

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας:**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΜΙΧΑΛΗΣ ΠΑΠΑΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ

**«Ανάπτυξη μιας real-time multiplex PCR για την ανίχνευση και
το μοριακό χαρακτηρισμό των υψηλού κινδύνου ιών HPV
16,18,31,33,35,51,66»**

**Επιβλέπων: Π. Μαρκουλάτος, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με
έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας**

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**«Development of a real-time multiplex PCR for the detection and
molecular characterization of high-risk HPV types
16,18,31,33,35,51,66»**

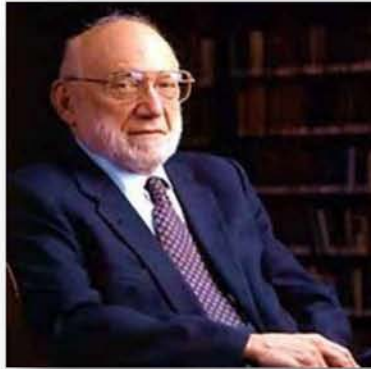
Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Μαρκουλάτος: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία και στη μελέτη εντεροϊών και ιών HPV, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Μόσιαλος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, με έμφαση στην βιολογία των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γρηγόριος Αμούτζιας: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γονιδιωματική, με έμφαση στους γονιδιακούς και γενωμικούς διπλασιασμούς στη γονιδιακή ρύθμιση, στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και στην φωσφορυλίωση, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013



**“The single biggest threat to man's continued dominance on the planet
is the virus”**

Joshua Lederberg (1925 – 2008), zoologist, microbiologist, virologist, geneticist & xenobiologist
(Nobel in Physiology or Medicine, 1958)

**“If we can make the correct diagnosis, the healing can begin. If we can't,
both our personal health and our economy are doomed”**

Andrew Weil (1942 -), medical doctor, professor & author

Ευχαριστίες

Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που με βοήθησαν και με στήριξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής μου, τον κ. Μόσιαλο, τον κ. Αμούτζια και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο, για το αληθινό ενδιαφέρον του και για την αποδοχή στην ερευνητική του ομάδα. Μου δίδαξε πολλά και με στήριξε σε πολλούς τομείς, καθ' όλη την περίοδο της εκπόνησης της εργασίας μου. Ήταν πραγματικά τιμή και ευχαρίστησή μου να βρίσκομαι στο εργαστήριό του. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω και όλους τους υπόλοιπους καθηγητές για όλα όσα μου δίδαξαν κατά την περίοδο των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Επιπρόσθετα, θέλω να ευχαριστήσω την Α. Βουλγάρα και τα λοιπά μέλη της Γραμματείας του Τμήματος, για την άριστη αντιμετώπιση των σπουδαστών, την ευγένεια, την προθυμία, το ενδιαφέρον και την προσφορά τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τσακογιάννη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βαλεντίνα Διαμαντίδου, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν, την άριστη συνεργασία, τις συμβουλές και την καθοριστικής σημασίας καθοδήγησή τους για την ομαλή διεξαγωγή της εργασίας μου. Τους υποψήφιους διδάκτορες Ειρήνη, Τηλέμαχο και Κατερίνα, όπως και την Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, μέλος του Ειδικού Τεχνικού και Διδακτικού προσωπικού του Τμήματος, που εκτιμώ πολύ, που με βοήθησαν σε ό,τι χρειάστηκα από την αρχή έως το τέλος της εργασίας μου, καθώς και όλα τα μέλη των ερευνητικών ομάδων του κ. Μαρκουλάτου και του κ. Μόσιαλου, για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον στο χώρο εργασίας.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, τους φίλους μου και ιδιαίτερα τον καλό μου φίλο Διονύση, για την φιλία και την στήριξή του, κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για την προσφορά, την υπομονή και την στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχές για ένα καλύτερο αύριο...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΕΡΙΛΗΨΗσελ. 9

ABSTRACTσελ. 10

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗσελ. 11

1.1. Ταξινόμηση των HPV (Human Papilloma Viruses)

1.2. Γονιδίωμα και πρωτεΐνες των PV

1.2.1. Οργάνωση του γονιδιώματος των PV

1.2.2. Οι πρώιμες (E) πρωτεΐνες των PV

1.2.3. Οι όψιμες (L) πρωτεΐνες των PV

1.3. Κύκλος ζωής των PV

1.4. HPV και καρκίνος

1.5. Διάγνωση HPV λοιμώξεων

1.6. Αντιμετώπιση των HPV

1.7. Σκοπός της εργασίας

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙσελ. 47

2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου L1 των υψηλής επικινδυνότητας τύπων HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66

2.2. Ανάπτυξη Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πολύπλεξης, πραγματικού χρόνου (multiplex Real-time PCR) για την ανίχνευση τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας

2.2.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

2.2.1.1. Αντιδράσεις PCR των διαδοχικών αραιώσεων

2.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.1.3. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR

2.2.2. Δημιουργία ομάδων αντιδράσεων ποσοτικής PCR πολύπλεξης (multiplex real time PCR groups)

2.2.3. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων

2.2.3.1. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με multiplex real-time PCR

2.2.3.2. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη

2.2.4. Ποσοτικοποίηση κλινικών δειγμάτων με real-time PCR

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑσελ. 71

3.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου L1 των υψηλής επικινδυνότητας τύπων HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66

3.2. Ανάπτυξη Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πολύπλεξης, πραγματικού χρόνου (multiplex Real-time PCR) για την ανίχνευση τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας

3.2.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

3.2.1.1. Αντιδράσεις PCR των διαδοχικών αραιώσεων

3.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

3.2.1.3. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR

3.2.2. Δημιουργία ομάδων αντιδράσεων ποσοτικής PCR πολύπλεξης (multiplex real time PCR groups)

3.2.3. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων

3.2.3.1. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με multiplex real-time PCR

3.2.3.2. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη

3.2.4. Ποσοτικοποίηση κλινικών δειγμάτων με real-time PCR

3.2.5. Τελικά αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗσελ. 95

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑσελ. 100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) μολύνουν κύτταρα της επιδερμίδας και του βλεννογόνου επιθηλίου και ευθύνονται για το σύνολο σχεδόν των καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας, καθώς και για το 50-95% των υπολοίπων περιγεννητικών καρκίνων. Ετήσια, παρατηρούνται άνω των 500.000 νέα περιστατικά και άνω των 270.000 θάνατοι από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, αποτελώντας ένα από τα πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα.

Εμφανίζουν υψηλή ετερογένεια που αγγίζει τους 180 τύπους, όμως μόνο οι τύποι υψηλού κινδύνου ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκίνου, με τους HPV 16 & 18 να ευθύνονται για το 70% του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Είναι ιοί μικρού μεγέθους, καλύπτονται με καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, με δίκλωνο κυκλικό DNA, οργανωμένο σε τρεις λειτουργικές περιοχές: την κύρια ρυθμιστική περιοχή (LCR ή NCR), την περιοχή έκφρασης των πρώιμων πρωτεϊνών (E, early proteins) και την περιοχή των όψιμων πρωτεϊνών (L, late proteins). Οι E6 & E7 αποτελούν τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού.

Σήμερα διατίθενται δύο προφυλακτικά εμβόλια με στόχους τους HPV 16/18, καθώς και τους 6/11 που προκαλούν καλοήθειες. Δεν υπάρχει ολοκληρωμένη θεραπεία, επομένως υψίστης σημασίας είναι η έγκυρη διάγνωση κι ο εμβολιασμός.

Οι μέθοδοι ελέγχου για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας περιλαμβάνουν το κλασσικό test Pap και τα νεότερα HPV test. Τα τελευταία περιλαμβάνουν μοριακές μεθόδους ανίχνευσης των ιών, όπως PCR, qPCR, NASBA και μεθόδους υβριδισμού.

Στόχος της παρούσας εργασίας η ανάπτυξη μιας πρωτότυπης συνδυαστικής διαγνωστικής μεθόδου HPV τύπων υψηλής επικινδυνότητας, με ποσοτική PCR πολύπλεξης με SYBR Green για διάκριση τύπων με βάση την διαφορά Tm και επακόλουθη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης για διάκριση με βάση το μοριακό τους βάρος. Ο συνδυασμός των δύο τεχνικών έχει ως στόχο την ταχύτερη σάρωση και την αύξηση της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης.

ABSTRACT

Human Papillomaviruses (HPV) infect cutaneous and mucosal cells and are implicated in an elevated percentage in the development of cervical cancer (almost 100%) and for 50-95% of the other perigenital cancers. More than 500.000 new cervical cancer cases and more than 270.000 deaths are encountered annually. Therefore, it is globally, one of the most common sexual transmitted diseases (STD).

HPVs present high diversity. Today, more than 180 types are reported. However, only the high risk types can cause cancer. HPV 16 & 18 are the most common and are responsible for almost 70% of cervical cancer cases.

HPV are small sized, non-enveloped, circular dsDNA viruses, that present a **T7 icosahedral symmetry**. HPV's genome consists of **3 distinct functional clusters: the Long Control Region (LCR or NCR), the early (E) genes region and the late (L) genes region**. E6 & E7 are the main HPV oncogenes that lead to tumorigenesis.

Today, there are two prophylactic vaccines that target the high risk 16/18 types and HPV 6/11, the most common low risk types that cause non-cancerous **abnormalities**. **There isn't any cure for HPV infections, so vaccination and accurate diagnosis are of a high importance.**

Current cervical cancer screening methods are the Pap test and molecular HPV assays. The later include a variety of molecular diagnostic methods for HPV detection and quantification, such as PCR, qPCR, NASBA, and hybridization assays.

Purpose of the present thesis was the development of a novel diagnostic method for **high-risk HPV types infections' screening, using a combination of multiplex real-time PCRs based on SYBR Green and agarose gel electrophoresis; the combination of which two led to a rapid, sensitive and accurate sample screening.**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

Ο ιός αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες βιολογικές απειλές για την ανθρώπινη υγεία. Αποτελεί μια πολλαπλασιαζόμενη παρασιτική οντότητα και διχάζει την επιστημονική κοινότητα για το εάν αποτελεί έναν «εν ζωή» οργανισμό. Είναι μια «μηχανή» που αποτελείται από βιολογικά μακρομόρια με μοναδικό σκοπό να αναπαραχθεί παρασιτικά στο εσωτερικό των οργανισμών, οδηγώντας τους σε βλάβες ή ακόμα και στον θάνατο. Παρά την ικανότητα αναπαραγωγής, δεν χρειάζεται καμία απολύτως πηγή ενέργειας για να επιβιώσει, όπως όλοι οι οργανισμοί. Ο ιός μπορεί να παραμείνει λειτουργικός για μεγάλο χρονικό διάστημα είτε ελεύθερος, είτε σε ξενιστή. Μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή και να παραμείνει «σιωπηλός» για χρόνια ή/και να περάσει από την μία γενιά στην επόμενη και να καταστεί πλέον «αθάνατος». Η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή οδηγεί είτε σε αδρανοποίησή του, είτε σε καρκινογένεση, μεταβάλλοντας την έκφραση γονιδίων του ξενιστή και εκφράζοντας ιικά ογκογονίδια. Στους ογκογόνους ιούς του ανθρώπου ανήκουν οι: HTLV1 (human T-cell lymphotropic virus), οι οποίοι προκαλούν T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία, οι ιοί της ηπατίτιδας B & C που προκαλούν καρκίνο του ήπατος, ο EBV (Epstein-Barr virus) που συνδέεται κυρίως με λεμφώματα Burkitt, ο ερπητοϊός τύπου 8 (Human herpes virus type 8, HHV-8) που προκαλεί σάρκωμα Kaposi και οι HPV (Human papilloma virus) που προκαλούν κυρίως καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (*cancerworld.org*).

Οι HPV (Human Papilloma Viruses, ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον ιολόγο Herald zur Hausen. Το έτος 2008, απονεμήθηκε το βραβείο Nobel Ιατρικής/Φυσιολογίας κατά το ήμισυ στον zur Hausen για την ανακάλυψη των HPV που προκαλούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και στους Françoise Barré-Sinoussi και Luc Montagnier για την ανακάλυψη του HIV (Human Immunodeficiency Virus), (Εικόνα 1.1), (*Nobelprize.org*).

Η ύπαρξη ογκογόνων ιών ήταν γνωστή ήδη από το 1911, όταν ο Peyton Rous απομόνωσε τον ρετροϊό RSV (Rous sarcoma (retro)virus) από πτηνά στα οποία προκαλούσε σάρκωμα. Το έτος 1933, ο R. Shope, μελέτησε τη μολυσματική θηλωμάτωση σε λαγόμορφα, αντίστοιχη με την ανθρώπινη και οδηγήθηκε στο

συμπέρασμα, ότι οφείλεται σε ιό (Shope et al, 1933). Τα επόμενα χρόνια, μελέτησε την μετάδοση του «Shope Papilloma Virus», μεταξύ διαφορετικών λαγόμορφων (Selbie et al, 1948). Στην αρχή της δεκαετίας του 1960, ο Ludwig Gross απέδειξε πως οι ρετροϊοί μπορούν να επάγουν ογκογένεση σε μύες και γάτες. Μέχρι την ανακάλυψη της συσχέτισης των HPV με τον μεταδιδόμενο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, υπήρχαν ισχυρισμοί πως ευθύνονται οι ερπητοϊοί. Ο ιολόγος zur Hausen άρχισε να ασχολείται στα μέσα της δεκαετίας του 1970 με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, θεωρώντας ότι υπεύθυνος είναι ο HPV. Τελικά την περίοδο 1977-1980, απομόνωσε από σπύλους τον HPV 6, ο οποίος όμως απουσίαζε από καρκινικά κύτταρα. Στην συνέχεια, απομόνωσε τον HPV 11, ο οποίος είχε κάποιες ομοιότητες σε επίπεδο αλληλουχίας με το DNA των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα, απομονώθηκαν οι HPV 16 και 18 από καρκινικά κύτταρα (περίπου στο 50% και 20% των καρκινικών κυττάρων αντίστοιχα) και ολοκληρώθηκε η συσχέτιση HPV και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (P. McIntyre, 2005). Ο zur Hausen όχι μόνο πρωταπομόνωσε τον HPV και απέδειξε την συσχέτισή του με καρκίνο, αλλά ανακάλυψε και την ετερογένειά του και για αυτόν τον λόγο του απονεμήθηκε κατά το ήμισυ το βραβείο Nobel έπειτα από περίπου τρεις δεκαετίες.



Photo: U. Montan

Harald zur Hausen



Photo: U. Montan

Françoise Barré-Sinoussi



Photo: U. Montan

Luc Montagnier

Εικόνα 1.1: Απεικονίζονται οι Harald zur Hausen, Françoise Barré-Sinoussi και Luc Montagnier, οι οποίοι μοιράστηκαν το βραβείο Nobel Ιατρικής/Φυσιολογίας το 2008, ο πρώτος για την ανακάλυψη των HPV που προκαλούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και οι τελευταίοι για την ανακάλυψη του HIV που προκαλεί το AIDS στον άνθρωπο. (Πηγή: Nobelprize.org)

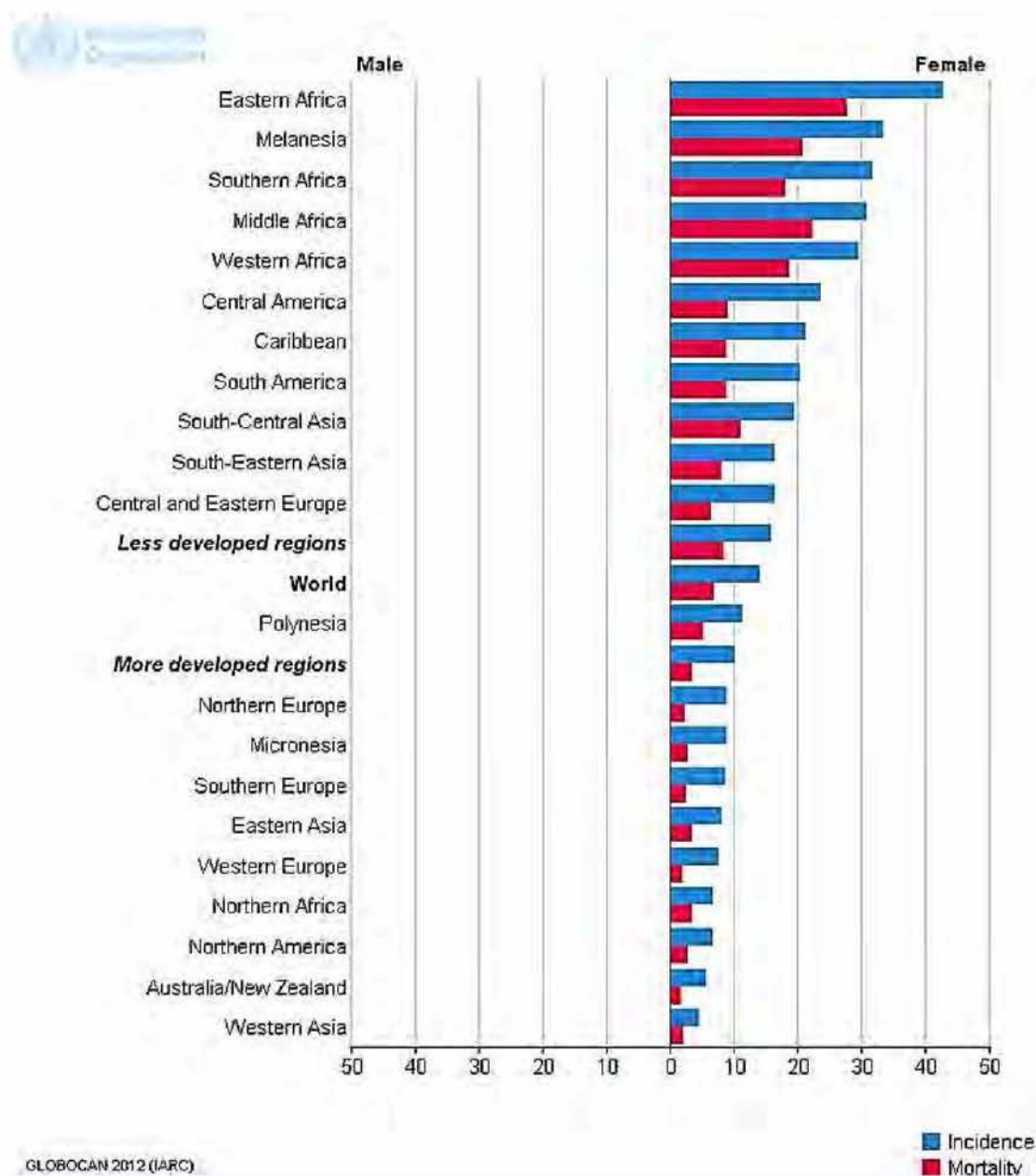
Οι HPV μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες βλάβες στον ξενιστή, ακροχορδόνες, νεοπλασίες, κονδυλώματα γεννητικών οργάνων, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου, του οισοφάγου, του λάρυγγα, ακανθοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος κλπ (Παπαπαναγιώτου, 2004). Συγκεκριμένα, εκτιμάται πως οι HPV ευθύνονται για το σύνολο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, το 95% του καρκίνου του πρωκτού, το 65% του καρκίνου του κόλπου, το 60% του καρκίνου του οισοφάγου και του φάρυγγα, το 50% του καρκίνου του αιδοίου και το 35% του καρκίνου του πέους (Centers for Disease Control and Prevention, cdc.gov).

