

## THE ANALYSIS OF L1 GENE VARIABILITY OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS TYPE 16 IN OUR POPULATION

### ANALIZA VARIJABILNOSTI L1 GENA HUMANOG PAPILOMA VIRUSA TIP 16 U NAŠOJ POPULACIJI

Filip Milošević<sup>1</sup>, Nina Gatarić<sup>1</sup>, Aleksandra Knežević<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

**Correspondence:** fmilosevic663@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** Human papilloma viruses (HPV) have been identified as a major etiological factor in the pathogenesis of cervical cancer. High-risk type HPV16 has the greatest medical significance. Based on differences in the nucleotide sequence of the type 16 genome, the existence of 16 variants of this type with different geographical distribution has been shown. **Aim:** Examination of the nucleotide sequence variability of the L1 gene presented in HPV16 variants in our territory.

**Material and methods:** The paper includes 37 sequences of HPV16 L1 genes taken from the database of the Institute of Microbiology and Immunology of the Faculty of Medicine, University of Belgrade. The sequences were compared with the reference sequences of the HPV16 variants and the construction of the phylogenetic tree was done using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version X) software package.

**Results:** Out of the 37 HPV16 L1 analyzed gene sequences, 23 were grouped with European variants. Other isolates were grouped with non-European HPV16 variants. The nucleotide distance was less than 1%, that is, at the level of subvariants.

**Conclusion:** The results of this study indicate that the European variants of the HPV16 virus are the most common in our population, but they also indicate the presence of non-European variants. Further analysis is necessary in order to monitor the circulation of HPV16 variants in our population.

#### Keywords:

Human papilloma virus,  
HPV16,  
L1 gene,  
phylogenetic analysis

## Sažetak

**Uvod:** Humani papiloma virusi (HPV) prepoznati su kao glavni etiološki faktor u patogenezi karcinoma grlića materice. Najveći medicinski značaj ima visokorizični tip HPV16. Na osnovu razlika u nukleotidnoj sekvenci genoma tipa 16 pokazano je postojanje 16 varijanti ovog tipa sa različitim geografskom distribucijom.

**Cilj:** Cilj rada je ispitivanje varijabilnosti nukleotidne sekvence L1 gena HPV16 varijanti zastupljenih u našem području.

**Materijal i metode:** U rad je uključeno 37 sekvenci L1 gena HPV16 preuzetih iz baze podataka Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sekvence su poređene sa referentnim sekvencama varijanti HPV16 i konstrukcija filogenetskog stabla je urađena primenom *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, verzija X)* softverskog paketa.

**Rezultati:** Od 37 analiziranih sekvenci HPV16 L1 gena, 23 se grupišu uz evropske varijante. Ostali izolati se grupišu uz neevropske HPV16 varijante. Nukleotidna distanca je bila manja od 1%, tj. na nivou podvarijanti.

**Zaključak:** Rezultati ove studije ukazuju da su u našoj populaciji najzastupljenije evropske varijante HPV16 virusa, ali ukazuju i na prisustvo neevropskih varijanti. Dalja analiza je neophodna u cilju praćenja cirkulacije HPV16 varijanti u našoj populaciji.

### Ključne reči:

Humani papiloma virus,  
HPV16,  
L1 gen,  
filogenetska analiza

## Uvod

Humani papiloma virusi (HPV) predstavljaju veliku grupu virusa koja pripada porodici *Papillomaviridae*. Na osnovu nukleotidne sekvence klasifikovani su u 57 rodova, od kojih najveći značaj imaju *Alphapapillomavirus* i *Betapapillomavirus*. Radi se o malim, sferičnim virusima bez omotača, veličine 52-55 nm. Poseduju kapsid ikozaedarne simetrije unutar koga se nalazi cirkularna dvolančana DNK (1). Dužina genoma iznosi približno 7900 bp i podeljen je u tri funkcionalna regiona: dugi kontrolni region (engl. *long control region, LCR*) koji sadrži regulatorne elemente za virusnu replikaciju i transkripciju, rani region koji kodira E1, E2, E4, E5, E6 i E7 rane proteine, i kasni region koji kodira L1 i L2 proteine kapsida (2). Produkti E6 i E7 predstavljaju onkoproteine čije su glave mete tumor supresorski proteini p53 i Rb. Ove interakcije dovode do disregulacije ćelijskog ciklusa, proliferacije, besmrtnosti i maligne transformacije inficiranih ćelija (3).

