanje virionov (L1, L2) oz. njihovo sproščanje (E4) iz gostiteljskih celic. Pri oblikovanju infektivnih virusnih delcev ima pomembno vlogo tudi beljakovina E2, saj povečuje učinkovitost vključitve virusnega genoma v virusno sredico s strani L1 in L2. Virusni delci na-

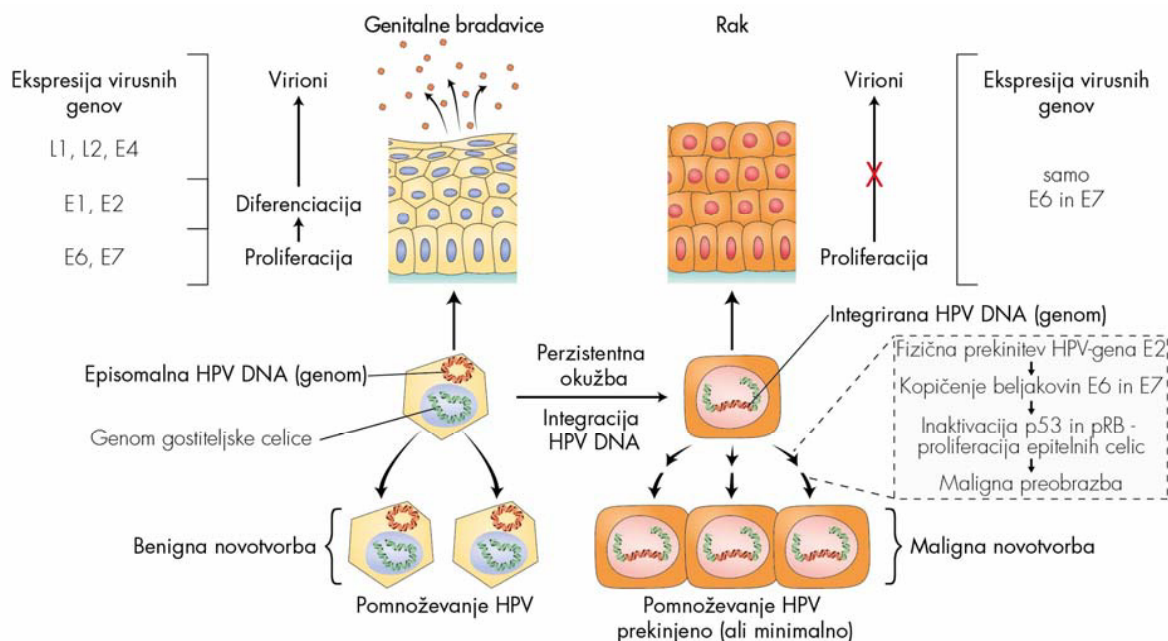
stajajo v zelo velikem številu in so sposobni okužiti sosednje celice (1, 12–14).

Aktivno pomnoževanje HPV v anogenitalnem področju se klinično največkrat odraža kot benigne, bradavicam podobne spremembe ali kot cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje, ki s svoje površine sproščajo veliko količino infektivnih virusnih delcev. Okužbo, v kateri virus uspešno zaključi svoj življenjski krog, imenujemo produktivna virusna okužba, same spremembe, ki pri tem nastanejo, pa produktivne spremembe oz. lezije. V produktivnih spremembah je izražanje virusnih genov natančno uravnavano. Virusne beljakovine se namreč izražajo v točno določenih časovnih intervalih in v nadzorovanih količinah ter sovpadajo z dozorevanjem gostiteljskih celic. Številni genotipi HPV povzročajo samo to vrsto sprememb, in redko oz. nikoli nastanek malignih sprememb. Dogodki, ki vodijo do nastanka zrelih virusnih delcev v zgornjih plasteh epitela, so skupni tako nizkorizičnim kot tudi visokorizičnim genotipom HPV. Zaradi pomnoževanja HPV v dokončno diferenciranih epitelih celicah se le-te morfološko spremenijo in začnejo postopoma propadati. Ta citopatski učinek, značilen za HPV, imenujemo koilocitoza. Za koilocite so značilna skrčena, hiperkromna jedra različnih oblik, kromatin je grudast, okoli jeder se pojavlja značilen svetli pas ali halo. Koilocitoza je znak produktivne virusne okužbe, ki se odraža v propadu celic, in je histološko najbolje vidna v zgornji tretjini epitela benignih sprememb, povezanih s HPV (1, 12–14).