Υπάρχουν περισσότεροι από 120 τύποι ιών HPV, από τους οποίους περίπου 40 μολύνουν τις περιγεννητικές περιοχές (A. Zuckerman et al, 2004). Αυτοί διακρίνονται σε τύπους υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Στην πρώτη περίπτωση, ανήκουν οι ογκογόνοι τύποι, ενώ στην δεύτερη, τύποι που οδηγούν στην ανάπτυξη σπύλων, όχι όμως σε καρκινογένεση. Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν τύποι όπως: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 & 68, ενώ στους χαμηλού κινδύνου ανήκουν τύποι όπως HPV 6, 11, 42, 43 & 44 (Nindl et al, 1999). Οι πιο συνηθισμένοι τύποι σε κακοήθειες είναι οι 16 και 18 (σύνολο ~70%), ακολουθούμενοι από τους 31, 33 και 45 (Πίνακας 1.1) (Smith et al., 2007).

Πίνακας 1.1: Ποσοστά των πιο κοινών τύπων HPV σε περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στην Ευρώπη. (Πηγή: Smith et al., 2007)

Τύποι HPV	Ποσοστό περιστατικών καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από τον κάθε τύπο HPV (%)
HPV-16	58,1
HPV-18	15,7
HPV-33	4,4
HPV-31	4
HPV-45	2,9
HPV-35	1,6
HPV-58	1,2
HPV-56	1
Λοιποί τύποι	11,1 (<0,6 έκαστος)

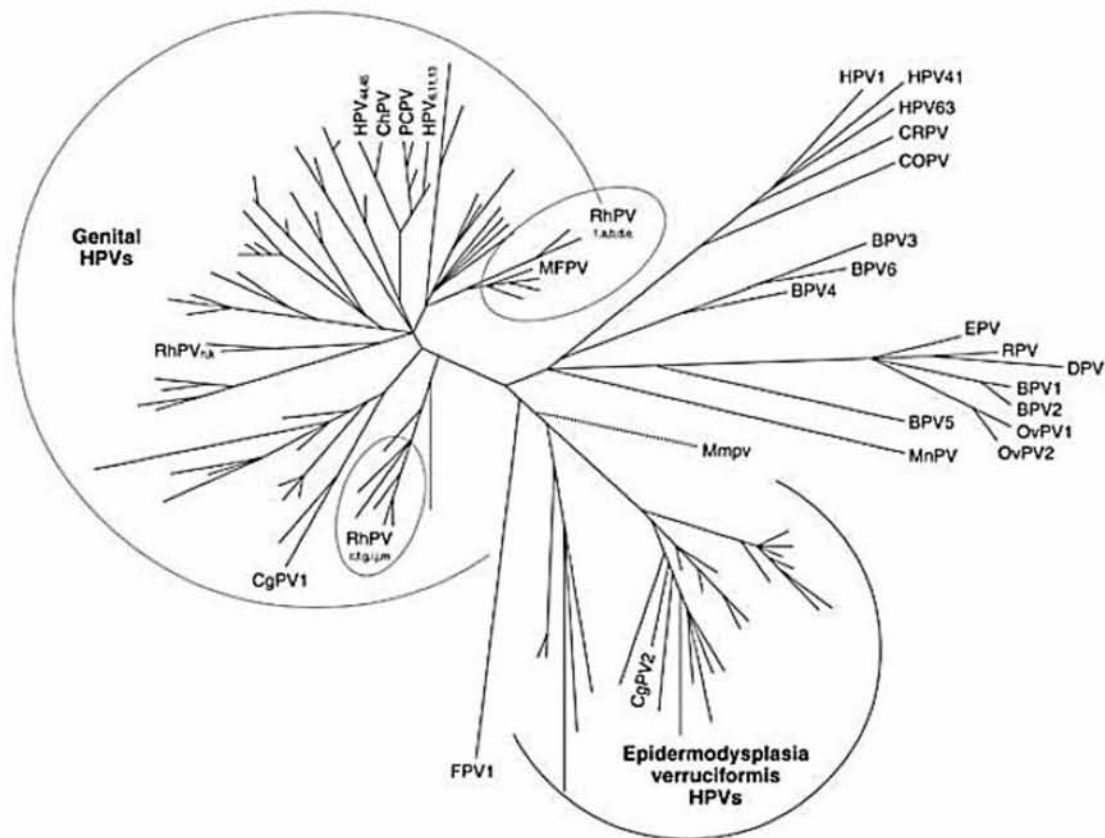
Τα υψηλότερα ποσοστά μολύνσεων από HPV περιγεννητικών περιοχών απαντώνται κυρίως σε ηλικίες 18-28, αν και τα μεγαλύτερα ποσοστά περιστατικών καρκίνου τραχήλου της μήτρας κορυφώνονται άνω των 30 ετών (Koutsky, 1997). Αποτελεί το συχνότερο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα παγκοσμίως. Εκτιμάται πως είναι ο 4^{ος} πιο κοινός τύπος καρκίνου στις γυναίκες. Κάθε χρόνο, εμφανίζονται άνω των 500.000 νέων περιστατικών, ενώ οι ετήσιοι θάνατοι εκτιμώνται σε άνω των 270.000 (World Health Organization). Περί το 85% των περιστατικών και των θανάτων εμφανίζονται σε χώρες του τρίτου κόσμου, ενώ στην Ευρώπη τα μεγαλύτερα ποσοστά βρίσκονται στις ανατολικές χώρες και ακόλουθα στις νότιες (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Εκτιμώμενα παγκόσμια ποσοστά (ανά 100.000) περιστατικών (κυανό) και θανάτων (ερυθρό) από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Πηγή: Globocan 2012)

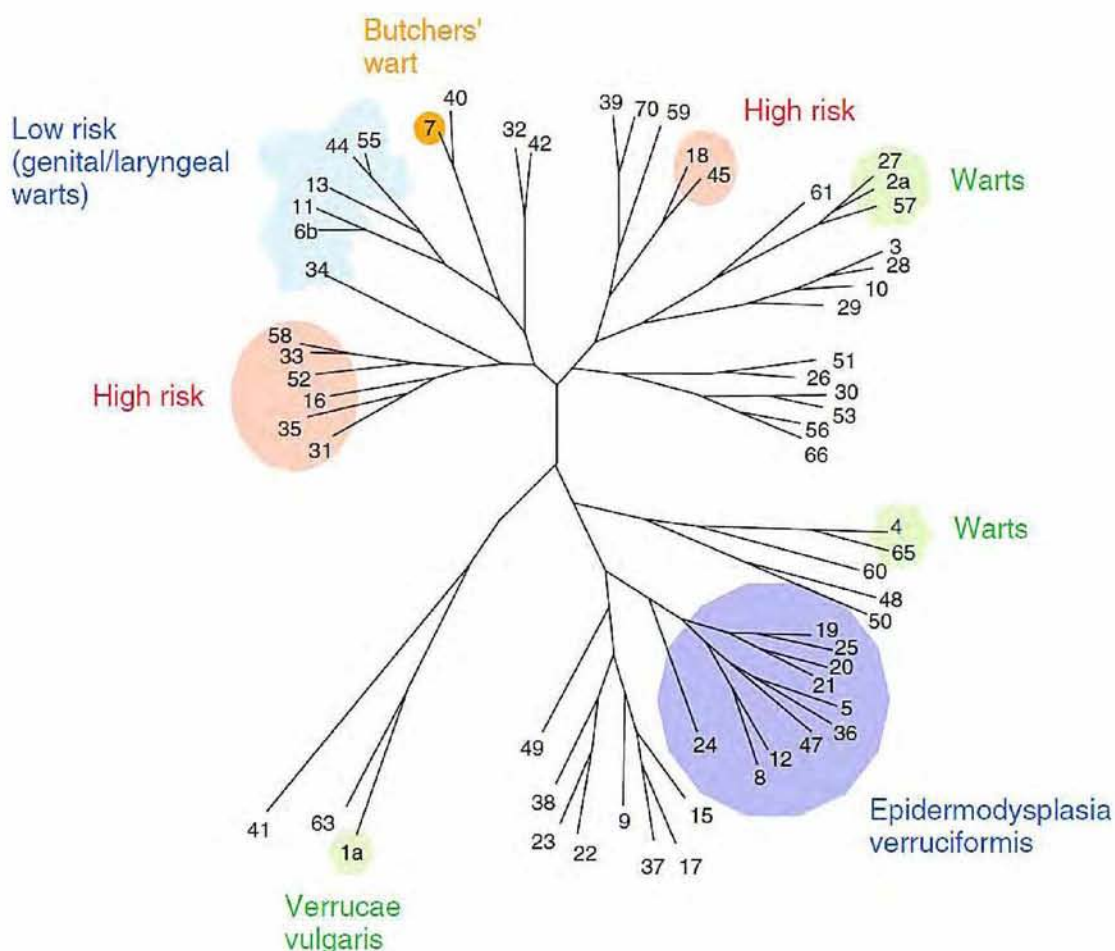
1.1. Ταξινόμηση των HPV (Human Papilloma Viruses)

Οι Papillomaviruses ανήκαν, αρχικά, στην οικογένεια Papovaviridae, μαζί με τους Polyomaviruses και τον ιό πρωτεύοντων SV40. Το όνομα Papovaviridae, προέρχεται από τα αρχικά των ιών που περιλαμβάνονται στην οικογένεια, δηλαδή **P**apilloma, **P**olyoma και simian **V**acuolating virus (SV40) και την κατάληξη -viridae των ιικών οικογενειών. Τα μέλη της οικογένειας έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, όπως το σχετικά μικρό μέγεθός τους, δίκλωνο κυκλικό υπερελικωμένο DNA, το οποίο περιβάλλεται από καψίδια εικοσαεδρικής συμμετρίας απουσία ελύτρου, τον τύπο κυττάρου-ξενιστή που είναι τα κερατινοκύτταρα και το γεγονός ότι δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους σε κύτταρα *in vitro* (L. Haaheim *et al*, 2002). Νεότερες προτάσεις πάντως οδήγησαν στην θεώρησή τους ως ανεξάρτητη οικογένεια από τους polyomaviruses που αποτελούν πλέον μαζί με τον SV40 διακριτή οικογένεια.



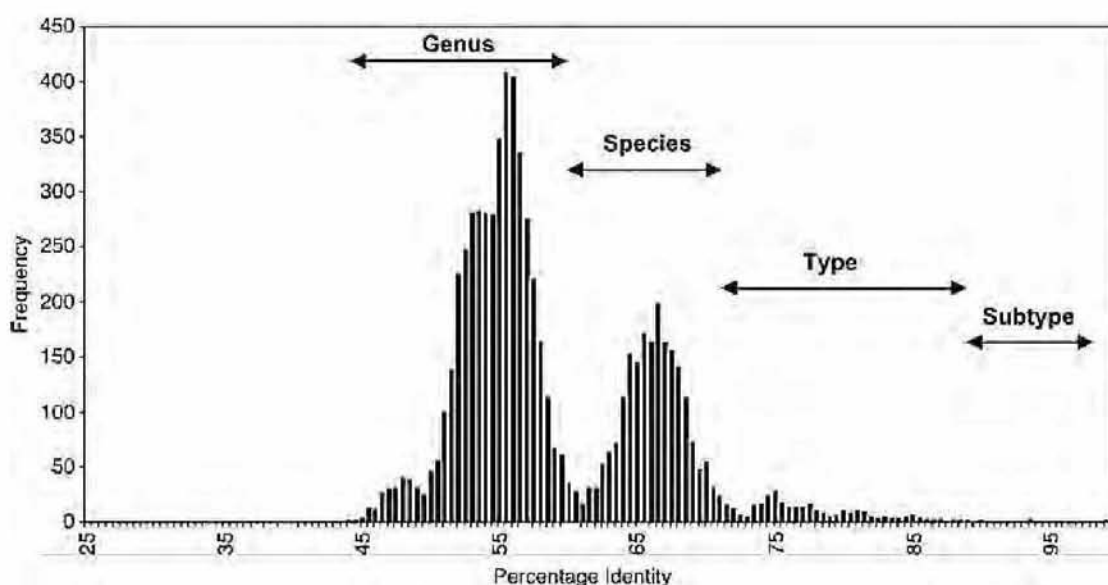
Εικόνα 1.3: Η εξελικτική σχέση μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών ιών θηλωμάτων αναπαριστάται σε φυλογενετικό δένδρο. (Πηγή: A. Granoff, 1999)

Η διάκριση των Papillomaviruses σε τύπους στηρίζεται πρωτίστως στην εξειδίκευσή τους σε διαφορετικά είδη ξενιστή και δευτερευόντως στον βαθμό ομοιότητας του γονιδιώματός τους. Για να θεωρηθεί νέος τύπος, θα πρέπει η αλληλουχική ομοιότητα των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των L1, E6 και E7 να μην ξεπερνάει το 90% σε σχέση με γνωστούς τύπους. Διαφορετικά, θεωρείται υπότυπος ή παράλλαγμα (variant). Οι Papillomaviruses, εκτός από τον άνθρωπο, προσβάλλουν ποικίλους ζωικούς οργανισμούς, όπως διάφορα πρωτεύοντα, σπληφόρα, λαγόμορφα, μύες, κύνες, αιγοπρόβατα, πτηνά κλπ (A. Granoff, 1999). Η διάκριση των ανθρώπινων και των υπόλοιπων ζωικών ιών θηλωμάτων, είναι εφικτή και με βάση τη μελέτη της εξελικτικής τους σχέσης (Εικόνα 1.3). Με τον ίδιο τρόπο, είναι εφικτή και η κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων τύπων, σε επιμέρους ομάδες επικινδυνότητας (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Φυλογενετικό δένδρο που αναπαριστά τις σχέσεις μεταξύ επιλεγμένων HPVs. Οι υψηλού κινδύνου HPV συγκεντρώνονται σε δύο ομάδες, ενώ οι υπόλοιποι σε διαφορετικές επιμέρους ομάδες (Πηγή: J. Carter, 2007)

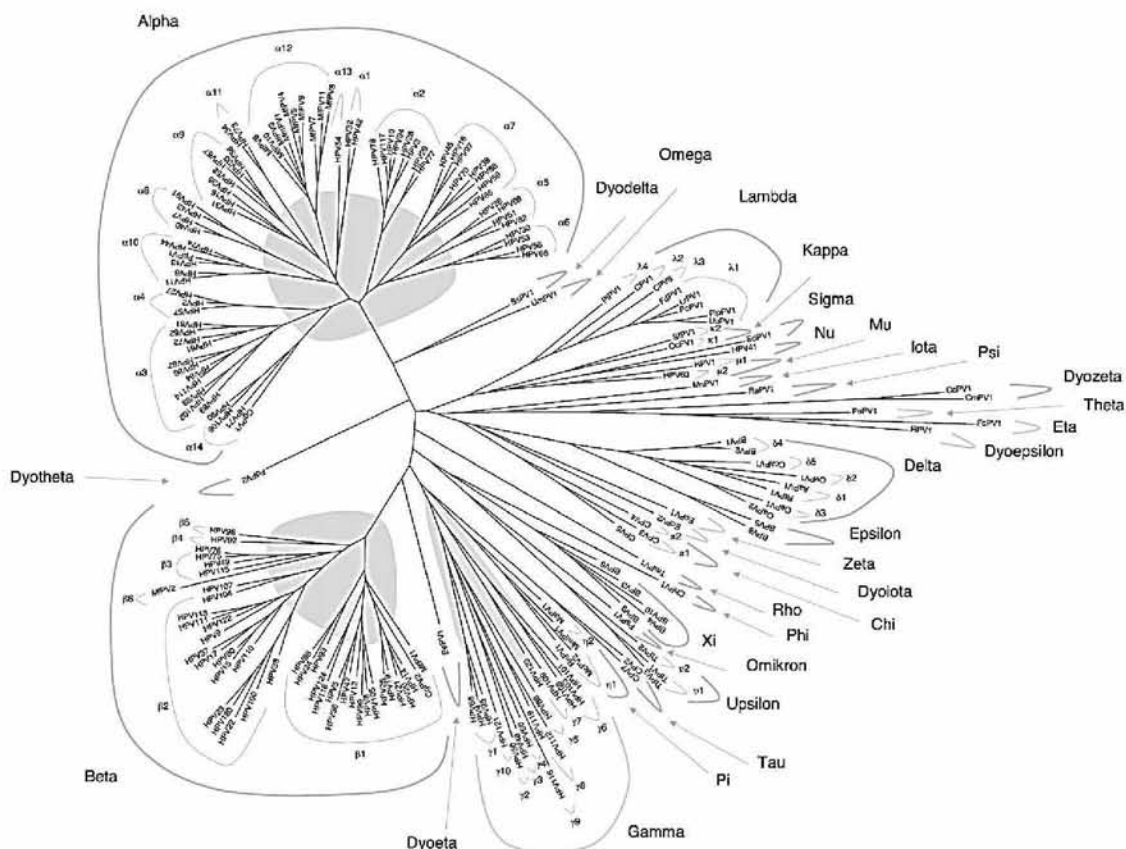
Οι Papillomaviruses στο σύνολό τους, ανεξάρτητα από τον φυσικό ξενιστή τους και με βάση αποκλειστικά και μόνο τις εξελικτικές τους σχέσεις κατηγοριοποιούνται σε 16 γένη τα οποία περιλαμβάνουν όλα τα είδη, τύπους, υποτύπους και παραλλάγματα της οικογένειας των ιών θηλωμάτων. Τα 16 γένη κατονομάζονται με γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου (alpha – pi). Οι HPV εμπεριέχονται στα γένη α, β, γ, μ και ν, ενώ δύο γένη περιλαμβάνουν PV ενός μόνο συγκεκριμένου είδους πτηνού. Το κάθε γένος συγκροτεί ιούς θηλωμάτων με αλληλουχική ομοιότητα κατ' ελάχιστο 60% στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου L1, το κάθε είδος (ομαδοποίηση τύπων) έχει ιούς με αλληλουχική ομοιότητα στο L1 60%-70% περίπου, οι τύποι 70%-90% ομοιότητα αλληλουχίας, οι υπότυποι 90%-98% και παραλλάγματα 98-99% (Εικόνα 1.5) (Burk et al, 2013).



Εικόνα 1.5: Συνεισφορά συχνοτήτων ποσοστών ομοιότητας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου L1 από 118 τύπους ιών θηλωμάτων. (Πηγή: de Villiers et al, 2004)

Η συνεχής ανακάλυψη όμως νέων τύπων οδηγεί στην ανάγκη τροποποίησης της κατηγοριοποίησης σε 16 γένη. Έχει προταθεί η επέκταση των γενών σε 29, ώστε να συμπεριληφθούν και οι νεότεροι τύποι, οι οποίοι το έτος 2010 ανέρχονταν συνολικά στους 189 (120 HPV, 64 PV άλλων θηλαστικών, 3 PV πτηνών και 2 PV ερπετών). Με αυτή την πρόταση συμπληρώνεται το ελληνικό αλφάβητο και επομένως τα επόμενα γένη θα μπορούν να ονομάζονται με το πρόθεμα dyo (δύο) και τα ελληνικά γράμματα (π.χ. dyodelta κλπ). Εξαιρούνται τα τρία πρώτα γένη (dyoalpha, dyobeta, dyogamma) καθώς τα υπάρχοντα θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά και πιθανά να

προκληθεί σύγχυση. Επομένως, σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα ταξινόμησης, το τελευταίο γένος θα είναι το *Dyoiotaparillomavirus* (*Equus caballus Papillomavirus* 2). Τελικά, το φυλογενετικό δένδρο των 189 πλέον γενών, τροποποιείται όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6 (Bernard et al, 2010).