Humani papiloma virusi se prenose direktnim kontaktom sa inficiranom osobom preko kože, seksualnim putem, u toku porođaja i retko tokom trudnoće. Najčešći način prenosa je seksualni kontakt (1). Humani papiloma virusi predstavljaju najčešću seksualno prenosivu bolest u svetu (4). Procenjuje se da će većina seksualno aktivnih osoba imati bar jednu HPV infekciju tokom života (5). U jednoj studiji utvrđeno je da kod osoba ženskog pola uzrasne dobi 18-25 godina rizik za HPV infekciju raste sa brojem seksualnih partnera. Kod žena koje su imale samo jednog partnera infekcija je potvrđena u 14,3% slučajeva, dok je kod onih koje su imale 3 ili više partnera procenat pozitivnih na HPV infekciju iznosio čak 31,5% (6). Dodatni faktori koji utiču na sticanje genitalne HPV infekcije su rano stupanje u seksualne odnose, prisustvo drugih seksualno prenosivih infekcija, stanja imunosupresije, itd. (1).

Ulazno mesto za HPV predstavljaju mikrotraume

kože i sluznica u kojima dolazi do lokalne infekcije bazalnih ćelija epitela. U najvećem broju slučajeva (70-80%) infekcija je akutnog toka i dolazi do kompletne eliminacije virusa. Međutim, u oko 10-20% slučajeva dolazi do nastanka perzistentne latentne infekcije koja može tokom perioda od više godina dovesti do različitih stepena displazije i nastanka karcinoma. Infekcije HPV se ipak najčešće ispoljavaju pojavom papiloma na koži i sluzokožama. Ukoliko su prisutni u anogenitalnoj regiji nazivaju se kondilomima. Papilomi mogu biti različitih oblika, veličine, boje, a zajedničko im je da većina spontano prolazi posle više meseci ili godina. Iako se najčešće radi o benignim papilomima kože, kod jedne trećine osoba obolelih od retkog genetskog oboljenja *Epidermodysplasia verruciformis* dolazi do pojave skvamoznih karcinoma kože. Na sluznicama usne duplje, konjunktive, larinksa i anogenitalne regije takođe se najčešće sreću benigne tvorevine, u najvećem broju slučajeva uzrokovane HPV tipovima 6 i 11 koji su niskog onkogenog potencijala. Rede dolazi do pojave maligne alteracije i nastanka karcinoma sluznica, koji su najčešće uzrokovani perzistentnom infekcijom HPV tipovima 16 i 18 visokog onkogenog potencijala (1).

Na osnovu razlika nukleotidne sekvence > 10% u regionu L1 gena, trenutno je identifikovano preko 200 genotipova, a oko 40 njih se dovodi u vezu sa genitalnim infekcijama (7-9). Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research in Cancer*) klasifikovala je 12 tipova u grupu visokorizičnih na osnovu njihove bliske povezanosti sa pojavom raka: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59 (10). Infekcije ovim tipovima odgovorne su za skoro sve karcinome cerviksa, a postoji sve više dokaza da mogu izazvati i druge maligne tumore anogenitalne regije u koje spadaju rak anusa, vulve i penisa. Osim toga, dovode se u vezu i sa kancerima u regionu glave i vrata (11, 12). Za karcinome cerviksa izazvanih grupom visokorizičnih tipova u 80%

slučajeva odgovorni su HPV16 i HPV18 (13-15).