Rak materničnega vratu je najhujša posledica okužbe s HPV, ki se razvije postopoma, skozi zaporedje relativno dobro poznanih dogodkov. Rak materničnega vratu lahko nastane le pri ženskah, ki so dolgotrajno okužene z enim ali več visokorizičnimi genotipi HPV, najpogosteje s HPV-16 ali HPV-18. Pri teh osebah izguba zaščitnega delovanja celičnih tumorjev zavirajočih beljakovin, ki nastane kot posledica nenadzorovanega izražanja (delovanja) virusnih beljakovin E6 in E7, vodi do kopičenja različnih sekundarnih mutacij, ki lahko čez leta privedejo do nastanka raka (1, 8, 13).

Molekularni model karcinogeneze, posredovanje z visokorizičnimi genotipi HPV

Novejša spoznanja o HPV so privedla do razvoja molekularnega modela karcinogeneze, posredovanje z visokorizičnimi genotipi HPV. Temelj modela je interakcija virusnih beljakovin z močno kontroliranim spletom celičnih onkogenov in tumorjev zavirajočih beljakovin, predvsem p53 in pRB, ki uravnava rast in delitev celic. Model opisuje nastanek malignih novotvorb v treh stopnjah, pri čemer kot vzorčni tumor služi rak materničnega vratu. V prvi



Slika 3. Povzetek ključnih dogodkov v patogenezi anogenitalnih bradavic in raka materničnega vratu. (J. Triglav, 2011. Prirejeno po: Beutner KR, Tying S. Human papilloma virus and human disease. *Am J Med.* 1997; 102: 9–15, Figure 2; Doorbar J. Molecular biology of human papilloma virus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110: 525–41, Figure 2, Figure 5.)

stopnji HPV okuži bazalne celice ploščatoceličnega epitela. V drugi stopnji pride do vključevanja (integracije) HPV DNA v genom gostiteljske celice, kar je tudi ključni dogodek v nastanku raka. Do vključevanja virusne DNA pride le v primeru razmeroma redke, dolgotrajne (perzistentne) okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV. Nagnjenost k vključevanju v humani genom izkazujejo predvsem visokorizični genotipi HPV (med njimi največjo HPV-16 in HPV-18), medtem ko je ta dogodek pri okužbi z nizkorizičnimi genotipi HPV (npr. HPV-6 in HPV-11) izjemno redek (Slika 3). V tretji stopnji razvoja tumorja imajo poleg HPV (ta deluje kot endogeni karcinogen) pomembno vlogo tudi dodatne karcinogene snovi, kot so cigaretni dim, UV-žarki, obsevanje, najrazličnejši kemični agensi itd., ker povzročajo nastanek številnih sprememb človeškega genoma, ki vodijo v nesmrtnost okuženih celic in na koncu do njihove maligne preobrazbe (1, 13).