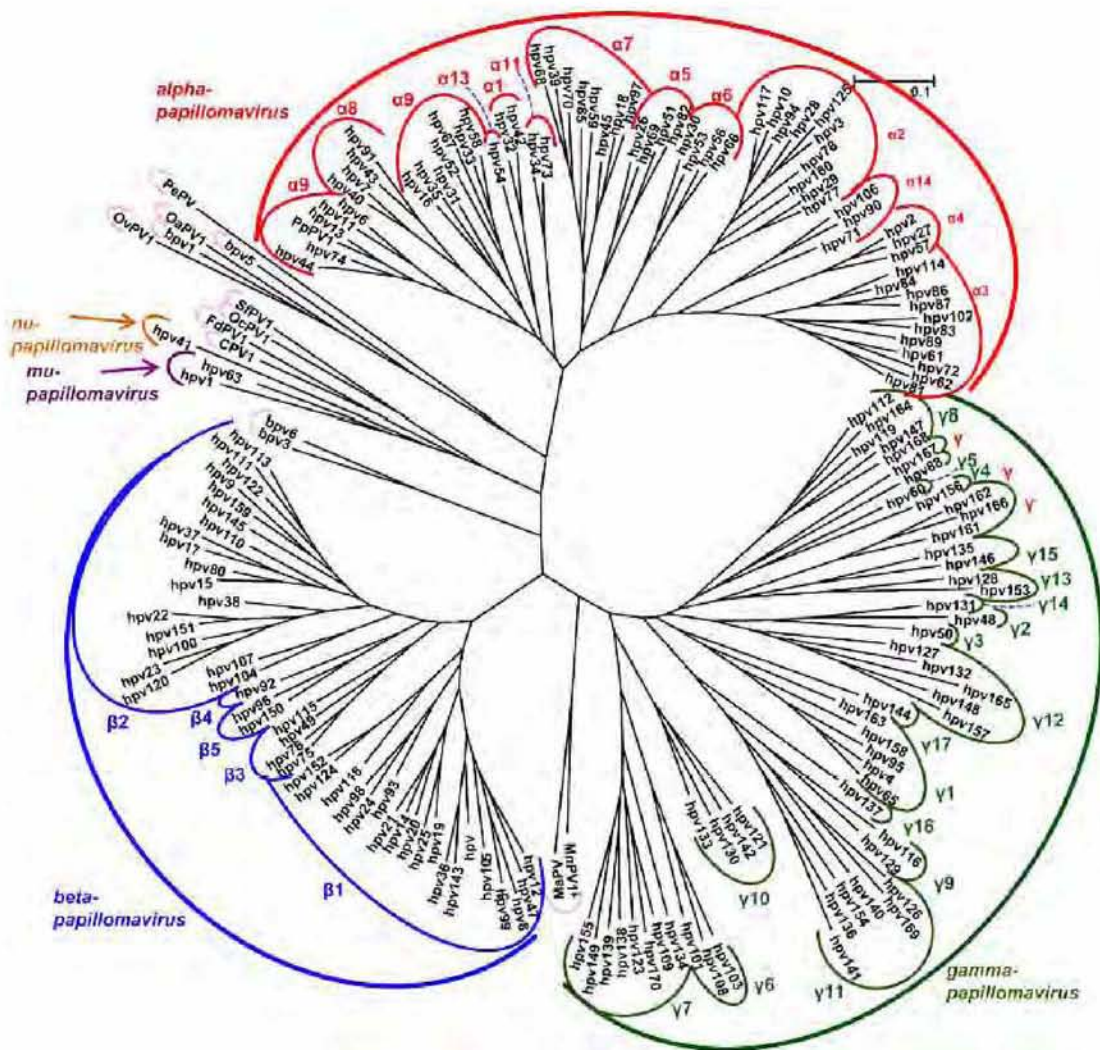


Εικόνα 1.6: Φυλογενετικό δένδρο βασισμένο στην ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου L1 από 189 τύπους papillomaviruses. Η φυλογενετική ανάλυση στηρίζεται στην πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών του L1 των 189 τύπων με 10,000,000 κύκλους για τον αλγόριθμο MCMC (Markov chain Monte Carlo) για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ModelTest v3.7 (Posada et al, 1998) για την επιλογή του βέλτιστου εξελικτικού μοντέλου. (Πηγή: Bernard et al, 2010)

Παρόλα αυτά, πιστεύεται πως οι προσπάθειες μελέτης εξελικτικών σχέσεων των Papillomaviruses, δεν θα έπρεπε να στηρίζονται εξολοκλήρου στη νουκλεοτιδική αλληλουχία, αλλά θα μπορούσαν να εστιάσουν και στον φαινότυπο (π.χ. ογκογονικότητα), ώστε να δημιουργηθεί ένας συγκερασμός των γενών και όχι επέκτασή τους. Επιπλέον, μπορεί να δοθεί περισσότερη έμφαση και στον φυσικό ξενιστή που άσκησε ουσιαστικά εξελικτική πίεση στους τύπους PV, όπως επίσης να ληφθεί υπόψη και η θεωρία της ουδέτερης εξέλιξης, η οποία προβλέπει ότι οι

περισσότερες εξελικτικές αλλαγές αποτελούν «θόρυβο» και επομένως συμπερίληψη αυτών των ιών περιπλέκει περισσότερο την διεξαγωγή συμπερασμάτων στις μελέτες εξελικτικής ανάλυσης (van Doorslaer et al, 2011).

Συνεχώς, απομονώνονται νέοι τύποι HPV ανά τον κόσμο. Το έτος 2013 είχαν ήδη ξεπεράσει τους 170 τύπους, με τελευταίο τον HPV 174 (Kocjan et al, 2013). Η επίσημη ταξινόμηση παραμένει σε 16 γένη όπως προτάθηκε από το 2004 (de Villiers et al, 2004). Συνεχίζονται να γίνονται προσπάθειες ανανέωσης της ταξινόμησης, ώστε να συμπεριλαμβάνονται όλοι οι νεότεροι τύποι HPV (Εικόνα 1.7). Η ανάγκη όμως αποδοχής μιας σύγχρονης και βελτιωμένης μεθόδου ταξινόμησης παραμένει.



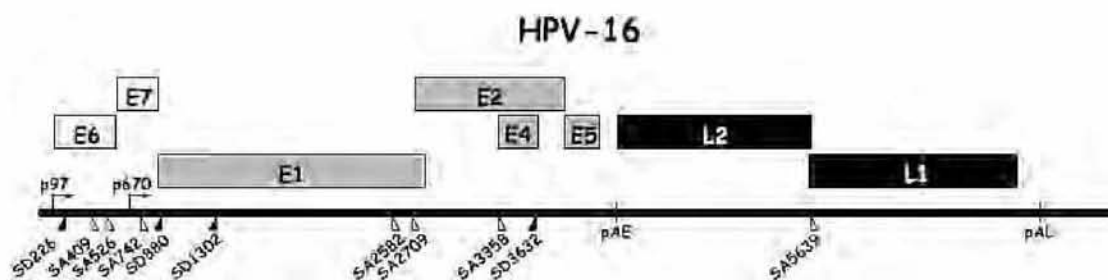
Εικόνα 1.7: Φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στις αλληλουχίες ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης L1 170 τύπων HPV, καθώς και σε μεμονωμένους ζωικούς ιούς θηλωμάτων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης ομοιότητας. Το δένδρο κατασκευάστηκε στο πρόγραμμα MEGA 5.1 (Πηγή: de Villiers, 2013)

1.2. Γονιδίωμα και πρωτεΐνες των PV

Οι Papillomaviruses, όπως έγινε αναφορά σε προηγούμενη παράγραφο, είναι «γυμνοί» ιοί, μικρού μεγέθους, διαμέτρου ~55 nm, με καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας και το γονιδιώμά τους είναι οργανωμένο σε δίκλωνο κυκλικό DNA (τάξη I κατά Baltimore). Το πρώτο γονιδίωμα που αλληλουχήθηκε πλήρως, ήταν ο BPV 1 (bovine papillomavirus 1), το 1982 (*Chen et al, 1982*). Το ίδιο έτος, αλληλουχήθηκε πλήρως και ο πρώτος ανθρώπινος ιός θηλωμάτων, ο HPV 1a (*Danos et al, 1982*). Το γονιδίωμα των PV, μήκους ~8 kbp, παράγει δικιστρονικά ή πολυκιστρονικά μετάγραφα, με δύο ή περισσότερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και τα οποία φέρουν ουρά πολυαδενυλίωσης, είτε σε πρώιμη, είτε σε όψιμη περιοχή poly(A).

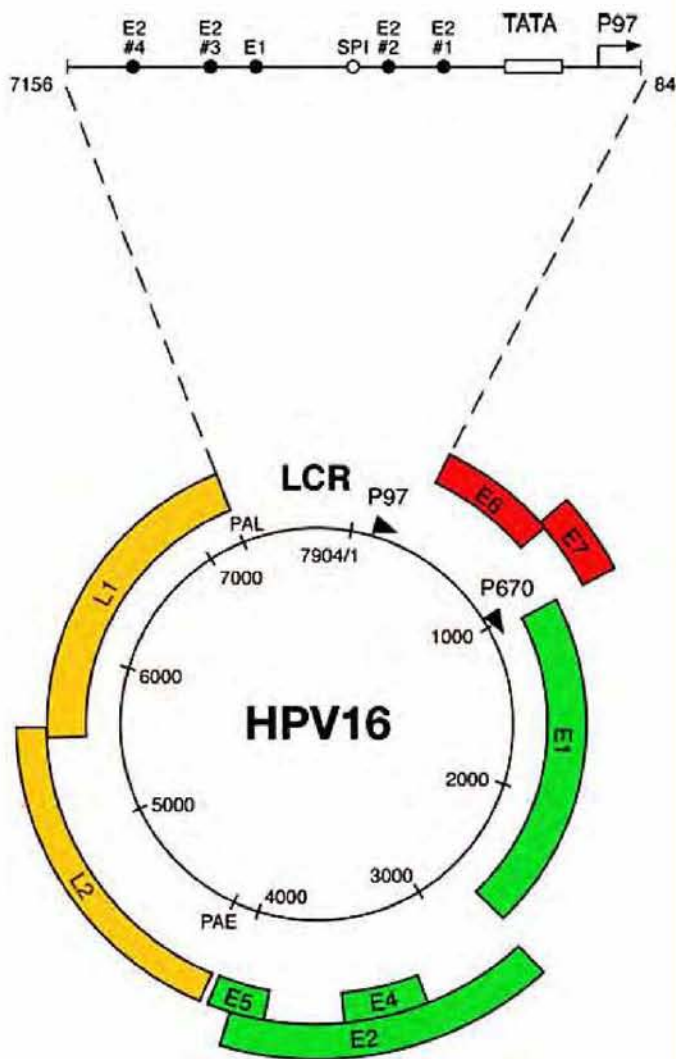
1.2.1 Οργάνωση του γονιδιώματος των PV

Το γονιδίωμα αποτελείται από τρεις περιοχές συνολικά, η περιοχή των πρώιμων πρωτεϊνών, των όψιμων και η ρυθμιστική, μη κωδική περιοχή LCR (Long Control Region) (*Zheng et al, 2006*). Αν και η διάταξή τους διαφέρει ανάμεσα στους τύπους, τα γονίδια των PV εκφράζουν συνολικά 6 πρώιμες πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 & E7) και 2 όψιμες (L1 & L2), όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 1.8. Για την έκφραση των πρωτεϊνών τους, οι PV, εκμεταλλεύονται διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, χρησιμοποιούν διαφορετικούς υποκινητές σε διαφορετικά στάδια και αξιοποιούν σε μεγάλο βαθμό το εναλλακτικό μάτισμα, με πολλαπλές θέσεις ματίσματος (*Schwartz, 2013*).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του HPV 16. Τα κουτιά αναπαριστούν αλληλουχίες που κωδικεύουν τις 8 πρωτεΐνες του ιού, τα βέλη υποδεικνύουν τους 2 υποκινητές και την φορά ανάγνωσής τους και τα μαύρα και λευκά τρίγωνα τις 5' και 3' θέσεις ματίσματος αντίστοιχα. Επίσης, υποδεικνύονται και οι θέσεις πρώιμης και όψιμης πολυαδενυλίωσης pAE & pAL, αντίστοιχα. (Πηγή: *Schwartz, 2013*)

Οι PV φέρουν δύο υποκινητές, οι οποίοι ενεργοποιούνται με διαφορετικό τρόπο στα διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής τους. Είναι ο p97 κι ο p670 και οδηγούν στην έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών. Η ρυθμιστική περιοχή LCR (ή NCR, non-coding region, ~600-900 bp) βρίσκεται ανοδικά του p97 και φέρει θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών όπως οι E1 και E2. Επιπλέον, υπάρχουν δύο περιοχές πολυαδενυλίωσης, μία για την κάθε ομάδα πρωτεϊνών, δηλαδή η pAE για τις πρώιμες πρωτεΐνες και η pAL για τις όψιμες. Οι δύο περιοχές πολυαδενυλίωσης αποτελούν και τα όρια των τριών περιοχών του γονιδιώματος των PV, δηλαδή της περιοχής των πρώιμων πρωτεϊνών, των όψιμων και της ρυθμιστικής περιοχής LCR/NCR (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του HPV 16 (7904bp). Απεικονίζεται σε μαύρο κύκλο με σημειωμένους τους δύο υποκινητές (πρώιμος p97 & όψιμος p670) με βέλη. Τα 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικεύουν τις πρώιμες πρωτεΐνες χρώζονται με πράσινο (E1-E5) και με κόκκινο χρώμα (E6-E7), ακολουθούνται από την πρώιμη περιοχή πολυ(A), PAE και εκφράζονται από διαφορετικό υποκινητή σε διαφορετικά στάδια. Τα δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που εκφράζουν με τον υποκινητή p670 τις όψιμες πρωτεΐνες (L1 & L2) μέσω αλλαγών στα μοτίβα ματίσματος και ακολουθούνται από την όψιμη περιοχή πολυ(A), PAL, χρώζονται με κίτρινο χρώμα. Η ρυθμιστική περιοχή LCR μεγενθύνεται και διακρίνονται το στοιχείο TATAbox του p97, η θέση δέσμευσης της E1, E2 & SPI. (Πηγή: J. Doorbar, 2006)

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι PV εκφράζουν τις πρωτεΐνες τους ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου ξενιστή (κερατινοκύτταρα) στο οποίο βρίσκονται, αν και οι πλήρεις μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό δεν είναι ακόμη γνωστοί. Η πορεία διαφοροποίησης αρχίζει από την βασική μεμβράνη

των κερατινοκυττάρων, που αποτελεί την αρχική θέση μόλυνσης και συνεχίζει προς τις εξωτερικές στοιβάδες των κερατινοκυττάρων. Στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης, εκφράζονται οι 6 πρώιμες πρωτεΐνες (E) και αργότερα οι 2 όψιμες (L).

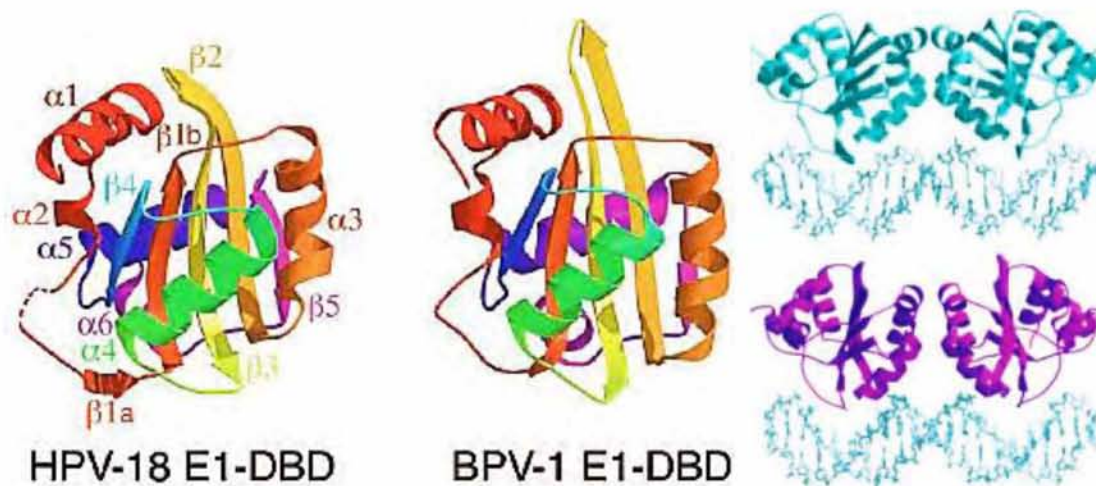
1.2.2. Οι πρώιμες (E) πρωτεΐνες των PV

Η περιοχή των πρώιμων πρωτεϊνών, αποτελεί περίπου το 50% του γονιδιώματος των PV και περιέχει 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (E1, E2, E4, E5, E6 & E7), που κωδικοποιούν δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2), τρεις ογκοπρωτεΐνες (E5, E6, E7) και την E4 που συμβάλλει κυρίως στην παραγωγή νέων ισωματιών.

Η σημασία των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης E1 και E2 για την αντιγραφή των PV, είχεδειχθεί αρχικά στον BPV-1 σε κύτταρα C127 (*Ustav et al, 1991*) και αργότερα, σε HPV για τους οποίους η έκφραση E1 και E2 σε trans μορφή από διαφορετικά πλασμίδια, ήταν επουσιώδης για την αντιγραφή τους (*del Vecchio et al, 1992*). Για τον HPV 16 όμως, ειδικά, έχει πρόσφαταδειχθεί, με μεταλλάγματα απώλειας E1, E2 ή και των δύο, ότι ο ιός εξακολουθεί να υποστηρίζει αντιγραφή σε μορφή επισώματος (*D. Pittayakhajonwut et al, 2010*). Για τον ίδιο τύπο, έχει παρατηρηθεί πως η E1 είναι απαραίτητη για την εγκαθίδρυση της αντιγραφής στην έναρξη κάθε σταδίου διαφοροποίησης και πως μετά δεν είναι απαραίτητη η παρουσία της για την συνέχιση της αντιγραφής σε μορφή επισώματος (*Egawa et al, 2012*).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ~70-80 kD (~650 aa). Ο ρόλος της ενέχεται στην έναρξη της αντιγραφής του ιού, φέρει μια επικράτεια δέσμευσης στο DNA και μια ελικάσης/ΑΤΡάσης. Η E1 δεσμεύεται στο DNA ως διμερές. Ο διμερισμός συμβαίνει μέσω αλληλεπίδρασης υδρόφοβων αμινοξέων στην α -έλικα των μονομερών. Για την δέσμευση στην θέση έναρξης αντιγραφής του ιού, εντός της περιοχής LCR (Εικόνα 1.9), το διμερές E1 απαιτεί το διμερές E2. Η επικράτεια δέσμευσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) είναι ειδική για την αλληλουχία (Εικόνα 1.10), όμως η υπόλοιπη πρωτεΐνη είναι μη ειδική και επομένως απαιτείται η αλληλεπίδραση με το διμερές E2 για την αποφυγή της μη ειδικής πρόσδεσης. Έπειτα από την αρχική αλληλεπίδραση των διμερών E1 και E2, οι E2 στρατολογούν περισσότερα μονομερή της E1 σε μορφή ομοτετραμερούς. Τελικά, σχηματίζονται δύο εξαμερείς E1 ελικάσες που ξεδιπλώνουν το DNA καταναλώνοντας ATP (*Auster et al, 2004*). Επιπλέον, η E1 αλληλεπιδρά και με

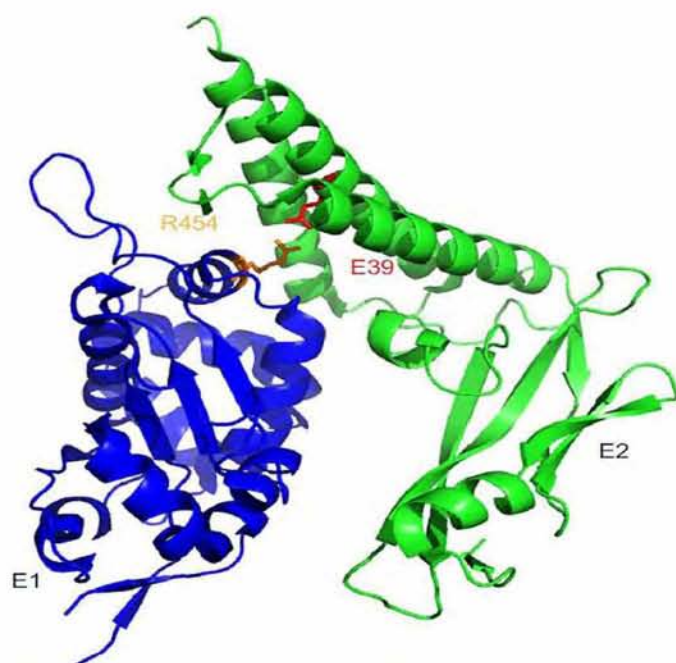
κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως τη μεγάλη υπομονάδα DNA πολυμεράσης α , μοριακές συνοδούς και πρωτεΐνες hSNF5 του συμπλόκου SWI/SNF, το οποίο ενέχεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Lee et al, 1999).