Epidemiološke i biološke studije ukazuju na to da je širom sveta HPV tip 16 najzastupljeniji genotip među pacijentima obolelim od karcinoma grlića materice (16). Na osnovu razlika u nukleotidnoj sekvenci ovog tipa, koja iznosi 1-10% na nivou celog genoma, pokazano je postojanje četiri filogenetske linije ili varijante (A-D), koje su potom podeljene u podlinije ili podvarijant ukoliko su razlike nukleotida između podvarijanti unutar iste linije iznosile 0,5-1%. Pokazane su i jasne razlike u geografskoj distribuciji ovih varijanti (17). U okviru varijante A razlikuju se podlinije A1, A2, A3 (evropske varijante) i A4 (azijska varijanta). Linija B obuhvata podvarijante B1-B4, a linija C podvarijante C1-C4 (afričke varijante). Na kraju, linija D se grana na D1 (severnoamerička varijanta), D2, D3 (azijsko-američke varijante) i D4 podvarijantu (18-20). Evropske HPV16 A1, A2 i A3 podvarijante odgovorne su za većinu HPV infekcija širom sveta (21, 22).

Cilj ovog rada je ispitivanje varijabilnosti nukleotidne sekvence L1 gena HPV16 izolata iz grlića materice žena u našoj populaciji.

## Materijal i metode

U ovom istraživanju analizirano je 37 nukleotidnih sekvenci L1 gena HPV16 preuzetih iz baze podataka virusološke laboratorije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Sekvence su dobijene iz uzoraka briseva grlića materice, uzetih tokom 2019. godine. Uzorci su potom obrađeni molekularnim tehnikama. Ekstrakcija virusne DNK rađena je po protokolu proizvođača, a potom je vršena amplifikacija polimerazne lančane reakcije (PCR) primenom prajmera za L1 gen.

## Identifikacija varijanti humanog papiloma virusa 16 i filogenetska analiza

Dobijene genske sekvence upoređene su sa već poznatim sekvencama iz *GenBank* baze podataka, pomoću *BLAST* (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) programa (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). Referentni genomi HPV16 varijanti i referentni genom HPV18 preuzeti su iz *PaVe* baze podataka (<https://pave.niaid.nih.gov/>): A1 (*Genbank* pristupni broj K02718), A2 (AF536179), A3 (HQ644236), A4 (AF534061), B1 (AF536180), B2 (HQ644298), C1 (AF472509), D1 (HQ644257), D2 (AY686579), D3 (AF402678), HPV18 (X05015).

Primenom *MEGA* (engl. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, verzija X) softverskog paketa, nukleotidne sekvence su direktno upoređene i poravnate primenom *Clustal W* programa. Poravnate su protein kodirajuće sekvence. Konstrukcija filogenetskog stabla vršena je na osnovu *Neighbor-Joining* metode uz statističku podršku (*bootstrap*) od 1000 ponavljanja.

Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti korišćen je *Maximum Composite Likelihood Model* i odnos tranzicija/transverzija od 2.0.

## Rezultati

Ukupno 37 nukleotidnih sekvenci L1 gena HPV16 poravnato je sa referentnim genomima HPV16 varijanti i referentnim genomom HPV18 na osnovu protein kodirajućih sekvenci (slika 1).