Številne raziskave so pokazale, da je fizikalno stanje genoma HPV v benignih in malignih novotvorbah oz. različnih predrakavih spremembah epitela različno (Slika 3). V benignih novotvorbah, kot so genitalne bradavice, je virusna DNA prisotna v obliki episoma, medtem ko je pri večini malignih novotvorb in delu CIN III vsaj del virusne DNA (vedno sta vključena vsaj zapisa za E6 in E7) integriran v genom gostiteljske celice. Genom HPV je vključen tudi pri manjšem deležu CIN I, zato domnevamo, da je virusna integracija najverjetneje zgodnji dogodek v procesu nastanka raka. Mesto v DNA ba-

zalnih celic, na katerem pride do vključevanja genoma HPV, ni specifično. Vgrajeno virusno DNA so našli na različnih kromosomih, vendar pogosto v bližini t. i. krhkih mest, medtem ko se krožni genom virusa pred vključitvijo skoraj vedno prekine na istem mestu, tj. v področju gena E2 (Slika 4). Glede na to, da je beljakovina E2 odgovorna za zaviranje prepisovanja zgodnjih virusnih genov E6 in E7, fizična prekinitev gena E2 vodi do izgube njene biološke vloge. Rezultat tega je povečano in nekontrolirano izražanje oz. kopičenje beljakovin E6 in E7, ki se veže na celični tumorje zavirajoči beljakovini p53 in pRB in sodelujeta pri njihovi razgradnji (Slika 4). Do nekontroliranega izražanja virusnih onkogenov redkeje prihaja v primeru, ko gen E2 ni prekinjen, oz. v primeru, ko je vezavno mesto za beljakovino E2 znotraj uravnalnega območja LCR nedostopno oz. metilirano. Ne glede na mehanizem, zmanjševanje fizioloških količin beljakovin p53 in pRB znotraj celice in prekinitev njunega tumorsko-zaščitnega delovanja predstavlja ključni dogodek v razvoju raka (1, 13–19).

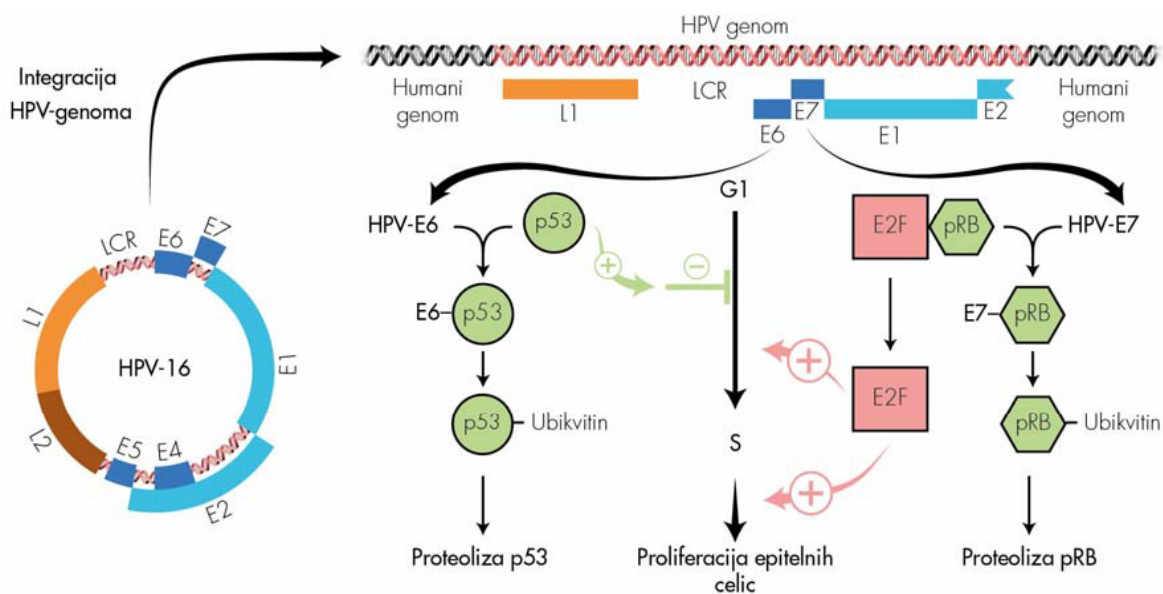
Nedavne raziskave so pokazale, da se beljakovina E6 visokorizičnih genotipov HPV v gostiteljskih celicah poveže v tridelni kompleks s celično beljakovino p53 in celično ubikvitinsko ligazo E6AP (angl. *cellular E6AP ubiquitin ligase*) in sproži hitro razgradnjo p53 z od ubikvitina odvisnim sistemom proteaz oz. s proteasomi. Beljakovina p53 je dejavnik prepisovanja, ki normalno uravnava prepisovanje celičnih beljakovin, ki sodelujejo v nadzoru celič-