Εικόνα 1.10: Αριστερά: Διαγράμματα μορφής κορδέλας (ribbon structure), των 3D κρυσταλλικών δομών των επικρατειών πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) των ιών HPV-18 (αριστερά) και BPV-1 (δεξιά). Ο χρωματισμός αρχίζει με κόκκινο στο N-τελικό άκρο και ολοκληρώνεται με ιώδες στο C-τελικό άκρο. Δεξιά: Δύο μονομερή DBD από τον HPV-18 και BDV-1, προσομοιάζουν την πρόσδεση των διμερών E1 στο DNA, έπειτα από υπολογισμό ελαχιστοποίησης ενέργειας με το AMBER 7 (Case et al, 2002). (Πηγή: Auster et al, 2004).

Οι φωσφοπρωτεΐνες E2 (κατάλοιπα φωσφοσερίνης και φωσφοθρεονίνης) είναι οι κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από όλους τους ιούς θηλωμάτων. Ενέχονται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην κατάτμηση του ιικού γονιδιώματος, σε μετα-μεταγραφικές διαδικασίες και πιθανά στην τελική συγκρότηση του ιού. Στο κύτταρο ξενιστή υφίσταται ενεργοποιητικές ακετυλιώσεις (K11 & 112) και σταθεροποιητικές σουμοϋλιώσεις (K292). Η πλήρης πρωτεΐνη σχετικού μοριακού βάρους ~45 kD, διακρίνεται σε τρεις περιοχές. Συγκεκριμένα, αποτελείται από μια N-τελική επικράτεια ενεργοποίησης, 200 αμινοξέων περίπου (3 αντιπαράλληλες α -έλικες), η οποία συνδέεται με την C-τελική επικράτεια δέσμευσης στο DNA (β -βαρέλι 8 κλώνων και δύο αντιπαράλληλες α -έλικες προσδένονται στο DNA) με μια περιοχή εύκαμπτου «αρμού» πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης (Antson et al, 2000). Όλοι οι ιοί θηλωμάτων έχουν την δυνατότητα να κωδικοποιήσουν μικρότερου μήκους ισομορφές της E2, που περιλαμβάνουν την C-τελική επικράτεια, τον αρμό και ένα πεπτίδιο 10-13 καταλοίπων από την ανοδική περιοχή. Το ανοδικό πεπτίδιο προέρχεται από

εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης της E1 (το E8), το οποίο προστίθεται με μάτισμα στο υπόλοιπο τμήμα της ισομορφής E2 (ονομασίες όπως E8^E2 ή E8^E2C κλπ). Αυτές οι ισομορφές της E2 λειτουργούν ως καταστολείς της ιικής αντιγραφής και μεταγραφής, είτε δρώντας ανταγωνιστικά προς τις E2 στις θέσεις δέσμησης, είτε στρατολογώντας κυτταρικούς παράγοντες που καταστέλλουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Οι E2 προσδένονται σε ειδικά μοτίβα παλίνδρομων αλληλουχιών ~12 bp (ACCGN4CGGT ή ACCN6GGT), στην LCR, μαζί με κυτταρικούς παράγοντες όπως την SP1 και στρατολογούν τις ικές ελικάσες E1 (Εικόνα 1.8). Η σταθερότητα και η δραστικότητα της E2 στην αντιγραφή και μεταγραφή, ενισχύεται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τις E1, μέσω της επικράτειας ενεργοποίησης του N-τελικού άκρου, όπως διακρίνεται και στην Εικόνα 1.11 (King et al, 2011).



Εικόνα 1.11: Δομή του συμπλόκου E1-E2. Η δομή της επικράτειας ενεργοποίησης της E2 του HPV18, επιλέχθηκε στο PyMOL (αμινοξικά κατάλοιπα 428 - 631). Το κατάλοιπο E39 της E2 δημιουργεί μια γέφυρα άλατος με το υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο R454 στην E1. (Πηγή: A. McBride, 2013)

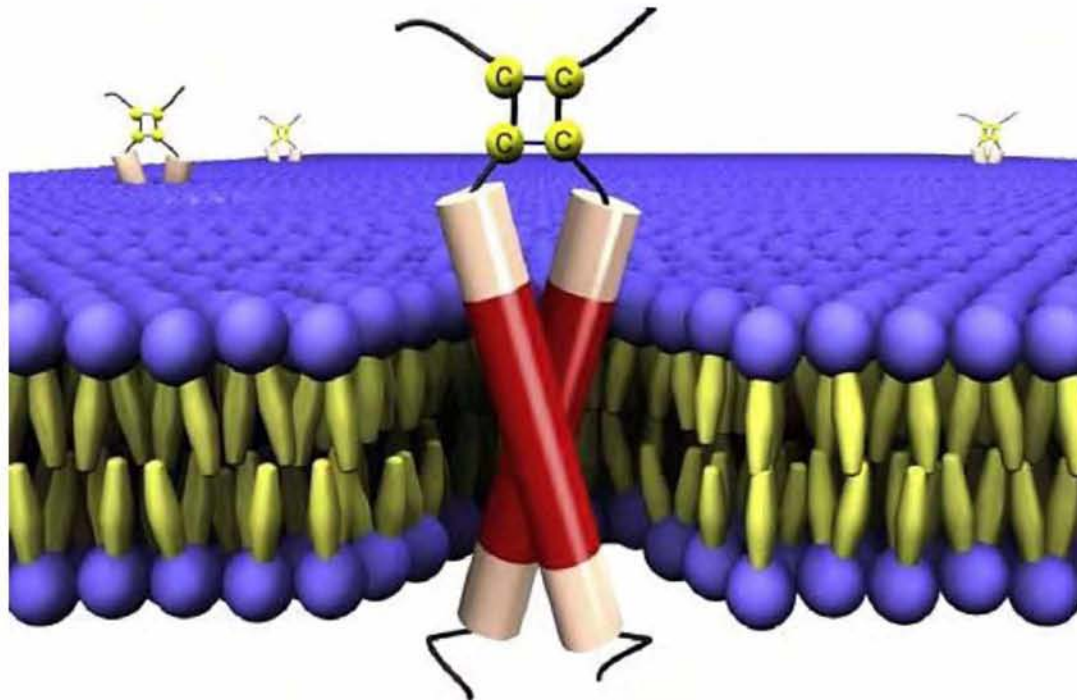
Υπάρχουν επιπλέον ενδείξεις ότι οι E2 υποβοηθούν την συναρμολόγηση των νέων ιών, π.χ. μέσω αλληλεπίδρασης με την L2, και ενέχονται στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία του RNA, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Επίσης, σε διαγονιδιακούς μύες, έκφραση της E2 του HPV8 οδήγησε στην ανάπτυξη όγκων του δέρματος, υποδεικνύοντας κάποια συσχέτιση του E2 με ογκογένεση. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση της E2 σε HPV + και - κύτταρα, οδήγησε σε αναστολή ανάπτυξης. Δεσμεύοντας τον πρώιμο υποκινητή του ιού, η E2 καταστέλλει την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 & E7, οι οποίες είναι σημαντικές σε πολλά HPV + καρκινικά κύτταρα για την επιβίωσή τους. Για τα HPV - κύτταρα

πιστεύεται πως οι μηχανισμοί που οδηγούν σε απόπτωση περιλαμβάνουν μονοπάτια εξαρτώμενα και μη από την p53 καθώς και την αλληλεπίδραση της E2 με την κασπάση 8 (McBride, 2013). Η E2 αλληλεπιδρά με ποικίλες ακόμη πρωτεΐνες που σχετίζονται με απόπτωση, ουβικιτινίωση, κυτταρικό κύκλο, πρωτεϊνική μεταφορά, επεξεργασία mRNA, μεταγραφή κλπ. Αποτελεί σαφώς τον κύριο και απαραίτητο ρυθμιστή του ιικού γονιδιώματος των PV (Thierry, 2009).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E4 εμπεριέχεται εντός του E2 στην περιοχή που κωδικοποιείται ο εύκαμπτος αρμός. Το κύριο προϊόν του E4 είναι το μετάγραφο E1^{E4}, που προέρχεται από μάτισμα της περιοχής του E1 (περιέχει το κωδικόνιο έναρξης του E1) και του E4, όμως παράγονται και άλλα ελάσσονα μετάγραφα. Η πρωτεΐνη E4 μοριακού βάρους ~17 kD του μείζονος μεταγράφου αποτελεί έως και το 30% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης σε ιστούς θηλωμάτων και έχει προταθεί ως κατάλληλος βιοδείκτης. Η E4 σε αντίθεση με τις E1 & E2 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταροδιάλυμα και όχι στον πυρήνα του ξενιστή. Η έκφραση της E4 παρατηρείται σε ενδιάμεσες και ανώτερες στοιβάδες διαφοροποίησης, αν και αρχικά συμπεριλήφθηκε στα πρώιμα «γονίδια», λόγω της θέσης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης στο ιικό γονιδίωμα. Κατά την πορεία της διαφοροποίησης, η έκφραση της E4 αυξάνει και υφίσταται ποικίλες τροποποιήσεις από κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως διάφορες φωσφορυλιώσεις σε μεσαία επίπεδα από την MAPK (φάση S), από την CDK (CyclinB/Cdk, CyclinA/cdk στην φάση G2) σε μεσαία προς ανώτερα επίπεδα και πρωτεολύεται στα ανώτατα επίπεδα από την calpain, ακολουθώντας έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Η ακριβής λειτουργία της E4 δεν έχει αποσαφηνιστεί έως σήμερα. Ένας από τους ρόλους που προτάθηκαν είναι ρύθμιση της αντιγραφής του ιού. Επιπλέον, αλληλεπιδρά και αναδιοργανώνει τα ινίδια κερατίνης, υποβοηθώντας την έξοδο των νέων ιοσωματίων. Η διασταύρωση με ενδογενείς μεταγλουταμινάσες καθιστά «εύθραυστη» τη μεμβράνη, καθιστώντας πιο εύκολη την διαρραγή της φολλίδας των κερατινοκυττάρων και τη μεταφορά των ιοσωματίων σε άλλους ξενιστές. Έχει αναφερθεί πως η E4 αναστέλλει την Cdk1, και τις ελικάσες MCM, καθυστερώντας την αντιγραφή του κυτταρικού DNA και ευνοώντας την αντιγραφή του ιικού έναντι του κυτταρικού γονιδιώματος. Ακόμη, απώλεια E4 οδηγεί σε αναστολή της αντιγραφής και της σύνθεσης των πρωτεϊνών του καψιδίου. Τελικά, ο ρόλος της ενέχεται, σύμφωνα με τις έως τώρα ενδείξεις, κυρίως στην καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου (φάση G2), στην προώθηση της αντιγραφής του ιού έναντι

του ξενιστή, στην ενίσχυση της σύνθεσης καψιδιακών πρωτεϊνών του ιού και στην τελική έξοδο των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων και τη μόλυνση άλλων ξενιστών (*J. Doorbar, 2013*).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E5 εδράζεται στο 3' άκρο της περιοχής των πρώιμων γονιδίων και εκφράζει mRNA που ξεκινάει από μια ανοδική περιοχή του E2 και συνεχίζει στο E5. Οι περισσότεροι, αν και όχι όλοι οι PV, εκφράζουν πρωτεΐνες E5. Οι E5 είναι κοντές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II (το C-τελικό άκρο στραμμένο αντίθετα από το κυτταροδιάλυμα), 40-85 aa, πλούσιες σε υδρόφοβα αμινοξέα, συγκεντρωμένα σε μία ή περισσότερες επικράτειες. Απουσιάζει πλήρως η κυτταροπλασματική επικράτεια, ενώ η διαμεμβρανική σταθεροποιείται με ελάττωση ενέργειας μέσω δεσμών υδρογόνου σχηματίζοντας α-έλικα με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων στραμμένες στην εξωτερική πλευρά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ενώ πολύ σημαντικά αμινοξέα για την βιολογική λειτουργία των E5 είναι η γλουταμίνη 17, το ασπαρτικό/γλουταμινικό οξύ 33 και οι κυστεΐνες 37 και 39 (Εικόνα 1.12). Η E5 σχηματίζει διμερή στη μεμβράνη του ΕΔ ή του Golgi, με το C-τελικό άκρο στραμμένο στον αυλό του ΕΔ ή του Golgi (*DiMaio et al, 2013*).



Εικόνα 1.12: Η πρωτεΐνη E5 του BPV1. Σχηματική αναπαράσταση των διμερών E5, εντός της κυτταρικής μεμβράνης με το καρβοξυτελικό άκρο στην κορυφή (*Πηγή: Windisch et al., 2010*).

Η Ε5 πρωτεΐνη έχει την δυνατότητα εξαλλαγής των κυττάρων, απώλειας αναστολής εξ επαφής και εμφάνισης ογκογονικότητας, αν και έχει παρατηρηθεί πως η ογκογονικότητα της Ε5 των HPV είναι πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη του ΒΡV-1, στον οποίο αποτελεί μια από τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού, ενώ στους ανθρώπινους ιούς θηλωμάτων δρα συνεπικουρικά με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες Ε6 και Ε7. Μελέτες της Ε5 του ΒΡV-1, *in vivo* και *in vitro*, έδειξαν πως η Ε5 μπορεί να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει τον διμερή υποδοχέα τυροσινικής κινάσης PDGF-β, ο οποίος αυτοφωσφορυλιώνεται πλέον, απουσία του φυσικού του προσδέτη. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του μονοπατιού PDGF-β είναι η επαγωγή της μίτωσης και με αυτόν τον μηχανισμό η Ε5 μπορεί να επάγει ογκογένεση. Στους HPV, οι Ε5 εμφανίζουν παρόμοια δράση, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα EGF, ώστε να ενισχύσουν την σύνθεση του DNA, να προάγουν τη μίτωση και να επιτρέψουν ανάπτυξη των μολυσμένων κυττάρων σε χαμηλή συγκέντρωση ορού, αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης δεν είναι ακόμη γνωστός. Ακόμη, οι Ε5 ελαττώνουν την έκφραση των αναστολέων κυτταρικού κύκλου p21 και p27 σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Έχουν δειχθεί ποικίλες άλλες αλληλεπιδράσεις με κυτταρικά μονοπάτια, όπως της COX-2 – PGE2 (επαγωγή αγγειογένεσης και αναστολή απόπτωσης), με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση της ογκογονικότητας του ιού (Kim *et al*, 2010). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως ένα μικρότερο ποσοστό της Ε5 στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική σύντηξη και να σχηματίσει πολυπλοειδές συγκύτιο με πολλούς πυρήνες. Εναλλακτικά, μπορεί να αυξήσει ενδοκυτταρικά τον αριθμό αντιγράφων του ξενιστή. Και με τους δύο τρόπους, ο σχηματισμός πολυπλοειδών κυττάρων οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια, αυξάνοντας την πιθανότητα κυτταρικού μετασχηματισμού και δημιουργίας νεοπλασίας (DiMaio *et al*, 2013). Τέλος, έχει παρατηρηθεί σε HPV και στον ΒΡV-1, πως οι Ε5 ελαττώνουν τα MHC-I της επιφάνειας των ξενιστικών κυττάρων, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, όπως απευθείας μείωση της έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφής, καθώς και αναστολή της ενδοκυτταρικής τους μεταφοράς. Το άμεσο αποτέλεσμα της ελάττωσης των MHC-I, είναι η προστασία του ιού από ανοσοκύτταρα, όπως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, που αναγνωρίζουν τα μολυσμένα κύτταρα μέσω των ξένων πεπτιδίων που παρουσιάζουν τα MHC-I και τα φονεύουν. Είναι ένας μηχανισμός προστασίας από το ανοσοποιητικό σύστημα που έχει δημιουργηθεί και σε πολλούς άλλους ιούς, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα (A. Venuti *et al*, 2010). Η Ε5, η τρίτη ογκοπρωτεΐνη των PV, τελικά θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αναστέλλοντάς τον στα πρώιμα στάδια. Ενθαρρυντικές, επί παραδείγματι, είναι κάποιες μελέτες που έδειξαν αναστολή των καρκινικών κυττάρων σε πειραματόζωα, έπειτα από εμβολιασμό με πεπτιδία της E5 ενισχυμένα με νησίδες CpG (Ganguly, 2012).

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης E6 και E7 εδράζονται στην περιοχή μεταξύ της LCR και των υπόλοιπων πρώιμων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν, οι E6 (~160 aa) και E7 (~100 aa), είναι πολυσήμαντες στον μετασχηματισμό του κυττάρου-ξενιστή, λόγω της παρεμβολής τους στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση. Οι πρώτες ενδείξεις για τον ρόλο τους στην καρκινογένεση προήλθαν από μελέτες καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, όπως SiHa & CaSki, στα οποία είχαν βρεθεί τυχαία ενσωματωμένα στο γονιδίωμα. Αποσιώπηση και των δύο σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας οδηγεί σε ταχεία ελάττωση του κυτταρικού πληθυσμού λόγω απόπτωσης. Η άμυνα του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα επιτελείται σε μεγάλο βαθμό από τις E6 & E7, με μηχανισμούς, όπως την ελάττωση μέσω E6 της έκφρασης των ιντερφερονών IFN α και β , την ελάττωση μέσω E7 της έκφρασης της TAP1 η οποία ενέχεται στον σχηματισμό και ενδοκυτταρική μεταφορά του συμπλόκου MHC-1 – πεπτιδίου στην επιφάνεια, την ελάττωση μέσω και των δύο, της έκφρασης των υποδοχέων TLR9 που αναγνωρίζουν ξένο δίκλωνο DNA και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και ελάττωση της έκφρασης σημαντικών κυτταροκινών (TNF α , IL8, IL10) που επίσης ενεργοποιούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Ghittoni *et al*, 2010). Οι E6 και E7 αποτελούν τις κύριες ογκοπρωτεΐνες των HPV ακολουθούμενες από την E5. Αμφότερες οι πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν πολύ σύντομα χρωμοσωμική αστάθεια, μέσω δημιουργίας πολυπλοειδίας, κάτι που αυξάνει τις πιθανότητες ογκογένεσης (Korzeniewski *et al*, 2011). Αυτό πραγματοποιείται μέσω απορρύθμισης της Plk1, λόγω απώλειας της p53 από την E6 και των μελών Rb από την E7. Επιπρόσθετα, αμφότερες οι πρωτεΐνες απορρυθμίζουν τα κυτταρικά γονίδια που ελέγχουν τη μετάβαση των φάσεων G2/M (Narisawa-Saito *et al*, 2007).