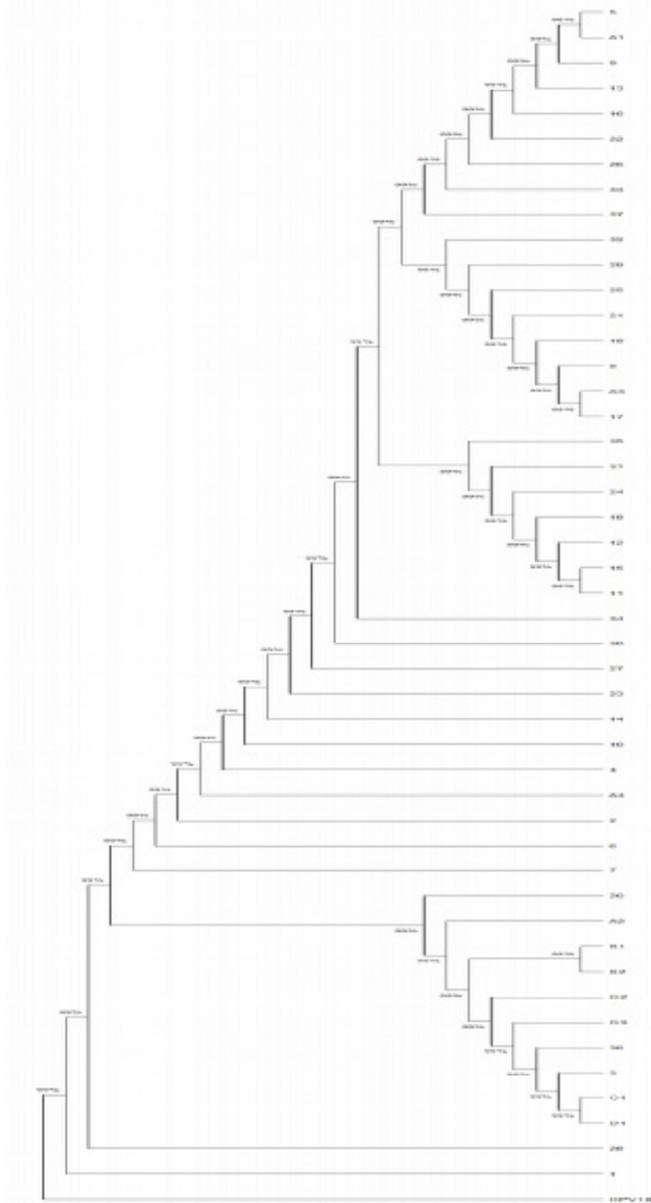
Poravnate nukleotidne sekvence veličine 408 bp korišćene su za konstrukciju filogenetskog stabla.

Filogenetska analiza je pokazala da se najveći broj HPV16 izolata (23 od 37) grupiše u evropske podlinije. Uz podliniju A1 grupisalo se 15 izolata, 7 uz podliniju A3 i 1 uz podliniju A2.



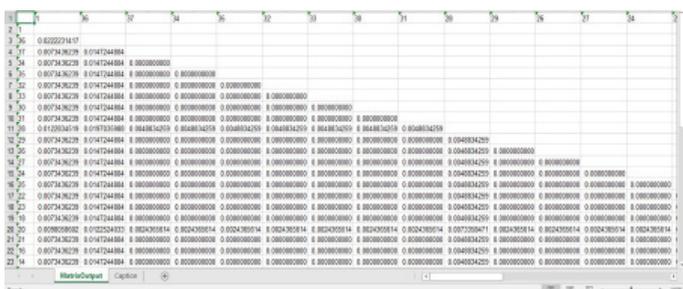
**Slika 1.** Izgled poravnatih nukleotidnih sekvenci L1 gena HPV 16 izolata sa referentnim HPV16 varijantama i referentnim HPV18 genomom

Izolati 3 i 36 grupisali su se uz Afričku C1 podliniju. Dva izolata (1 i 28) izdvojila su se u posebne grane (slika 2).



**Slika 2.** Izgled poravnatih nukleotidnih sekvenci L1 gena HPV 16 izolata sa referentnim HPV16 varijantama i referentnim HPV18 genomom

Nukleotidna udaljenost među sekvencama je pokazala da se razlike između HPV16 varijanti i naših izolata kreću od 0% do 1% (slika 3).



**Slika 3.** Nukleotidne distance HPV16 L1 izolata

## Diskusija

Veliki broj studija koji se bavio mapiranjem i praćenjem geografske distribucije različitih HPV varijanti pokazao je da su evropske varijante HPV16 odgovorne za najveći broj infekcija ovim virusom u svetu (21, 22). Značaj ispitivanja HPV nalazi se u činjenici da karcinomi grlića materice, izazvani humanim papiloma virusima, predstavljaju treći najčešći malignitet među osobama ženskog pola, odmah iza karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma (23).