nega cikla na prehodu iz G1- v S-fazo. Njeno izražanje lahko sprožijo različni geno- ali citotoksični dejavniki, ki predstavljajo potencialno nevarnost za celico (najpogosteje so to poškodbe DNA). Po poškodbi celične DNA, ki lahko nastane kot posledica normalnega celičnega pomnoževanja in/ali zaradi izpostavitve celične DNA različnim fizikalnim ali kemijskim agensom, raven p53 naglo naraste (sama beljakovina se aktivira s potranslacijskimi modifikacijami), kar zaustavi celično delitev za tako dolgo, dokler celični popravilni mehanizmi ne popravijo okvarjenih odsekov DNA. Po odpravi poškodb raven p53 upade in celični ciklus napreduje v S-fazo, kjer se podvoji popravljena DNA. V primeru, ko so poškodbe celičnega genoma preobsežne ali nepopravljive, p53 sproži proces celične apoptoze. Beljakovino p53 so zaradi te vloge poimenovali varuh človeškega genoma. Nasprotno pa trajno znižana raven beljakovine p53, do katere lahko pride zaradi mutacij ali odsotnosti gena p53, ali pa beljakovino p53 inaktivira HPV-E6, omogoča neovirano delitev celic s poškodovano DNA, kar v končni fazi lahko privede do njihove maligne preobrazbe. Čeprav je osrednja vloga beljakovine HPV-E6 vezana na razgradnjo tumorje zavirajoče beljakovine p53, se ta veže tudi na nekatere ostale celične beljakovine ali uravnava njihovo izražanje. Na ta način se prepreči nespecifični imunski odgovor na okužbo s HPV npr. z oviranjem interferonskega protivirusnega odziva in signalne poti TLR (angl. *toll-like receptor*) in od p53 neodvisne apoptotske poti (npr. apoptotska signalna pot preko membranskih receptorjev TNF ali

mitohondrijskih beljakovin Bak in Bax) ter se spodbudi proliferacija epitelnih celic in nastanek malignih tumorjev (npr. z aktivacijo encima telomeraze oz. njegove katalitične podenote hTERT, kar vodi v nesmrtnost celic, s povzročanjem kromosomalnih aberacij, z oviranjem celične adhezije, z rušenjem medceličnih stikov in celičnega citoskeleta, z oviranjem diferenciacije epitelnih celic ter spodbujanjem angiogeneze) (1, 12, 13).

Čeprav lahko tudi beljakovine E6 nizkorizičnih genotipov HPV tvorijo stabilne komplekse z beljakovino E6AP, ti ne vežejo oz. ne vodijo do razgradnje p53. Zato domnevamo, da so tarča kompleksa E6-E6AP nizkorizičnih HPV nekatere druge, še neznanne celične beljakovine. Nasprotno pa se lahko beljakovine E6, tako nizkorizičnih kot tudi visokorizičnih genotipov HPV, vežejo neposredno na p53 ali povzročajo njegovo nestabilnost (npr. z inaktivacijo encima acetiltransferaze p300 in beljakovine CBP) in na ta način dodatno ovirajo njegovo vezavo na značilna zaporedja v celični DNA (1, 12, 13).