Η E6 είναι μια μικρή βασική πρωτεΐνη με χαρακτηριστικό της την ύπαρξη δύο ασυνήθιστων δακτύλων ψευδαργύρου με μοτίβα Cys-X-X-Cys. Κύρια λειτουργία της είναι να επάγει την αποικοδόμηση σε πρωτεάσωμα της σημαντικής ογκοκατασταλτικής κυτταρικής πρωτεΐνης p53, μέσω αλληλεπίδρασης με μια

κυτταρική E3 λιγάση ουβικιτίνης (E6 associated protein, E6AP). Ορισμένοι καθοδικοί στόχοι της p53, ενέχονται στην απόπτωση λόγω καταστροφής DNA, στην διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (π.χ. Notch-1) κοκ (*McLaughlin-Drubin et al, 2012*). Επιπλέον, η E6 παρεμβάλλεται στην λειτουργία άλλων προαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bak, FADD και η προκασπάση 8, ώστε τελικά να γίνει αναστολή της απόπτωσης. Το ένζυμο απαμινάση της αδενοσίνης ADA3 που δρα ως συνενεργοποιητής της p53, καταστέλλεται επίσης από την E6 (*Ganguly et al, 2009*). Ένας ακόμη στόχος της E6 είναι κι η κυτταρική τελομεράση, η οποία φυσιολογικά εκφράζεται σε κύτταρα της γαμετικής σειράς, στους ποικίλους τύπους ενήλικων βλαστοκυττάρων, καθώς και σε ορισμένα κύτταρα τραυματισμένων περιοχών. Στην παθολογία, εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα σε ποσοστό άνω του 85% στον άνθρωπο, στα οποία συμβάλλει στην «αθανατοποίησή» τους. Η επαγωγή της αυξορρυθμίστης της μεταγραφής της τελομεράσης πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης E6 και Myc στον υποκινητή της. Στόχοι της E6 είναι και ορισμένα μέλη της οικογένειας μεμβρανοσχετιζόμενων γουανυλικών κυκλασών (MAGUK), που φέρουν επικράτεια PDZ κι οι οποίες ρυθμίζουν την σύνδεση των κυττάρων και την κυτταρική πόλωση. Επίσης, η E6 αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες με επικράτεια PDZ (μοτίβο X-S/T-X-V/L/I), οι οποίες ενέχονται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως κυτταρική σηματοδότηση (GPCR, όπως β1-αδρενεργικός υποδοχέας) (*Hebner et al, 2006*). Αποτέλεσμα της αναστολής των PDZ πρωτεϊνών, μέσω αποικοδόμησης, είναι η απώλεια κυτταρικής αλληλεπίδρασης και πόλωσης, κάτι που έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (*Yugawa et al, 2009*). Ένας ακόμη στόχος της E6 είναι κι η tuberin, προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TSC2, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση επιβίωσης του κυττάρου μέσω mTOR. Τέλος, η E6 οδηγεί στην επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών, όπως η ελικάση MCM7 και η κυκλίνη E που ενέχονται στον κυτταρικό κύκλο (*Narisawa-Saito et al, 2007*).

Η E7 είναι μια μικρή πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που διακρίνεται σε τρεις συντηρημένες περιοχές CR 1,2 & 3. Η κύρια λειτουργία της είναι να δεσμεύεται και να αδρανοποιεί το pRb, προϊόν σημαντικού ογκοκατασταλτικού γονιδίου, μέσω μοτίβου LXCXE (X, οποιοδήποτε αμινοξύ) της περιοχής CR2. Στην υποφωσφορυλιωμένη τους μορφή, οι Rb πρωτεΐνες δεσμεύονται σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως τα μέλη της οικογένειας E2F και καταστέλλουν τη μεταγραφή

γονιδίων που ενέχονται στην σύνθεση DNA και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η E7 δεσμεύεται σε υποφωσφορυλιωμένες Rb, επομένως πιθανά οδηγεί τα κύτταρα στην φάση S, μέσω αποσυναρμολόγησης των συμπλόκων pRb-E2F. Η E7 ακόμη, στοχεύει ποικίλες άλλες πρωτεΐνες όπως τις απακετυλάσες ιστονών (HDAC), οι οποίες καταστέλλουν τη μεταγραφή, με τελικό στόχο την ανάπτυξη του κυττάρου. Η E7 αλληλεπιδρά και με την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση CDK2/κυκλίνη A και CDK2/κυκλίνη E, οι οποίες οδηγούν στην φωσφορυλίωση των pRb. Ακόμη, δεσμεύεται στον αναστολέα των CDK (CKI) και την p27, καταστέλλοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η p600 η οποία ενεργοποιεί την απόπτωση σε περίπτωση απώλειας σύνδεσης των κυττάρων (αποκόλληση), αποτελεί επίσης στόχο της E7, επιτρέποντας την κυτταρική ανάπτυξη. Παρά την πλειοτροπική δράση της E7, έχει παρατηρηθεί σε μεταλλάγματα pRb (αδυναμία πρόσδεσης στην E7), ότι οι περισσότερες λειτουργίες της E7 σχετίζονται άμεσα με την απενεργοποίηση των pRb (Ganguly et al, 2009).

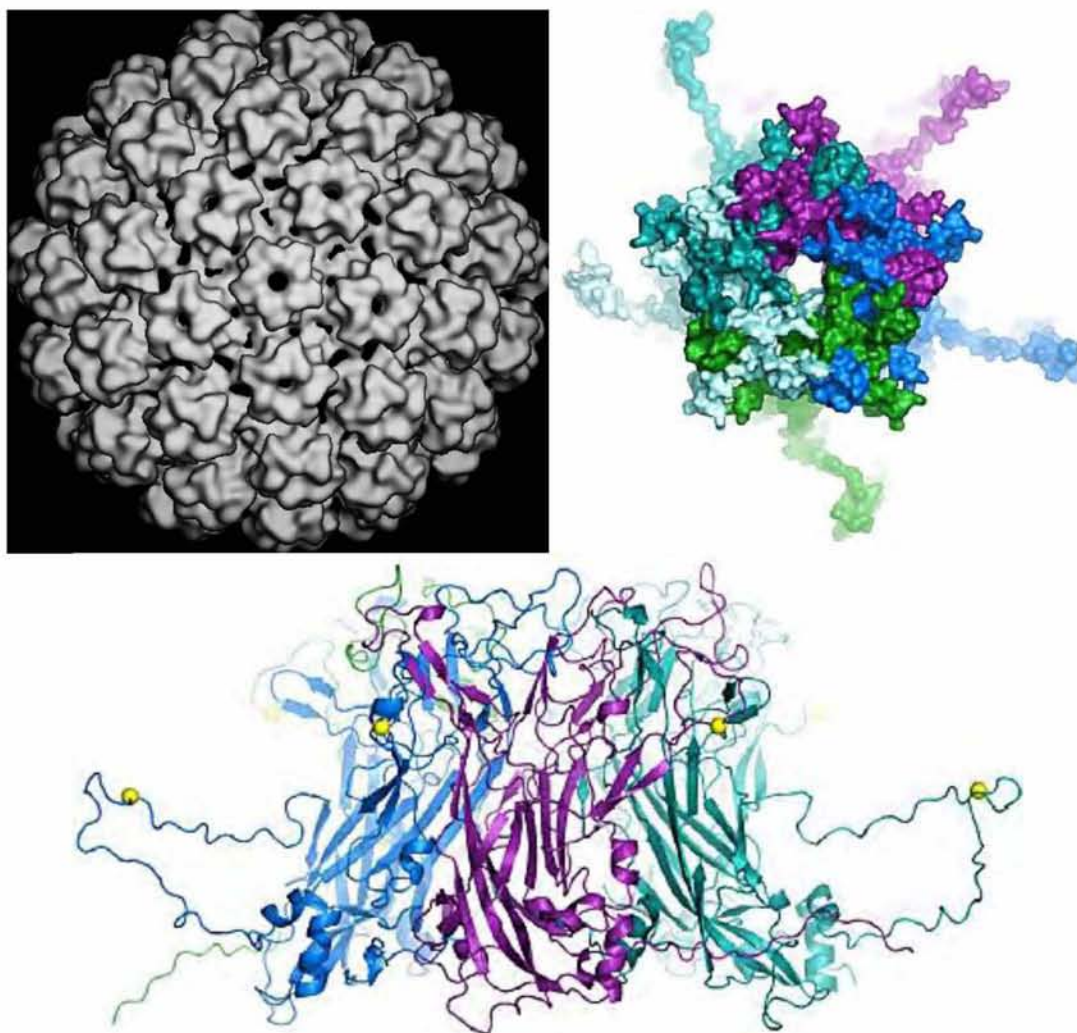
Αρχικά, είχαν εντοπιστεί άλλα δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, οι E3 & E8 στην περιοχή των πρώιμων πρωτεϊνών, όμως μόνο το E8 (εντός του E1), έχει αποδειχθεί πως κωδικοποιεί πρωτεΐνη σε BPV-1 & HPVs, τη ματισμένη πρωτεΐνη σύντηξης E8^{E2C}, η οποία αποτελεί στους δύο τύπους αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής και της αναπαραγωγής του ιού. Σε ορισμένους, όμως, PV λαγόμορφων, η E8 έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο (Zheng et al, 2006).

1.2.3. Οι όψιμες (L) πρωτεΐνες των PV

Οι όψιμες πρωτεΐνες L1 & L2 κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που βρίσκονται ανάμεσα στην περιοχή των πρώιμων πρωτεϊνών και της ρυθμιστικής περιοχής LCR και καλύπτουν περίπου το 40% του συνόλου του ιικού γονιδιώματος (Εικόνα 1.8).

Η L1 είναι η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη, μοριακού βάρους ~55 kD, η οποία σχηματίζει εξολοκλήρου την εξωτερική επιφάνεια των PVs και αποτελεί σημαντικό καρκινικό βιοδείκτη του τραχήλου της μήτρας (van Bogaert, 2014). Η μεταγραφή του mRNA του αρχίζει από την κοινή ανοδική ρυθμιστική περιοχή (URR), ανοδικά των E. Μέσω ματίσματος, αφαιρούνται όλα τα E και η πρώιμη θέση πολυαδενυλίωσης και ενώνεται με την πλήρη περιοχή του L1. Το N-τελικό άκρο της L1, φέρει συνήθως

το συντηρημένο μοτίβο MxxWx7YLPP. Η L1 σχηματίζει, μέσω δισουλφιδικών δεσμών (συντηρημένες Cys175 & Cys428) και αλληλεπιδράσεων, ομοπενταμερή τα οποία αποτελούν τα καψομερίδια του εξωτερικού περιβλήματος του ιού. Σποραδικά, σχηματίζονται VLPs (virus-like particles) των PVs. Συνολικά 72 καψομερίδια σχηματίζουν το πλήρες καψίδιο του ιού (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13: Αριστερά: Ανασύσταση δομής από κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία ιωσματοίου του HPV16, με διακριτική ικανότητα 18 Å. Δεξιά: Δομή του πενταμερούς καψομεριδίου της L1 του BPV1 στο πρόγραμμα PyMOL. Το κάθε μονομερές L1 διακρίνεται με διαφορετικό χρώμα. Η απεικόνιση έγινε σε χωροπληρωτικό μοντέλο. Κάτω: Απεικονίζεται πλευρικά το πενταμερές της άνω δεξιάς εικόνας σε μοντέλο δευτεροταγούς δομής – κορδέλας (ribbon structure), όπου είναι εμφανής ο πυρήνας από μονομερή 8 β-κλώνων, β-jellyroll δομών (Πηγή: Buck et al., 2012).

Ορισμένα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα του αυλού των πενταμερών L1 αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες L2, οι οποίες αν και βρίσκονται εσωτερικά του καψιδίου, εξέρχονται επικράτειές τους κατά την είσοδο του ιού στον ξενιστή. Η

αρχική πρόσδεση του ιού στηρίζεται κυρίως στην αλληλεπίδραση των L1 με τα σάκχαρα των πρωτεογλυκάνων των κερατινοκυττάρων. Απουσία των σακχάρων (HS, heparin sulfate), ο ιός αδυνατεί να προσδεθεί στις πρωτεογλυκάνες (θεραπευτικός στόχος στην αναστολή της μόλυνσης). Η ίδια η πρόσδεση του ιού προκαλεί μεταβολές στην στερεοδιαμόρφωση των συμπλόκων L1-L2, με αποτέλεσμα τμήμα του N-τελικού άκρου των L2 να προεκβάλλουν από τα πενταμερή L1 και να αποκόπτονται από την κυτταρική φουρίνη (μοτίβα R-X-K/R-R). Η αποκοπή του N-τελικού άκρου της L2 μεταβάλλει περαιτέρω την στερεοδιαμόρφωση, ελαττώνοντας την συγγένεια του ιού με τις πρωτεογλυκάνες, αλλά επιτρέποντάς του πρόσδεση σε δεύτερο υποδοχέα, όπως η ιντεγκρίνη αββ4, ο CD151, η αννεξίνη A2 και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Παρόλα αυτά οι ακριβείς μηχανισμοί της μακροπινοκυττάρωσης δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Η αποδέσμευση του ιικού γονιδιώματος από τα όψιμα ενδοσώματα (χαμηλού pH), δεν είναι σαφές αν σχετίζεται με άμεση επίδραση του όξινου pH στις L1, ή αν ρυθμίζεται έμμεσα από κυτταρικούς παράγοντες. Η L2 φαίνεται πως είναι επίσης σημαντική στην απελευθέρωση και στη μεταφορά του ιικού γενώματος στο trans-Golgi και στον πυρήνα, καθώς απουσία της, ο ιός παραμένει στα όψιμα ενδοσώματα. Η αποδέσμευση πάντως των L1 από το σύμπλοκο γονιδιώματος-L2, φαίνεται πως επιτελείται από την δράση κυτταρικών πρωτεϊνών κυκλοφυλλίνης και την αλληλεπίδραση της L2 με νεξίνες (SNX17). Οι πρωτεΐνες L1 φέρουν ποικίλες ακόμη συντηρημένες περιοχές, η λειτουργία όμως των οποίων παραμένει άγνωστη (Buck et al, 2013).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L2 κωδικοποιεί την ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού, η οποία ενέχεται στην συγκρότηση του ιού, καθώς και στην διαδικασία μόλυνσης. Η L2 έχει μήκος κάτω των 500 aa και μοριακό βάρος περίπου 55 kD. Στον σχηματισμό του καψιδίου, ενέχονται 72 πενταμερή της L1 (360 σύνολο) στην εξωτερική επιφάνεια και υπολογίζεται, ότι εσωτερικά μπορεί να φιλοξενηθούν έως και 72 L2, δηλαδή μία L2 για κάθε πενταμερές L1. Η L2 αλληλεπιδρά με τις L1 μέσω του C-τελικού άκρου της με μοτίβα PxxP. Στο N-τελικό άκρο φέρουν υψηλά συντηρημένες κυστεΐνες (C22 & C28) που σχηματίζουν ενδομοριακή φουρκέτα με δισουλφιδικό δεσμό και πιθανά αυτό συμβάλλει στην σταθεροποίηση του συναρμολογούμενου καψιδίου. Μαζί με την L1 αλληλεπιδρά μη ειδικά με το DNA μέσω θετικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων (C-τελικό άκρο της L1 και αμφότερα τα άκρα της L2), με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των

συναρμολογούμενων ιών. Όσον αφορά την διαδικασία της εισόδου του ιού στον ξενιστή, ενέχονται αμφότερες οι L1 & L2, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Κατά την πρόσδεση του ιού, μέσω L1, προεκβάλλουν περίπου τα 120 πρώτα αμινοξέα του N-τελικού άκρου μέσω του πενταμερούς των L1. Το μεγαλύτερο τμήμα της L2 παραμένει πάντα στο εσωτερικό του καψιδίου στο ιοσωμάτιο. Η αποκοπή τμήματος L2 από την φουρίνη φαίνεται πως είναι κρίσιμη για την είσοδο, απαραίτητη για την μετάβαση του ιού στο trans-Golgi και λαμβάνει χώρα σε όλους τους PV. Για τη μεταφορά, κρίσιμη είναι κι η αλληλεπίδραση των αμινοξέων 41-45 της L2 με την πρωτεΐνη συνταξίνη 18 του tSNARE που εδράζεται στο ΕΔ, ενώ μεταλλάγματα των L2 41-45 του BPV-1 εξουδετέρωσαν τη μολυσματικότητα του ιού. Για την απελευθέρωση του γενώματος του ιού από τα κυστίδια στον πυρήνα, απαραίτητη είναι μια περιοχή της L2 με 23 aa (υδρόφοβα και βασικά) στο C-τελικό της άκρο, καθώς απουσία της το σύμπλοκο vDNA-L2 παραμένει στα όψιμα ενδοσώματα. Με τον ίδιο τρόπο, ανακαλύφθηκε και η σημασία της περιοχής αμινοξέων 45-67 του N-τελικού της άκρου με μοτίβα GxxxG, που σχηματίζει μια διαμεμβρανική επικράτεια (α -έλικα) σε λιπόφιλο περιβάλλον. Η κυτταρική γ -εκκριτάση (GS) φαίνεται πως αποκόπτει τμήμα αυτής της περιοχής και αυτή η αποκοπή, όπως και της φουρίνης, είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της μεταφοράς του ιού στον πυρήνα. Για την κίνηση του συμπλόκου προς τον πυρήνα, πιστεύεται πως επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω αλληλεπίδρασης της L2 (μέσω C-τελικού άκρου) με την κινητήρια πρωτεΐνη δυνείνη, η οποία αλληλεπιδρά με το δίκτυο μικροσωληνίσκων β -ακτίνης στον κυτταροσκελετό. Η είσοδος στον πυρήνα αρχικά πιστευόταν πως γίνεται μέσω πυρηνικών πόρων, όμως το πρώτο σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) της L2 αποκόπτεται από την φουρίνη, ενώ το δεύτερο βρίσκεται σε σύμπλοκο με το ιικό DNA. Πρόσφατα, αποδείχθηκε πως η είσοδος στον πυρήνα προϋποθέτει τη μετάβαση στην φάση της μίτωσης, όπου ο πυρήνας διαρρηγνύεται. Ο ρόλος των NLS της L2, φαίνεται πως είναι σημαντικός μόνο κατά την σύνθεση των όψιμων πρωτεϊνών και την συγκρότηση νέων ιών. Οι νεοσυντιθέμενες L2 εισέρχονται στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με το ιικό γένωμα για την έναρξη της συναρμολόγησης του ιού. Επιπλέον, η L2 ενέχεται και στη ρύθμιση της μεταγραφής προς όφελος του ιού, αλληλεπιδρώντας με ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες (Daxx, PATZ, TBX2,3). Συνοψίζοντας, η L2, εκτός από δομική πρωτεΐνη των PV, ενέχεται σε διαφορετικά στάδια της μόλυνσης, καθώς και στα όψιμα στάδια της ιικής πρωτεϊνοσύνθεσης και της συναρμολόγησης νέων ιοσωματίων (Wang *et al*, 2013).