Uočena je različita geografska distribucija, kao i različit karcinogeni potencijal između različitih HPV16 linija, tj. varijanti (24-26). U studiji koju su uradili Kliford (*Clifford*) i saradnici, analizirano je 7116 HPV16 pozitivnih uzoraka cerviksa prikupljenih iz 52 države širom sveta. Države su dodatno grupisane u osam geografskih regiona (Severna Afrika, Supsaharska Afrika, Istočna Azija, Južna Azija, Evropa, Severna Amerika, Južna/Centralna Amerika i Okeanija). Najveći broj uzoraka (78,7%) pripadao je podliniji A1, a primećena je i njegoja dominantna zastupljenost u Evropi, Americi, Južnoj Aziji i Okeaniji. Istu distribuciju, sa izuzetkom Južne Azije, ima i A2 podlinija, dok su podlinije A3 i A4 većinski bile prisutne u Istočnoj Aziji. S druge strane, podlinije B i C bile su skoro u potpunosti ograničene na afrički kontinent, a podlinija D je bila najčešća u Južnoj i Centralnoj Americi (27). Ova velika raznolikost i različita zastupljenost posledica su ljudskih kretanja, kao i ekspanzije same populacije (28).

U okviru naše studije najveći broj HPV16 izolata (23 od 37) grupisao se uz evropske varijante (A1, A2 i A3), što ukazuje da i u našoj populaciji prevladavaju evropske varijante HPV16. Dobijeni podaci su veoma slični analizi HPV16 izolata koja je sprovedena u periodu od januara 2014. do decembra 2015. godine u Vojvodini, gde je prikupljeno i genski analizirano 564 uzoraka cervikalnih briseva nasumično odabranih žena uzrasta 18-69 godina. U više od pola uzoraka (51,8%) uočeno je prisustvo jednog ili više visokorizičnih tipova, a najveću prevalenciju je imao tip HPV16 (34,2%). Nad 38 izdvojenih uzoraka izvršena je filogenetska analiza L1 gena i skoro svi detektovani tipovi HPV16 (27 od 28; 96,4%) grupisali su se uz evropske A varijante. Preostali izolat HPV16 se grupisao sa linijom D (29). Međutim, za razliku od gore navedenog istraživanja, rezultati naše studije su pokazali da se jedan deo HPV16 izolata grupisao uz A4 azijsku varijantu, a dva izolata su se grupisala uz afričku C1 varijantu. Ova razlika je verovatno posledica vremenske distance jer su uzorci ispitivani u ovoj studiji iz 2019. godine. Pored toga, dva izolata su se izdvojila u zasebne grane, što ukazuje na potrebu za detaljnijom analizom ovih izolata.

Dominacija evropskih varijanti uočena je i u okviru istraživanja u Tunisu među ženama uzrasne dobi 21-64 godine koje su odabrane zbog postojanja cervikalnih lezija. Od 49 ispitanica, prisustvo HPV16 uočeno je kod 15 žena (30,6%), među kojima je 65% imalo prekancerozne ili kancerozne lezije. Putem filogenetske analize L1 gena

zapaženo je grupisanje četrnaest HPV16 izolata oko evropskih varijanti (A1-A3), dok se samo jedan izolat grupisao sa afričkom B1 varijantom (30).

Analiza nukleotidnih distanci je pokazala da su razlike između HPV16 varijanti i naših izolata 0% do 1%, tj. na nivou podvarijanti, što je u skladu sa postojećom klasifikacijom podvarijanti.

## Zaključak

Rezultati ove studije ukazuju da su u našoj populaciji najzastupljenije evropske varijante HPV16 virusa, ali ukazuju i na prisustvo neevropskih varijanti. Dalja analiza je neophodna u cilju praćenja cirkulacije HPV16 varijanti u našoj populaciji.