Virusna beljakovina E7 je strukturno in funkcionalno podobna antigenu E1A adenovirusov (Ad EA1) in velikemu antigenu T virusa polioma SV40 (SV40 T-Ag). Vse omenjene beljakovine tvorijo komplekse s celično tumorje zavirajočo beljakovino pRB (retinoblastomska beljakovina) in sorodnima žepnima beljakovinama (angl. *pocket proteins*) p107 in p130, ki jih tako zavrejo. Po vezavi E7 visokorizičnih genotipov HPV na beljakovino pRB pride do proteolitske



Slika 4. Shematski prikaz molekularnih interakcij med virusnima beljakovinama E6 in E7 ter celičnima tumorje zavirajočima beljakovinama p53 in pRB (J. Triglav, 2011. Prirejeno po: Vousden K. Interactions of human papilloma virus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J.* 1993; 7: 872–9, Figure 1; Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 80: 2008–18, Figure 1.)

razgradnje pRB v celičnih proteasomih. Beljakovina pRB normalno deluje kot zaviralec (represor) družine dejavnikov prepisovanja E2F, ki imajo ključno vlogo v aktivaciji genov, potrebnih za sintezo DNA, in stimulaciji vstopa celice v S-fazo celičnega cikla; z vezavo na E2F beljakovina pRB prepreči izražanje teh genov. Na koncu G1-faze celičnega cikla, ko so izpolnjeni vsi fiziološki pogoji za vstop celice v S-fazo, od ciklina odvisne kinaze fosforilirajo pRB in ga tako inaktivirajo, E2F se odcepi od pRB in aktivira podvojevanje DNA oz. delitev celic. Vezava virusne beljakovine E7 z defosforilirano obliko pRB ima v osnovi enak učinek kot fosforilacija pRB; to je odcepitev E2F od pRB in spodbujanje celične proliferacije. Ta je za razliko od proliferacije, ki poteka fiziološko oz. brez prisotnosti HPV, nekontrolirana in povišana ter tako odpira vrata maligni preobrazbi celice. Inaktivacija pRB z beljakovino E7 visokorizičnih genotipov HPV se odraža v povečanem izražanju njegovega zaviralca – beljakovine p16^{INK4A}. Ugotavljanje povečanega izražanja p16^{INK4A} v citoloških in histoloških vzorcih z imunohistokemično metodo se v zadnjih nekaj letih uporablja tudi v diagnostične namene za dokazovanje HPV-okuženih celic, ki imajo povišano raven izražanja beljakovine E7 oz. za dokazovanje CIN višjih stopenj in raka materničnega vratu. Beljakovina E7 lahko tvori komplekse tudi z nekaterimi ostalimi celičnimi beljakovinami, ki so posredno ali neposredno odgovorne za uravnavanje celične proliferacije (različni prepisovalni dejavniki, histonske deacetilaze, beljakovine prepisovalnega kompleksa AP1, ciklina A in E, inhibitorja od ciklina odvisnih kinaz p21 in p27) in preko katerih lahko dodatno spodbuja pomnoževanje gostiteljskih celic. Podobno kot beljakovina E6 tudi beljakovina E7 povzroča genetsko nestabilnost celičnega genoma, npr. s povzročanjem aneuploidije in preureditve kromosomov, in na ta način pospešuje proces karcinogeneze. Povzročanje genomske nestabilnosti s strani E6 in E7 se smatra za zgodnji dogodek v procesu karcinogeneze, pred integracijo HPV-DNA v celični genom, in je značilno le za visokorizične genotipe HPV. Beljakovina E7 naj bi bila pomembna tudi za vzdrževanje aktiviranega stanja telomeraz in podaljševanje telomer s sistemom ALT (angl. *alternative lengthening of telomeres*). Pomembna dodatna vloga E7 je aktivacija nekaterih celičnih metabolnih encimov (npr. piruvat kinaze in alfa glukozidaze), ki omogočajo hitrejšo izrabo celičnih zalog glikogena, pospešujejo biosintezo in obenem zmanjšujejo potrebo celice po kisiku (značilnost tumorskih celic), ovirajo različne komponente interfeferonskega protivirusnega odziva in apoptotsko pot *anoikis* – ta pot se sproži v celicah, ki vstopajo v S-fazo celičnega cikla in ki niso pritrjene na zunajcelični matriks; z oviranjem te poti virusni beljakovini E6 in E7 dodatno usmerjata celice v maligno preobrazbo. Sposobnost vezave s tumor

zavirajočo beljakovino pRB imajo tudi virusne beljakovine E7 nizkorizičnih genotipov HPV, vendar je njihova moč vezave v primerjavi z beljakovinami E7 visokorizičnih HPV približno stokrat manjša (1, 12, 13).