Τέλος, γίνονται πολλές προσπάθειες δημιουργίας ολοκληρωμένων βάσεων δεδομένων ειδικά για τους HPV σχετικά με το γονιδιώμά τους και το πρωτεώμά τους, για ταχεία άντληση πληροφοριών, ανάλυση αλληλουχιών και ανάπτυξη φαρμάκων. Μια από τις πιο πλήρεις προσπάθειες είναι η hrvPDB, η οποία φιλοξενεί πληροφορίες για περίπου 150 αλληλουχημένους τύπους HPV (743 δομές από πρόβλεψη και 1036 αλληλουχίες πρωτεϊνών). Υπάρχουν εργαλεία για σύγκριση αλληλουχιών με χρήση αλγορίθμων BLAST, για πρόβλεψη δομών, φυλογενετική ανάλυση κοκ. Η ενίσχυση τέτοιων προσπαθειών και η συνεχής ενημέρωσή τους, θα αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο στην περαιτέρω κατανόηση του γονιδιώματος και του πρωτεώματος των HPV, καθώς και στην καλύτερη ανίχνευση και αντιμετώπισή τους (*Kumar et al, 2013*).

1.3. Κύκλος ζωής των PV

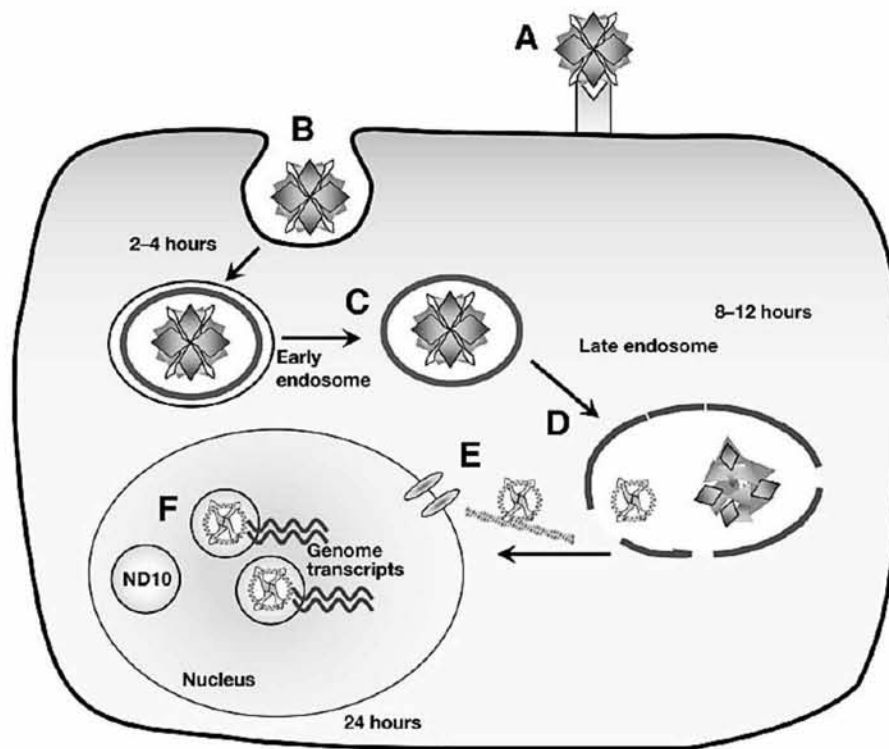
Όλοι οι Papillomaviruses, ανεξαρτήτου τύπου, μολύνουν κερατινοκύτταρα ζωικών οργανισμών. Ο κύκλος ζωής τους μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: 1. Παραγωγή και απελευθέρωση ιοσωματίων. 2. Πρόσδεση ιού στην κυτταρική επιφάνεια, είσοδος και μεταφορά στον πυρήνα. 3. Εγκαθίδρυση ιικού επισώματος (*Buck et al, 2012*).

Η αρχική μόλυνση επιτελείται μόνο στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης και όχι στα ανώτερα στρώματα. Η αρχική πρόσδεση του ιού πραγματοποιείται μέσω αναγνώρισης σακχάρων πρωτεογλυκάνης (heparin sulfate proteoglycans, HSPG) του κυττάρου από την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη L1. Η L2 δεν είναι απαραίτητη για την αρχική πρόσδεση. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, τμήμα της L2 προεκβάλλει λόγω αλλαγής στην στερεοδιαμόρφωση έπειτα από την αναγνώριση της πρωτεογλυκάνης, αποκόπτεται από την φουρίνη και αυτό οδηγεί στην αλληλεπίδραση με δευτερογενείς υποδοχείς του κυττάρου, κάτι που οδηγεί τελικά στην μακροπινοκυττάρωση του ιού. Η έκφραση του ιού στον ξενιστή καθυστερεί σημαντικά από την στιγμή της αρχικής πρόσδεσης (12 ώρες για τον BPV-1). Η είσοδος και η μεταφορά του ιικού γονιδιώματος πραγματοποιείται πολύ αργά, εντός ωρών, σε αντίθεση με άλλους ιούς που εισέρχονται λίγα λεπτά μετά την αρχική πρόσδεση (*Schiller et al., 2010*).

Αν και έχουν γίνει πολλές μελέτες, δεν έχει δημιουργηθεί ένα ολοκληρωμένο και ενιαίο μοντέλο για τη μεταφορά του ιού από την κυτταρική μεμβράνη στον

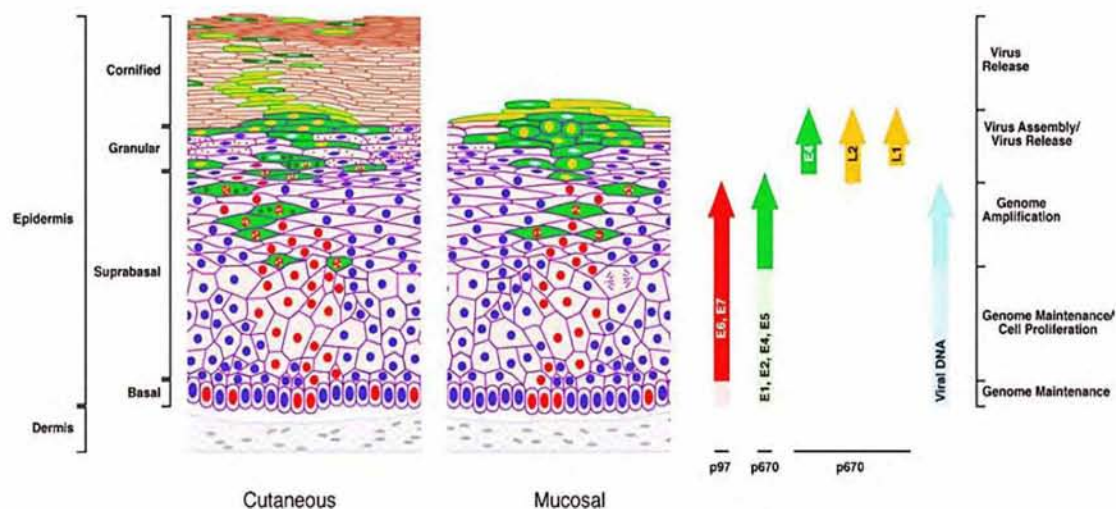
πυρήνα, πιθανά λόγω της υψηλής ποικιλομορφίας του ιού, όπου διαφορετικοί τύποι μπορεί να χρησιμοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταφοράς ή πιθανά λόγω της παρερμηνεύσης των αποτελεσμάτων των πειραμάτων (αναστολή μιας κυτταρικής λειτουργίας επηρεάζει πολλά μονοπάτια). Η μεταφορά στα όψιμα ενδοσώματα επιτελείται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις της L1 με κυτταρικές πρωτεΐνες. Για την αποδέσμευση του συμπλόκου vDNA-L2 από το καψίδιο της L1, απαραίτητη είναι η λειτουργία της L2. Για τη μετακίνηση προς τον πυρήνα, η L2 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (δυνείνες).

Για την είσοδο του ιικού γενώματος στον πυρήνα, απαραίτητη είναι η μετάβαση στη μίτωση (διάρρηξη πυρήνα). Εκεί, το σύμπλοκο vDNA-L2 συνεντοπίζεται με τις πυρηνικές επικράτειες ND10 (πρωτεϊνικοί σχηματισμοί του πυρήνα που ενέχονται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές), όπου η L2 αλληλεπιδρά και αναδιοργανώνει τις ND10 για να ξεκινήσει η μεταγραφή του ιικού γενώματος.



Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων από την πρόσδεση του ιού, έως και την έναρξη της μεταγραφής του. A: Πρόσδεση του ιού στις HSPGs μέσω L1, αποκοπή L2 με φουρίνη και αλληλεπίδραση με δευτερογενείς υποδοχείς. B: Μακροπινοκυττάρωση του ιού. C: Εντοπισμός του ιού στα πρώιμα ενδοσώματα. D: Έξοδος ιικού γενώματος με L2 από το καψίδιο L1 στο ώριμο ενδόσωμα. E: Μετακίνηση συμπλόκου vDNA-L2 προς τον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης L2 με κυτταροσκελετό. F: Είσοδος στον πυρήνα και έναρξη ιικής μεταγραφής στις περιοχές των ND10. (Πηγή: Schiller et al., 2010).

Από την έναρξη της μεταγραφής του ιού, η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών ακολουθεί την πορεία διαφοροποίησης του κυττάρου ξενιστή (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων έκφρασης του ιού συγκριτικά με την πορεία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων από την βασική μεμβράνη της επιδερμίδας έως και την επιφάνεια. Οι πυρήνες των κυττάρων που εκφράζουν βιοδείκτες κυτταρικού κύκλου, ως αποτέλεσμα της έκφρασης E6 & E7, χρώζονται με κόκκινο. Οι πυρήνες των κυττάρων που εκφράζουν τις L1 & L2 στα όψιμα στάδια, χρώζονται με κίτρινο. Τα κύτταρα που περιέχουν πλήρη ιοσωμάτια χρώζονται με πράσινο. (Πηγή: Doorbar, 2006).

Στα πρώτα στάδια μεταγραφής εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα όλες οι πρώιμες πρωτεΐνες του ιού (E) από τον πρώιμο υποκινητή (καθοδικά της LCR), οι E6/7 αρχικά, μαζί με τις E1/2 και αργότερα οι E4/5. Η μετάφραση των πολυκιστρονικών μεταγράφων στις ιικές πρωτεΐνες γίνεται μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Οι πρώιμες πρωτεΐνες λαμβάνουν σήμα πολυαδενυλίωσης από την πρώιμη θέση, ενώ οι όψιμες από την όψιμη θέση πολυαδενυλίωσης. Οι κύριες ογκοπρωτεΐνες των HPV, E6 και E7 ενέχονται στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων, για να υποβοηθηθεί κι η αντιγραφή του ιού. Οι E6 και E7 δρουν, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο, σε πολλούς στόχους (p53, Rb, τελομεράση κοκ), αναστέλλοντας την απόπτωση του κυττάρου και προάγοντας τον κυτταρικό κύκλο (Moody *et al*, 2010). Επιπλέον, η E5 δρα συνεπικουρικά με τις E6 & E7 στην ενίσχυση του ενδοκυτταρικού πολλαπλασιασμού του ιού και στην προστασία του από τα ανοσοκύτταρα. Οι E1 & E2, από τις πρώτες εκφραζόμενες πρωτεΐνες, ενέχονται στην αντιγραφή και στη μεταγραφή του ιού (E1 ελικάση/ΑΤΡάση & E2 κύριος ρυθμιστής των PV), αλληλεπιδρώντας με ποικίλους κυτταρικούς στόχους και είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της ιικής αντιγραφής (DiMaio *et al*, 2006, Hamid *et*

al, 2009). Υπάρχουν τρεις φάσεις αντιγραφής στον κύκλο ζωής του ιού. Αρχικά, ο ιός μετά τη μόλυνση αντιγράφεται σε χαμηλά επίπεδα έως 100 αντίγραφα/κύτταρο. Κατά την διαφοροποίηση, ο ιός σταθεροποιεί τον αριθμό αντιγράφων του στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Στην τρίτη φάση, ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα στις ανώτερες στοιβάδες κι ο ιός αυξάνει τον αριθμό αντιγράφων του σε 1000 περίπου και στην συνέχεια παράγονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες και εξέρχονται οι πλήρεις ιοί. Σε περίπτωση πολλαπλής μόλυνσης του κυττάρου (όπως συμμόλυνση με HPV 16 & 18), υπάρχει αμοιβαία παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιού (ενδοκυτταρικός ανταγωνισμός διαφορετικών τύπων HPV), που επιτελείται εν μέρει από τις ετερόλογες ελικάσες E1 (Mori et al, 2014). Πολλές φορές, ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση (ασυμπτωματική μόλυνση) στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης και ενεργοποιείται έπειτα από κάποιο ερέθισμα (Maglennon et al, 2012). Με την ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή στα περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα, αυξάνονται αρχικά, τα επίπεδα έκφρασης των E1, E2, E4 & E5. Η E4 είναι πολύ σημαντική κυρίως για τα όψιμα στάδια διαφοροποίησης, όπου και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα. Ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου προς όφελος του ιού, στην συγκρότηση των νέων ιών και στην έξοδό τους από το κύτταρο. Παράλληλα με την ενίσχυση της έκφρασης των E1-E5, με την ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή, αρχίζουν να εκφράζονται και οι πρωτεΐνες του καψιδίου L1 & L2, στα ανώτατα επίπεδα διαφοροποίησης (Conway et al, 2009). Με την συμβολή των E1-E5 καθώς και τις αλληλεπιδράσεις της L2 με κυτταρικές πρωτεΐνες, συγκροτούνται τα νέα ιοσωμάτια και ακολουθεί απελευθέρωσή τους από το κύτταρο ξενιστή (Doorbar, 2006). Για τον επιτυχή κύκλο ζωής του, ο ιός χρησιμοποιεί ποικίλους μηχανισμούς αποφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η αντιγραφή του σε αδιαφοροποίητα κύτταρα, ο σχηματισμός καψιδίων σε εξωτερικές στοιβάδες και η μη λυτική έξοδος του, είναι ένας αρχικός τρόπος αποφυγής. Επιπλέον, χρησιμοποιείται η μοριακή μίμηση στην πρωτεϊνική αλληλουχία του ιού με τον ξενιστή. Ακόμη, έχουν περιγραφεί παραπάνω μηχανισμοί αναστολής κυτταροκινών, ιντερφερονών και MHC-I αντιγονοπαρουσίασης από ιικές πρωτεΐνες. Τέλος, η επαρκής αναστολή της απόπτωσης (p53, Rb, TRAIL, Fas/FasL κοκ) κυρίως από τις E5/6/7 ιικές πρωτεΐνες, αποτελεί ενδεχομένως την ύστατη προστασία του ιού ενάντια στην κυτταροτοξικότητα των ανοσοκυττάρων (Kannodia et al, 2007).

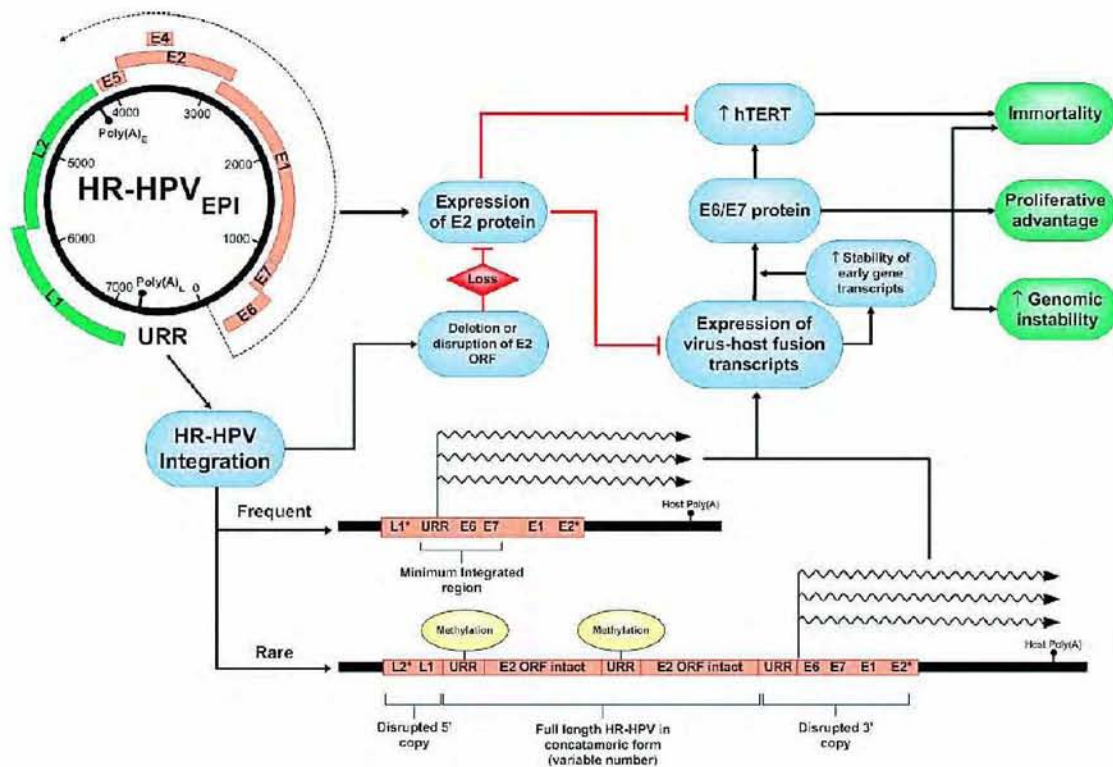
1.4. HPV και καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα σύνολο ετερογενών ασθενειών, με κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οργανισμού. Συνήθως, κατά την καρκινογένεση διαταράσσονται ένα ή περισσότερα μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του (Bernard, 2000). Ο όρος «καρκίνος» αποδόθηκε στη νόσο για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη (460 - 377 π.Χ.), τον Πατέρα της Ιατρικής, ο οποίος παρομοίασε τους συμπαγείς όγκους με τους καρκίνους (δεκάποδα οστρακοειδή), καθώς έχουν συμπαγή πυρήνα και απορροφούν θρεπτικά από τον οργανισμό μέσω τριχοειδών αγγείων, τα οποία μοιάζουν με τα άκρα των καρκινοειδών (Fayed, 2009). Άλλοι όροι που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι νεόπλασμα (Γαληνός, 129-199 μ.Χ.) και κακοήθεια (WHO). Η καρκινογένεση υφίσταται σε διακριτά στάδια: έναρξη (Initiation), προαγωγή (promotion), ανάπτυξη (progression), αγγειογένεση (angiogenesis) και μετάσταση (metastasis) (Gale, 2010).

Οι HPV προσβάλλουν τα κερατινοκύτταρα του φολιδωτού επιθηλίου της επιδερμίδας και του βλεννογόνου, προκαλώντας μια σειρά βλαβών, όπως καλοήθη θηλώματα, σπίλους και καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου, του πέους, του πρωκτού, του δέρματος, της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα (Handisurya et al, 2009). Χαρακτηριστική είναι η πολύ υψηλή ετερογένειά τους στο σύνολο των ασθενών (Ekstrom et al, 2013). Η συνηθέστερη όμως μορφή καρκίνου που προκαλούν είναι του τραχήλου της μήτρας και αποτελούν σχεδόν το 100% του αιτιολογικού παράγοντα (Crow, 2012). Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς κι η συχνότητα μορφών καρκίνου από HPV, της στοματικής κοιλότητας και του φάρυγγα (Scudellari, 2013). Η ανακάλυψή τους από την ομάδα του ιολόγου zur Hausen ήταν καθοριστικής σημασίας (Brody, 2012).