## Literatura

- Knežević A, 2019. Medicinska mikrobiologija. 1st ed. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, pp.513-18.
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015; 7(7):3863-90.
- Boulet G, Horvath C, Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem. Cell Biol*. 2007; 39(11):2006-11.
- Forman D, de Martel C, Lacey C, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*. 2012; 30:12-23.
- Chesson H, Ekweue D, Saraiya M, Dunne E, Markowitz L. The cost-effectiveness of male HPV vaccination in the United States. *Vaccine*. 2011; 29(46):8443-50.
- Winer R, Feng Q, Hughes J, O'Reilly S, Kiviat N, Koutsky L. Risk of Female Human Papillomavirus Acquisition Associated with First Male Sex Partner. *J Infect Dis*. 2008; 197(2):279-82.
- Mühr L, Eklund C, Dillner J. Towards quality and order in human papillomavirus research. *Virology*. 2018; 519:74-6.
- de Villiers E. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Viol*. 2013; 445(1-2):2-10.
- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Viol*. 2009; 384(2):260-5.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Ghissassi F et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009; 10(4):321-2.
- Serrano B, Brotons M, Bosch F, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018; 47:14-26.
- de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017; 141(4):664-70.
- Bello B, Spinillo A, Alberizzi P, Cesari S, Gardella B, D'Ambrosio G et al. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *J Med Virol*. 2009; 81(4):703-12.
- Bosch F, Manos M, Munoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87(11):796-802.
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders P, Clifford G. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2010; 128(4):927-35.
- Zehender G, Frati E, Martinelli M, Bianchi S, Amendola A, Ebranati E et al. Dating the origin and dispersal of Human Papillomavirus type 16 on the basis of ancestral human migrations. *Infect Genet Evol*. 2016; 39:258-64.
- de Sanjose S, Quint W, Alemany L, Geraets D, Klaustermeier J, Lloveras B et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11(11):1048-56.
- Bernard H, Burk R, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers E. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Viol*. 2010; 401(1):70-9.
- Burk R, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Viol*. 2013; 445(1-2):232-43.
- Mirabello L, Clarke M, Nelson C, Dean M, Wentzensen N, Yeager M et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. 2018; 10(2):80.
- Cornet I, Gheit T, Iannacone M, Vignat J, Sylla B, Del Mistro A et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*. 2012; 108(1):240-4.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk R, Sylla B et al. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012; 86(12):6855-61.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014; 136(5):359-86.
- Park J, Shin S, Kim E, Kim Y, Oh S et al. Association of human papillomavirus type 16 and its genetic variants with cervical lesion in Korea. *APMIS*. 2016; 124(11):950-7.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A et al. Human Papillomavirus Type 16 Variants and Risk of Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(4):315-8.
- Rader J, Tsaih S, Fullin D, Murray M, Iden M, Zimmermann M et al. Genetic variations in human papillomavirus and cervical cancer outcomes. *Int J Cancer*. 2019; 144(9):2206-14.
- Clifford G, Tenet V, Georges D, Alemany L, Pavón M, Chen Z et al. Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women. *Papillomavirus Res*. 2019; 7:67-74.
- Bernard H. Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol*. 1994;2(4):140-3.
- Kovačević G, Milošević V, Knežević P, Knežević A, Knežević I, Radovanov J et al. Prevalence of oncogenic Human papillomavirus and genetic diversity in the L1 gene of HPV16 HPV 18 HPV31 and HPV33 found in women from Vojvodina Province Serbia. *Biologicals*. 2019; 58:57-63.
- Jendoubi-Ferchichi M, Satouri L, Ghoul F, Malek-Mellouli M, Derbal A, Makni M et al. Phylogeny and Classification of Human Papillomavirus (HPV)16 and HPV18 Variants Based on E6 and L1 genes in Tunisian Women with Cervical Lesions. *Asian Pac J Cancer*. 2018; 19(12):3361-6.