Z oviranjem normalnega delovanja poglavitnih protitumorskih zaščitnikov naših celic virusni beljakovini E6 in E7 visokorizičnih genotipov HPV omogočata neovirano škodljivo delovanje različnih karcinogenih dejavnikov (E6 in E7 delujeta kot endogena mutagena) in nenadzorovano proliferacijo celic s poškodovano DNA, kar lahko vodi do kopičenja različnih sekundarnih mutacij znotraj ene ali več celic in s tem do velike nagnjenosti k nesmrtnosti in maligni preobrazbi s HPV okuženih celic. Zgodnji genetski dogodki v procesu karcinogeneze, posredovane s HPV, ki so povezani z indukcijo nesmrtnosti, vključujejo delecije na kromosomih 3p, 6q, 10p, 11p, 11q, 13q in 18q, pridobitve (angl. *non-random gains*) na kromosomih 5, 7q, 8q, 9q in 20q ter strukturne spremembe na kromosomih 10, 18 in 20. Genetske spremembe na kromosomih 3p in 6q vodijo do:

- delecije genov, ki nosijo zapise za tumorje zavirajoče beljakovine,
- reaktivacije encima telomeraze (npr. zaradi izgube gena za telomerazni represor) in
- izmikanja virusa imunskemu odgovoru (npr. izguba genov za antigene PHK razreda I) (1).

Pozni genetski dogodki v procesu karcinogeneze, ki so povezani z indukcijo celične transformacije (invazije), vključujejo:

- pridobitve na kromosomu 3q, zaradi katerih se poveča število genov za strukturno podenoto hTR-encima telomeraze,
- izgube na kromosomu 11, ki vodijo do delecije genov za nekatere tumorje zavirajoče beljakovine in
- epigenetske spremembe oz. hipermetilacijo promotorjev za tumor zavirajoče beljakovine, kot so TSLC1, CDH1, DAPK, FHIT, HIC-1, p16, RAR-beta, RASSF1A in TIMP-2 (1).

Genetske spremembe na gostiteljskih kromosomih vplivajo tudi na nepravilno oz. povečano izražanje celičnih onkogenov, kot so EGF-receptor, c-myc, neu/c-erb-B2, MDM2 in ras, ki tako najverjetneje prispevajo svoj delež k nastanku malignih sprememb. Njihovo povečano izražanje je najpogosteje posledica pomnoževanja kromosomskih odsekov, ki nosijo zapise za te gene (1).

Imunologija okužbe s HPV

Imunski odgovor na okužbo s HPV je še poln neznan in je v primerjavi z večino ostalih virusov