Οι HPV σε όλη την διάρκεια ζωής τους στο κύτταρο, φυσιολογικά, αντιγράφονται εντός του πυρήνα ως επίσωμα και εξέρχονται πάλι στο κυτταρόπλασμα, όταν πρόκειται να συναρμολογηθούν τα νέα ιωσμάτια. Παρόλα αυτά, ενδέχεται το ικό γονιδίωμα να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή και να «παγιδευτεί» εκεί. Η ενσωμάτωση είναι συχνή στους HPV 16/18, αυξημένη στα προχωρημένα στάδια και λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια της ιικής μόλυνσης (Li et al, 2008, Collins et al, 2009). Η ενσωμάτωση έχει παρατηρηθεί στο 90% των

περιστατικών καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας και αποτελεί πολύ σημαντικό γεγονός για την απορρύθμιση της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 & E7 των τύπων υψηλού κινδύνου και επομένως για την καρκινογένεση. Η ενσωμάτωση των υψηλού κινδύνου HPV στο γονιδίωμα, πραγματοποιείται έπειτα από θραύση του κυκλικού ιικού γενώματος, κυρίως στην περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης E2 ή E1. Η θραύση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια παραγωγής της κύριας ρυθμιστικής πρωτεΐνης του ιού, E2 από το ενσωματωμένο τμήμα (Pett et al, 2007). Εάν χαθεί κι η παραγόμενη E2 από τα επισώματα, λόγω επιτυχούς αντιμετώπισης της μόλυνσης από το ανοσοποιητικό σύστημα, τότε αίρεται η ρύθμιση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 & E7, τα οποία πλέον υπερεκφράζουν τα προϊόντα τους (Εικόνα 1.16) που οδηγούν στην καρκινογένεση, κυρίως μέσω p53, pRb και τελομεράσης, μιμούμενα μηχανισμούς HPV (-) καρκινικών κυττάρων (Lechner et al, 2013), που όμως δίνουν λιγότερες πιθανότητες επιβίωσης στους ασθενείς (Settle et al, 2009).



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των επιπτώσεων της ενσωμάτωσης των υψηλού κινδύνου (HR) HPV. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο ενσωματωμένος ιός διατηρεί τα E6 & E7, μαζί με τη ρυθμιστική περιοχή URR. Απουσία πρώιμου σήματος πολύ(A) του ιού, χρησιμοποιείται η πιο σύντομη περιοχή πολύ(A) του ξενιστή. Σπάνια, ενσωματώνονται τμήματα πολλαπλών αντιγράφων που όμως δεν εκφράζουν E2, λόγω μεθυλίωσης. Απώλεια επισωμάτων, δεν παράγεται ο ρυθμιστής E2, οι E6 & E7 υπερεκφράζονται και μέσω των στόχων του οδηγούν σε αυξημένο πολ/σμό, γενωμική αστάθεια και αθανатоποίηση των κυττάρων (Πηγή: Pett et al, 2007).

Οι ακριβείς μηχανισμοί ενσωμάτωσης δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και η απουσία ιικής ενσωματάσης όπως στους HIV οδηγεί στο συμπέρασμα πως πρόκειται για ένα τυχαίο γεγονός. Οι θέσεις ενσωμάτωσης είναι κυρίως οι εύθραυστες χρωμοσωμικές περιοχές (chromosomal fragile sites, CFS), οι οποίες γίνονται πιο δεκτικές στην ένθεση εξωγενούς DNA. Υψηλή ομοιότητα αλληλουχιών HPV και ξενιστή δεν έχει εντοπιστεί σε μεγάλη έκταση, όμως υπάρχουν σύντομες αλληλουχίες στον HPV 16, έως 50 bp, που εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με συχνές περιοχές ένθεσης (hotspots) και επομένως αναμένονται περισσότερες μελέτες (Schmitz *et al*, 2012). Εκτός από τους κυτταρικούς στόχους που αλληλεπιδρούν οι E6 & E7, η ογκογένεση ενισχύεται και με την επακόλουθη υπερέκφραση γονιδίων του ξενιστή που βρίσκονται στην περιοχή της ένθεσης (Ojesina *et al*, 2013).

Επίσης, οι επιγενετικές τροποποιήσεις φαίνεται πως είναι πολύ σημαντικές στην καρκινογένεση, καθώς και στον κύκλο ζωής των HPV (Johannsen *et al*, 2013). Γενικά έχει παρατηρηθεί υπερμεθυλίωση του γονιδίου L1 και της LCR, ανάλογη με την πορεία της καρκινογένεσης (Murakami *et al*, 2013, Yang, 2013). Επιπλέον, τα ογκογονίδια E6 & E7 εγκαθιδρύουν διαφορετικό πρότυπο DNA μεθυλίωσης στο κύτταρο ξενιστή κατά την καρκινογένεση, σε σχέση με HPV (-) καρκινικά κύτταρα (Lechner *et al*, 2013). Έχουν εντοπιστεί σε μελέτες συγκριτικής ανάλυσης, περισσότερες από 450 περιοχές (όπως cadherins) που δέχθηκαν επιγενετικές τροποποιήσεις από τους ενσωματωμένους HPV (Wilson *et al*, 2013). Τελικά, η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης για τη νόσο (Tornesello *et al*, 2013).

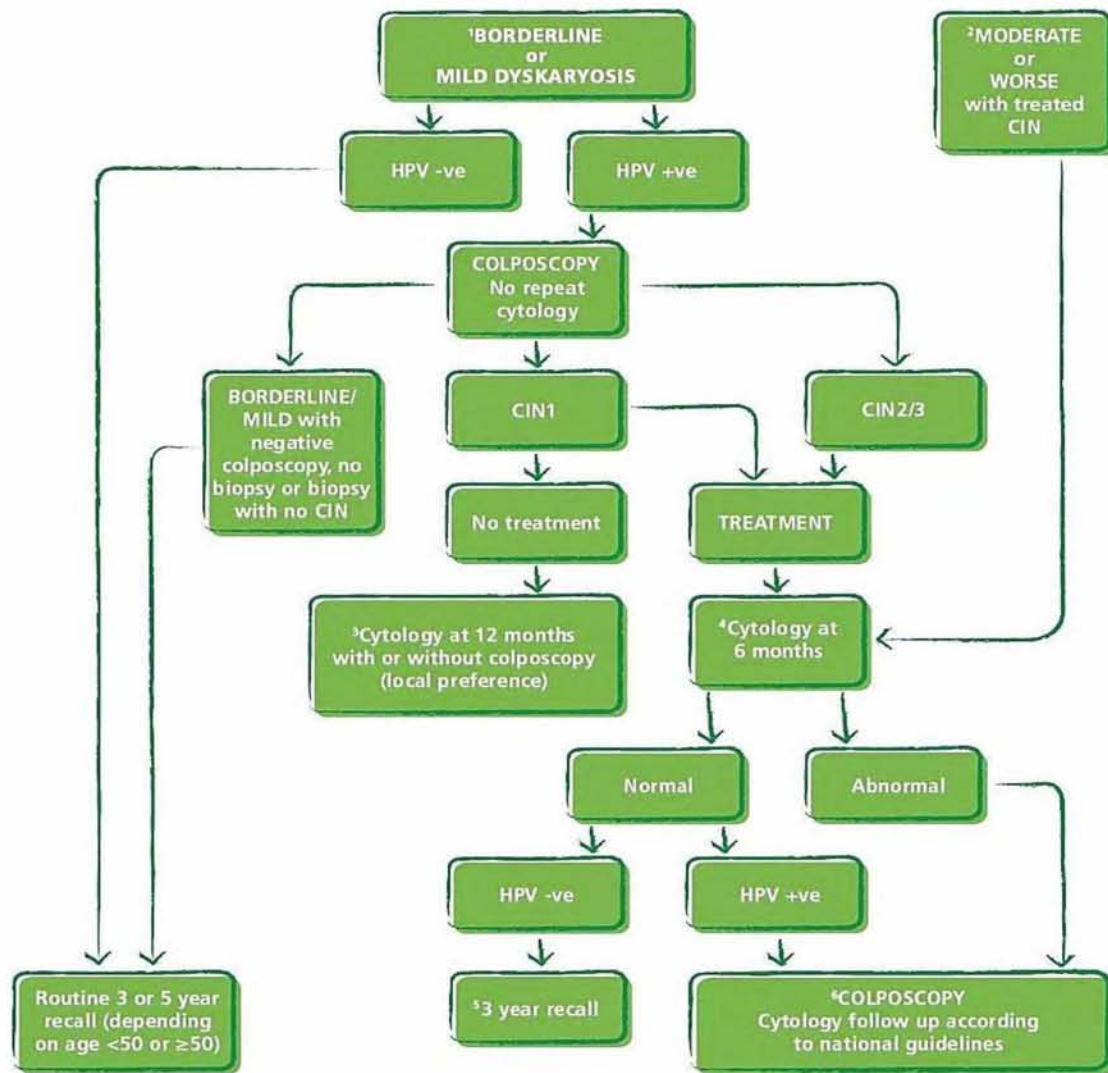
Σημαντικός παράγοντας στην καρκινογένεση από HPV είναι και το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς (Magnusson *et al*, 1999), καθώς και η υψηλή ετερογένεια των HPV, καθώς μόνο ορισμένοι HPV (+) θα αναπτύξουν καρκίνο (Chen *et al*, 2014, Kukimoto *et al*, 2013, Lizano *et al*, 2009). Πολυμορφισμοί σε γονίδια πρωτεϊνών που ενέχονται σε αποπτωτικά μονοπάτια και στον κυτταρικό κύκλο, όπως p53, MDM2 (αναστολέας της p53), CDKN1A και CDKN2A (αναστολείς κυκλινιοεξαρτώμενων κινασών) (de Freitas *et al*, 2012). Ένας συχνός πολυμορφισμός στην p53 είναι η P72R που αυξάνει τις πιθανότητες καρκινογένεσης περίπου 7 φορές (Storey *et al*, 1998). Πολύ σημαντικοί επίσης είναι κι οι πολυμορφισμοί στα HLA που κωδικοποιούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια MHC, καθώς μεταβάλλουν τις πιθανότητες καρκινογένεσης από HPV στον τράχηλο της μήτρας (Souza *et al*, 2009).

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως ασθενείς με HIV, δεν μολύνονται συχνά από τους HPV-16/18, δηλαδή τους υψηλού κινδύνου τύπους που προκαλούν το 70% των περιστατικών καρκίνου τραχήλου της μήτρας (McKenzie et al, 2010). Παρόλα αυτά, ο συνολικός κίνδυνος μόλυνσης ή/και εμφάνισης καρκίνου από HPV είναι αυξημένος λόγω της ανοσοκαταστολής που προκαλεί ο HIV (Palefsky, 2006). Τέλος, αύξηση της εμφάνισης καρκινογένεσης από HPV προκαλούν και άλλοι παράγοντες (έμμεσα συνδεδεμένοι με γενετικό υπόβαθρο), όπως ο τρόπος ζωής, η κατάχρηση ουσιών, το κάπνισμα κοκ (de Freitas et al, 2012).

1.5. Διάγνωση HPV λοιμώξεων

Η συχνότερη από τις σοβαρές επιπτώσεις λοιμώξεων των HPV, είναι η ανάπτυξη καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας. Η συνηθέστερη μέθοδος διάγνωσης είναι το test Pap, που εφευρέθηκε από τον Γ. Παπανικολάου, από τον οποίο κατονομάστηκε, πριν τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Ενέχεται στην δειγματοληψία επιχρίσματος κυττάρων από το βλεννογόνο επιθήλιο και στην μικροσκοπική παρατήρησή τους. Τα καρκινικά κύτταρα φέρουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές από τα φυσιολογικά, κάτι που επιτρέπει την διάγνωση καρκινογένεσης. Η βελτιωμένη μέθοδος liquid-based test Pap που εφαρμόζεται σήμερα, περιλαμβάνει κυτταρολογική εξέταση υγρής φάσης (LBC), κατά την οποία το κυτταρικό επίχρισμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο με υγρό συντήρησης (NIH, National Cancer Institute, cancer.gov). Συμπληρωματικά με την κυτταρολογική εξέταση, ανά περίπτωση μπορεί να εφαρμοστεί και κολποσκοπική εξέταση, αναλόγως με τα αποτελέσματα του test Pap.

Εναλλακτικά, μια νεότερη μέθοδος ελέγχου είναι το HPV test, που περιλαμβάνει ποικίλες μοριακές μεθόδους για ανίχνευση των HPV (πιο ευαίσθητη μέθοδος από το test Pap). Σταδιακά, πρόκειται να συμπληρώσει ή και να αντικαταστήσει το test Pap, ως βασική μέθοδος ελέγχου νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως, καθώς σχεδόν το σύνολο των περιστατικών οφείλεται σε μόλυνση από HPV υψηλού κινδύνου και επομένως ανίχνευσή τους προλαμβάνει την καρκινογένεση (Boulet et al, 2008). Συνίσταται, να γίνονται έλεγχοι ρουτίνας κατ' ελάχιστο, ανά τριετία (ηλικίες 21-50) ή ανά πενταετία (ηλικίες άνω των 50) για το test Pap ή ανά πενταετία (ηλικίες ~30-65) για τον συνδυασμό των μεθόδων. Οι οδηγίες για το πρόγραμμα σάρωσης καρκίνου τραχήλου της μήτρας συνοψίζονται στην Εικόνα 1.17 (Guidelines for the NHS Cervical Screening Programme, 2010).



Εικόνα 1.17: Σχηματικό διάγραμμα οδηγιών NHS για το πρόγραμμα σάρωσης HPV στον τράχηλο της μήτρας (Πηγή: HPV Triage and Test of Cure Protocol, 2010).

Έως το 2012, είχαν εγκριθεί πέντε δοκιμασίες ανίχνευσης HPV από τον FDA (Food & Drug Administration) των ΗΠΑ.

Το 2003, εγκρίθηκε το Hybrid Capture 2 High Risk HPV DNA Test, μια ανοσοδοκιμασία, στην οποία χρησιμοποιείται μίγμα RNA ιχνηθετών για την ανίχνευση DNA τύπων υψηλού κινδύνου. Τα υβρίδια DNA/RNA δεσμεύονται έπειτα σε επιφάνεια με ακινητοποιημένα ειδικά αντισώματα, προστίθενται άλλα ειδικά αντισώματα συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση και ανιχνεύονται με κατάλληλο υπόστρωμα (*Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test, 2003*).

Το 2009, εγκρίθηκε το Cervista™ HPV HR and Genfind™ DNA Extraction Kit, για ανίχνευση 14 τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας. Με αυτή τη μέθοδο,

εφαρμόζονται δύο ισόθερμες αντιδράσεις. Στην πρωτογενή αντίδραση, το DNA στόχος υβριδίζεται με δύο τύπους ιχνηθετών, οι οποίοι αλληλεπικαλύπτονται σε 1 bp τουλάχιστον και αποκόπτονται από το ένζυμο Cleavase στο 5' άκρο της αλληλεπικάλυσης, παράγοντας σε κάθε κύκλο σημαντικό αριθμό κομμένων τμημάτων, τα οποία προσδένονται σε φουρκέτα ολιγονουκλεοτιδίου FRET, αποτελώντας νέο στόχο για την Cleavase. Το ένζυμο αποκόπτει τους ιχνηθέτες FRET μεταξύ περιοχής αποσιώπησης και φθοριοχρώματος, στην δευτερογενή αντίδραση και ο φθορισμός ανιχνεύεται από την συσκευή σάρωσης (*Cervista HPV HR and Genfind DNA Extraction Kit, 2009*). Το ίδιο έτος, εγκρίθηκε και το Cervista™ HPV 16/18 (*Cervista HPV 16/18, 2009*), το οποίο αποτελεί την ίδια μέθοδο, όμως στοχεύει ειδικά μόνο τους δύο πιο κοινούς τύπους υψηλής επικινδυνότητας, τον 16 και τον 18 και έχει επίσης πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (*Bartholomew et al, 2011*).

Το 2011, εγκρίθηκε το cobas HPV Test. Είναι μια αυτοματοποιημένη μέθοδος ανίχνευσης 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου στην συσκευή COBAS 4800 της Roche. Στο πρώτο στάδιο, λαμβάνει χώρα αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων για εξαγωγή ολικού DNA. Στο δεύτερο στάδιο, χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για τους 14 τύπους και για την β-σφαιρίνη (θετικός μάρτυρας) σε αντίδραση PCR. Παράλληλα, πραγματοποιείται ανίχνευση πραγματικού χρόνου των κομμένων τμημάτων φθορισμένων ιχνηθετών (*cobas HPV Test, 2011*).

Το ίδιο έτος, εγκρίθηκε και το APTIMA® HPV Assay. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια που πραγματοποιούνται στο ίδιο μικροσωληνάριο. Τα δείγματα μεταφέρονται σε μικροσωληνάρια που περιέχουν διάλυμα λύσης των κυττάρων και προστασίας του mRNA από αποδιάταξη. Ο στόχος - mRNA (των HPV) υβριδοποιείται σε συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια, ακινητοποιημένα σε μαγνητικά σφαιρίδια. Ακολουθεί έκπλυση των σφαιριδίων για απομάκρυνση μη ειδικών στοιχείων. Στο 2^ο στάδιο, το mRNA των HPV πολλαπλασιάζεται με τη μέθοδο TMA, στην οποία η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV παράγει cDNA από τη μήτρα mRNA, προσθέτοντας αλληλουχία του υποκινητή για την T7 RNA πολυμεράση, η οποία παράγει πολλαπλά αντίγραφα RNA από το cDNA. Στο 3^ο στάδιο, τα αντίγραφα υβριδίζονται με μονόκλωνους συμπληρωματικούς ιχνηθέτες. Οι μη υβριδοποιημένοι ιχνηθέτες απενεργοποιούνται από το Selection Reagent και οι υβριδοποιημένοι ανιχνεύονται με χημειοφωταύγεια (*APTIMA HPV Assay, 2011*).