nenavadno slab in počasen, kar nakazuje na to, da so HPV evolucijsko razvili mehanizme, s katerimi se uspešno izmikajo imunskemu odgovoru. Mehani- zem imunskega izmikanja HPV temelji predvsem na oviranju učinkovite predstavitve virusnih anti- genov. HPV se namreč pomnožujejo le v zgornjih plasteh epitela kože in sluznic, pri čemer ne povzro- čajo pomembnejše celične lize oz. nekroze tkiv. Za razliko od večine drugih virusov v poteku okužbe s HPV ni viremije. Vse to zmanjšuje količino virusnih antigenov, ki so predstavljeni imunskim celicam, in obenem zagotavlja minimalno količino vnetnih signalov, ki bi lahko aktivirali imunski sistem. Ker je vnetnih citokinov premalo in ker virusni beljakovini E6 in E7 zavirata izražanje genov MIP3 α , IL-8, TLR9, je pomembno motena aktivacija in migracija anti- gen predstavitvenih celic (Langerhansove celice) in posledično aktivacija limfocitov T in B. Poleg tega je izražanje najbolj imunogene beljakovine HPV, tj. velike plaščne beljakovine L1, omejeno le na do- končno diferencirane epitelne celice, ki se nahajajo v zgornjih plasteh epitela. Da bi se izognili hitremu in učinkovitemu imunskemu odgovoru, HPV moti- jo tudi signalne poti, ki jih sprožata interferona alfa in gama, ter ovirajo izražanje celične beljakovine IRF-1 (angl. *interferon regulatory factor 1*). Le-ta je odgovorna za prepis interferona alfa in beta ter za od interferonov spodbujeno prepisovanje celičnih genov. HPV v okuženih celicah ovirajo tudi nastajanje polipeptidnih verig molekul PHK razreda I, kar dodatno ovira proces predstavitve virusnih antige- nov. Vse skupaj vodi do relativno počasnega celič- nega in zlasti humornega imunskega odgovora. Po mnenju strokovnjakov se pri večini okuženih v prvih treh mesecih po okužbi najprej pojavi celični imunski odgovor proti virusnim beljakovinam E2 in E6, ki povzroči uspešno regresijo večine novona- stalih genitalnih bradavic in CIN I. Humoralni imun- ski odgovor se pojavi le nekaj mesecev kasneje in zanj je značilen zelo nizek nivo protivirusnih proti- teles anti-HPV. Ocenjeno je, da je povprečen čas od okužbe s HPV do pojava merljive količine protiteles anti-HPV v serumu (serokonverzije) 12 mesecev. Poleg tega v 18 mesecih po okužbi samo 54–69 % okuženih oseb razvije merljiv nivo protiteles proti virusni beljakovini L1. Večina strokovnjakov je pre- pričana, da so protitelesa anti-HPV, ki nastanejo po naravni okužbi, značilna za določen genotip HPV in ne ščitijo navzkrižno pred okužbo z drugimi geno- tipi HPV, za razliko od protiteles anti-HPV, spodbu- jenih s cepljenjem proti HPV. Po preboleli okužbi s HPV (merilo je izguba HPV-DNA) nivo protiteles anti-HPV z leti pada in pri pomembnem deležu inicialno anti-HPV-pozitivnih žensk po nekaj letih protitelesa izginejo iz seruma oz. njihova količina pade pod merljivi nivo. Nedavne raziskave so poka- zale, da po naravni okužbi nastala protitelesa anti- HPV ne ščitijo popolnoma pred ponovno okužbo

z istim genotipom HPV. Zaenkrat ni jasno, ali je ta fenomen povezan s padcem minimalne količine protiteles, ki bi bila potrebna za dolgotrajno zaščito pred ponovno okužbo z istim genotipom skozi čas, ali s kakšnim drugi razlogom (1, 14).

Reference

1. Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 41–60.
2. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013; 445: 2–10.
3. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Vi- rology* 2013; 445: 213–23.
4. Chouhy D, Bolatti EM, Pérez GR, Giri AA. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol* 2013; 94: 2480–8.
5. Rector A, Tachezy R, Van Ranst M. A sequence-inde- pendent strategy for detection and cloning of cir- cular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol* 2004; 78: 4993–8.
6. Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Go- palan V, Mohamoud Y. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res* 2013; 1: D571–8.
7. Cubie HA. Diseases associated with human papillo- mavirus infection. *Virology* 2013; 445: 21–34.
8. Quint W, Jenkins D, Molijn A, et al. One virus, one le- sion-individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol* 2012; 227: 62–71.
9. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classifica- tion of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 2009; 4: 8.
10. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; Suppl 30: F100-F106.
11. Cubie HA, Cuschieri K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. *Cytopathology* 2013; 24: 289–308.
12. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; Suppl 30: F55-F70.
13. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, et al. Updat- ing the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 2012; Suppl 30: F24–33.
14. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011; 414: 153–63.