Εκτός από τις παραπάνω, έχουν χρησιμοποιηθεί κι άλλες μοριακές τεχνικές. Ο συνδυασμός και η σταθερή χρήση μοριακών μεθόδων όπως PCR, qPCR, NASBA, μοριακή υβριδοποίηση, απευθείας αλληλούχηση και γονοτύπηση των HPV επιτρέπει την ακριβή διάγνωση HPV μολύνσεων, με υψηλή ευαισθησία (Tinelli et al, 2010). Έχουν δοκιμαστεί τυποειδικές PCR με υψηλή ευαισθησία (Weyn et al, 2007). Στις απλές αντιδράσεις PCR, η ευαισθησία αυξάνεται με την στόχευση των ογκογονιδίων E6/E7 καθώς διατηρούνται ακόμα και στην ενσωμάτωση του ιού (Morris, 2005). Ειδικά για την διάκριση της φυσικής κατάστασης του ιικού γενώματος (ενσωματωμένη ή επισωματική), υπολογίζεται ο λόγος E2/E6, με τεχνικές PCR, καθώς το E2 γονίδιο υφίσταται θραύση στην ενσωμάτωση και η τιμή του είναι σημαντικός προγνωστικός δείκτης (Chang et al, 2013). Για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων (π.χ. πολλαπλές μολύνσεις ή ταχύτερη σάρωση), έχουν χρησιμοποιηθεί PCR πολύπλεξης (Souho et al, 2014). Για αυξημένη ενίσχυση των στόχων, έχουν δοκιμαστεί πρωτόκολλα επάλληλης (nested) PCR (Lee et al, 2009). Περισσότερο εξελιγμένες μορφές PCR, όπως οι πραγματικού χρόνου PCR πολύπλεξης, έχουν αυξημένη ευαισθησία σε σύγκριση με τις PCR τελικού σημείου και άλλες μεθόδους και έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση HPV υψηλού κινδύνου και μπορούν να καθιερωθούν μελλοντικά ως αυτοματοποιημένες μέθοδοι ρουτίνας (Poljak et al, 2013, Roberts et al, 2011). Επιπρόσθετα, έχουν δοκιμασθεί μέθοδοι μικροσυστοιχιών (DNA microarrays) για την ανίχνευση HPV τύπων σε μονές ή πολλαπλές μολύνσεις (Shen-Gunther et al, 2013). Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί και η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (next generation sequencing), για ανίχνευση HPV και επιδημιολογικές μελέτες των παραλλαγμάτων τους (Arroyo et al, 2013).

Για την παρακολούθηση της εξέλιξης της γονοτύπησης των HPV, με σκοπό την καλύτερη ανίχνευση νέων τύπων/υποτύπων/παραλλαγμάτων, την διευκόλυνση επιδημιολογικών μελετών και την βελτίωση της ανάπτυξης εμβολίων κατά των HPV, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) διοργανώνει τα τελευταία έτη, διεθνείς μελέτες με συνεργασία εργαστηρίων από όλο τον κόσμο που οδηγούν σε ολοένα και αυξημένη ευαισθησία των μεθόδων (Eklund et al, 2010, 2012).

1.6. Αντιμετώπιση των HPV

Έως σήμερα δεν υπάρχει κάποια ολοκληρωμένη θεραπεία για την αντιμετώπιση των HPV στις νεοπλασίες. Οι μέθοδοι αντιμετώπισης σε διαγνωσμένη

νόσο είναι κυρίως χειρουργικές. Αναλόγως την περίπτωση, αφαιρείται η περιοχή ή εφαρμόζεται κρυοκαυτηριασμός της περιοχής (*Guidelines for the NHSCSP, 2010*).

Η ιδανική αντιμετώπιση των HPV είναι από ένα προενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα, κάτι που επιτυγχάνεται με εμβολιασμό, ανοσοποίηση και επαγωγή ειδικής ανοσολογικής μνήμης. Μέχρι σήμερα, έχουν εγκριθεί δύο προφυλακτικά εμβόλια από τον FDA, το Gardasil (Merck), 2006 και το Cervarix (GSK), 2009. Αμφότερα στηρίζονται στις καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού L1. Το πρώτο (δισθενές) στόχευε στους 2 συχνότερους τύπους υψηλού κινδύνου, HPV 16/18, ώστε να προλαμβάνει περίπου το 70% των περιστατικών κακοήθειας, ενώ το δεύτερο (τετρασθενές) στόχευε επιπλέον και τους συχνότερους τύπους καλοήθειας, 6 & 11 (*Eisenstein, 2011*). Ειδικοί οδηγοί, όπως π.χ. από την ACS (American Cancer Society) προτείνουν εμβολιασμό από ηλικίες 9-12 και έως 26, ανάλογα με τον κίνδυνο έκθεσης (*Savlow et al, 2007*). Το ιδανικό είναι να ξεπεραστούν τα εμπόδια του κόστους, ώστε να χρησιμοποιηθούν και σε χώρες του «τρίτου κόσμου», εκεί όπου οι λοιμώξεις από HPV είναι συχνότερες (*Eisenstein, 2012*). Αναμένεται ακόμα η προσθήκη περισσότερων στόχων στα νεότερα εμβόλια, για κάλυψη έως 90% των λοιμώξεων, καθώς κι ανάπτυξη θεραπευτικών εμβολίων που να επάγουν κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία (*Pang et al, 2012*). Επίσης, η ανάπτυξη μικρομοριακών φαρμάκων – αναστολέων των ιικών πρωτεϊνών καθώς και τεχνικές siRNA, θα μπορούσαν να διερευνηθούν περαιτέρω (*Butz et al, 2003, Govan, 2005*).

1.7. Σκοπός της εργασίας

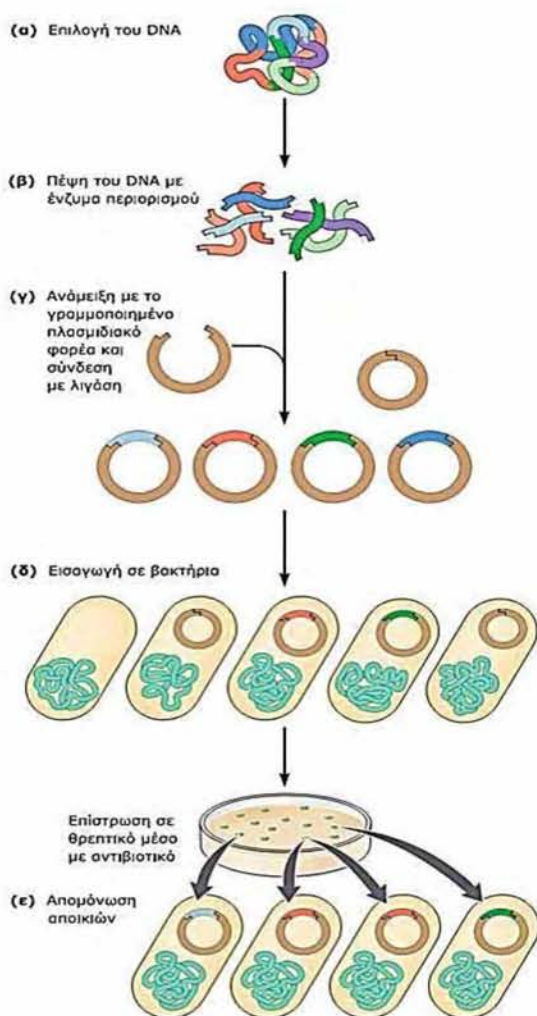
Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας πρωτότυπης συνδυαστικής διαγνωστικής μεθόδου HPV τύπων υψηλής επικινδυνότητας, που να στηρίζεται σε ομάδες μιγμάτων multiplex real-time PCR, για ταχύτερη σάρωση και υψηλότερη ευαισθησία από τις PCR τελικού σημείου, με χρήση SYBR Green για διάκριση τύπων με βάση την διαφορά T_m και επακόλουθη ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης για διάκριση με βάση το μοριακό τους βάρος. Ο συνδυασμός των δύο τεχνικών έχει ως στόχο την αύξηση της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου L1 των υψηλής επικινδυνότητας τύπων HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66

Τα βακτηριακά πλασμίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA με κοινό στόχο την ένθεση τμήματος DNA εντός της αλληλουχίας τους. Συνηθέστερος ξενιστής είναι το εντεροβακτήριο *Escherichia coli*, καθώς και άλλα βακτήρια. Τα πλασμίδια με την απόκτηση του ενθέματος, συνήθως είτε εκφράζουν το ένθεμα παράγοντας πρωτεΐνες ή RNA, είτε απλά το φιλοξενούν δημιουργώντας βιβλιοθήκες DNA (Kahn et al, 1979). Είναι απαραίτητα σε μια τυπική διαδικασία κλωνοποίησης DNA, τα ακόλουθα 5 στάδια: επιλογή ενθέματος DNA, πέψη ενθέματος - φορέα με περιοριστικά ένζυμα, αντίδραση λιγάσης, μετασχηματισμός βακτηρίων και επιλογή θετικών αποικιών (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Σύνοψη των 5 σταδίων της διαδικασίας της κλωνοποίησης. Α) Επιλογή του DNA, Β) Πέψη με περιοριστικά ένζυμα, Γ) Αντίδραση λιγάσης, Δ) Μετασχηματισμός βακτηρίων και Ε) Επιλογή θετικών αποικιών.

Σε μια τέτοια διαδικασία, αρχικά επιλέγεται η πηγή του μελλοντικού ενθέματος (συνήθως γονιδιωματικό DNA, συμπληρωματικό cDNA από RNA ή απευθείας προϊόν από PCR), καθώς και ο κατάλληλος φορέας που θα φιλοξενήσει το ένθεμα (συνήθως βακτηριακά πλασμίδια, κοσμίδια και γονιδιώματα βακτηριοφάγων για σχετικά μικρού μήκους ενθέματα ή τεχνητά χρωμοσώματα φάγων/βακτηρίων/ζύμης για ενθέματα μεγάλων αλληλουχιών έως και ~2000 kb). Στην συνέχεια, απομονώνονται (καθαρισμός πυρηνικών οξέων) και ακολουθεί πέψη τους με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (ενδονουκλεάσες και εξωνουκλεάσες), τα οποία είναι εξειδικευμένα ένζυμα πέψης, που διασπούν τα πυρηνικά οξέα σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι θέσεις πέψης είναι είτε εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης (κατά κανόνα 4-8 νουκλεοτίδια), είτε σε γειτονικές θέσεις, είτε πιο απομακρυσμένα. Συνήθως, χρησιμοποιούνται ένζυμα που πέπτουν στις θέσεις αναγνώρισης. Τα άκρα που θα προκύψουν, ανάλογα με το ένζυμο περιορισμού, θα είναι είτε κολλώδη (μονόκλωνα), είτε λεία (δίκλωνα). Για βελτιστοποίηση της διαδικασίας, μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού, ακολουθεί καθαρισμός των προκύπτοντων τμημάτων φορέα και ενθέματος. Σκοπός της πέψης, είναι η δημιουργία τουλάχιστον ενός συμπληρωματικού άκρου στον φορέα και στο ένθεμα (στην περίπτωση που το δεύτερο άκρο και των δύο είναι δίκλωνο), ώστε να συνδεθούν έπειτα, με την επιθυμητή φορά και ο πλασμιδιακός φορέας να αποκτήσει το ένθεμα σε μια αντίδραση που καταλύει το ένζυμο ligase (δεσμάση ή λιγάση). Το ένζυμο αυτό συνδέει ομοιοπολικά τις αλυσίδες του φορέα με το ένθεμα δημιουργώντας το επιθυμητό προϊόν. Το προϊόν θα πρέπει να μετασχηματίσει κάποιον βακτηριακό, κατά κανόνα, ξενιστή (π.χ. *E. coli*), ο οποίος θα το πολλαπλασιάσει δημιουργώντας πολλαπλά αντίγραφα σε επαρκή ποσότητα. Ο φορέας είναι απαραίτητο να φέρει στοιχείο που να αποδίδει μια ανιχνεύσιμη ιδιότητα στα μετασχηματισμένα βακτήρια, συνήθως ανθεκτικότητα στην καλλιέργεια παρουσία συγκεκριμένου αντιβιοτικού, ώστε τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια να μην αναπτυχθούν. Η επιβεβαίωση της επιτυχίας της διαδικασίας πραγματοποιείται στο πέμπτο στάδιο, με επιλογή των πιθανών θετικών για το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αποικιών, την καλλιέργειά τους, την απομόνωση του πλασμιδίου που περιέχουν και τέλος με αλληλούχισή του (Watson et al, 2007).

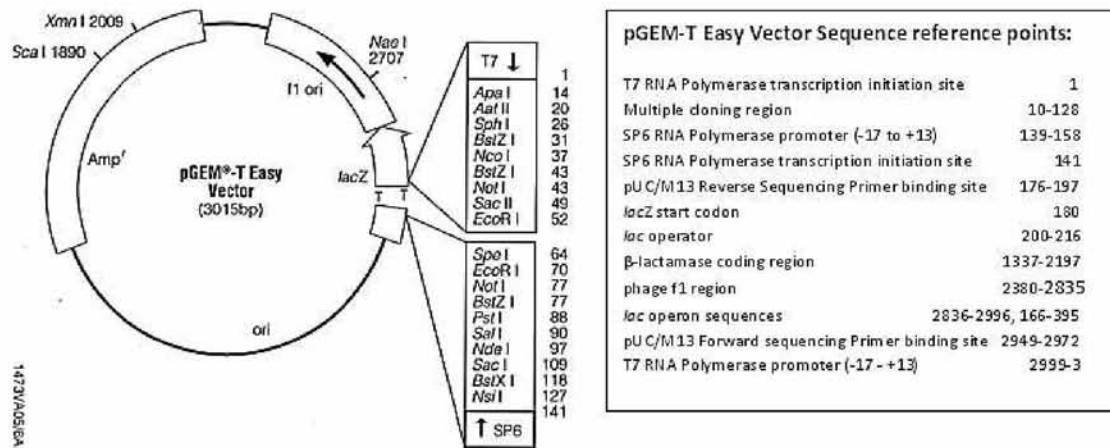
Σύμφωνα με την ίδια λογική πραγματοποιήθηκε και η κλωνοποίηση του γονιδίου L1 για τους 9 τύπους ιών υψηλής επικινδυνότητας (HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66). Η επιλογή του γονιδίου L1 οφείλεται στην υψηλή συντήρηση που εμφανίζει μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Κατασκευάστηκαν τυπο-ειδικά ζεύγη εκκινητών που στόχευαν το συγκεκριμένο γονίδιο για κάθε τύπο HPV (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου L1 για τους 9 τύπους HPV με τη μέθοδο της PCR.

Όνομα	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'→3'	Μήκος (bp) προϊόντων
HPV-16 L1F	Sense	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291
HPV-16 L1R	Antisense	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV-18 L1F	Sense	GCCCCTGCCTCTACACAGTA	292
HPV-18 L1R	Antisense	ATCCTGCTTATTGCCACCAC	
HPV-31 L1F	Sense	CAACGTGCTCAGGGACAC	291
HPV-31 L1R	Antisense	GGGAGGTGTGGTCAATCC	
HPV-33 L1F	Sense	TAACACCTCCTCCATCTGCT	202
HPV-33 L1R	Antisense	CCTGCCTGTAATAAAAACTTGC	
HPV-35 L1F	Sense	GTAGGTCGTGGTCAGCCATT	227
HPV-35 L1R	Antisense	TGGTTAGCATTACAAGGTGTGC	
HPV-45 L1F	Sense	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233
HPV-45 L1R	Antisense	CCACGACCAATTTCATACC	
HPV-51 L1F	Sense	TCCAATACCTAAAACCTCAACG	155
HPV-51 L1R	Antisense	CACAACCCACACCAACCTA	
HPV-58 L1F	Sense	GATTTGTTACCTCCCAGGCTAT	233
HPV-58 L1R	Antisense	TCTTTTTGCGTTTGGTGGATG	
HPV-66 L1F	Sense	CGCCGTAACGTATTCCCTA	168
HPV-66 L1R	Antisense	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Η αρχική πηγή ενίσχυσης ήταν γενωμικό DNA από κλινικά δείγματα, από τα νοσοκομεία: Αντικαρκινικό «Άγιος Σάββας» και Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, στα οποία είχαν ήδη ταυτοποιηθεί οι συγκεκριμένοι τύποι HPV και επιβεβαιώθηκαν στο εργαστήριό μας με άλλες μεθόδους, όπως Nested Multiplex PCR.

Ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε το πλασμίδιο pGEM® - T Easy Vector (Promega) (Εικόνα 2.2), το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (επιλογή μετασηματισμένων αποικιών σε θρεπτικό με αντιβιοτικό), καθώς και το lacZ (επιλογή λευκών έναντι κυανών αποικιών λόγω ανασυνδυασμένου πλασμιδίου), το οποίο διακόπτεται από την περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker), που αποτελεί την θέση κλωνοποίησης (pGEM® - T Easy Vector – Technical Manual).



Εικόνα 2.2: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pGEM® - T Easy Vector (Promega).

Ως ξενιστές των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν στελέχη βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (JM109), τα οποία μετασχηματίστηκαν με την κλασική μέθοδο χλωριούχου ασβεστίου και θερμικού σοκ (μέθοδος χημικού μετασχηματισμού). Η συγκεκριμένη μέθοδος επινοήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1973 και εφαρμόζεται μέχρι σήμερα ως η συνηθέστερη μέθοδος μετασχηματισμού, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Κατά τη μέθοδο αυτή, συνδυάζεται το θερμικό σοκ με την προσθήκη μείγματος εισαγόμενου DNA και χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) στις καλλιέργειες βακτηρίων (αν πρόκειται για κυτταροκαλλιέργειες ευκαρυωτών π.χ. θηλαστικών, τότε προτιμάται το άλας φωσφορικό ασβέστιο, Ca-phosphate, το οποίο επιπρόσθετα παρέχει προστασία έναντι νουκλεασών εντός του κυττάρου). Τα δικατιόντα ασβεστίου (Ca^{++}) επάγουν την δεκτικότητα των κυττάρων στην εισαγωγή εξωγενούς DNA και το ακόλουθο θερμικό σοκ επαναφέρει τα κύτταρα στην αρχική τους κατάσταση, όπου δεν είναι πλέον δεκτικά σε εξωγενές DNA (Graham, van der Eb, 1973).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια απομονώθηκαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων αποικιών και αλληλουχήθηκαν, προς επιβεβαίωση επιτυχούς κλωνοποίησης, ώστε να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη της multiplex real-time PCR για την ανίχνευση των 9 τύπων HPV.

2.2. Ανάπτυξη Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πολύπλεξης, πραγματικού χρόνου (multiplex Real-time PCR) για την ανίχνευση τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία μέθοδος απλής λογικής που στηρίζεται στην αρχή της συμπληρωματικότητας και στοχεύει στον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων (ενίσχυση αλληλουχίας). Επινοήθηκε από τον Kary Mullis (1985) και τα δικαιώματα χρήσης, εμπορικής εκμετάλλευσης και ορισμένων εφαρμογών της μεθόδου κατοχυρώθηκαν, αρχικά, και δύο χρόνια μετά την επινοήσή της, με δύο διαφορετικές πατέντες (*USPTO Patent Numbers: 4.683.202, 4.683.195*). Έκτοτε, έχει εξελιχθεί, έχει αποκτήσει πλειάδα τροποποιημένων μορφών και έχει χρησιμοποιηθεί από πολυάριθμα εργαστήρια παγκοσμίως σε μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Η λογική όμως της μεθόδου παραμένει η ίδια. Στηρίζεται, κυρίως, στην έμφυτη ιδιότητα όλων των οργανισμών να αντιγράφουν το γενετικό τους υλικό με την χρήση ειδικών ενζύμων, τις πολυμεράσες, καθώς και στην φυσική ιδιότητα των δύο αλυσίδων δίκλωνου DNA να αποδιατάσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες (οι δεσμοί υδρογόνου των αζωτούχων βάσεων είναι ασθενείς) και να επαναδιατάσσονται προς δίκλινα μόρια, σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας, κατά την ελάττωση της θερμοκρασίας.

Στη μέθοδο, κύρια στοιχεία είναι η DNA εξαρτώμενη - DNA πολυμεράση, ένα ή περισσότερα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές) με ειδική αλληλουχία (για πρόσδεση σε συγκεκριμένα σημεία της μήτρας DNA), τα μονομερή της αντιγραφής (dNTPs) και ο θερμοκυκλοποιητής που διευκολύνει την ταχεία εναλλαγή θερμοκρασιών. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενη αυξομείωση θερμοκρασίας που ολοκληρώνεται συνήθως σε 30 έως 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια:

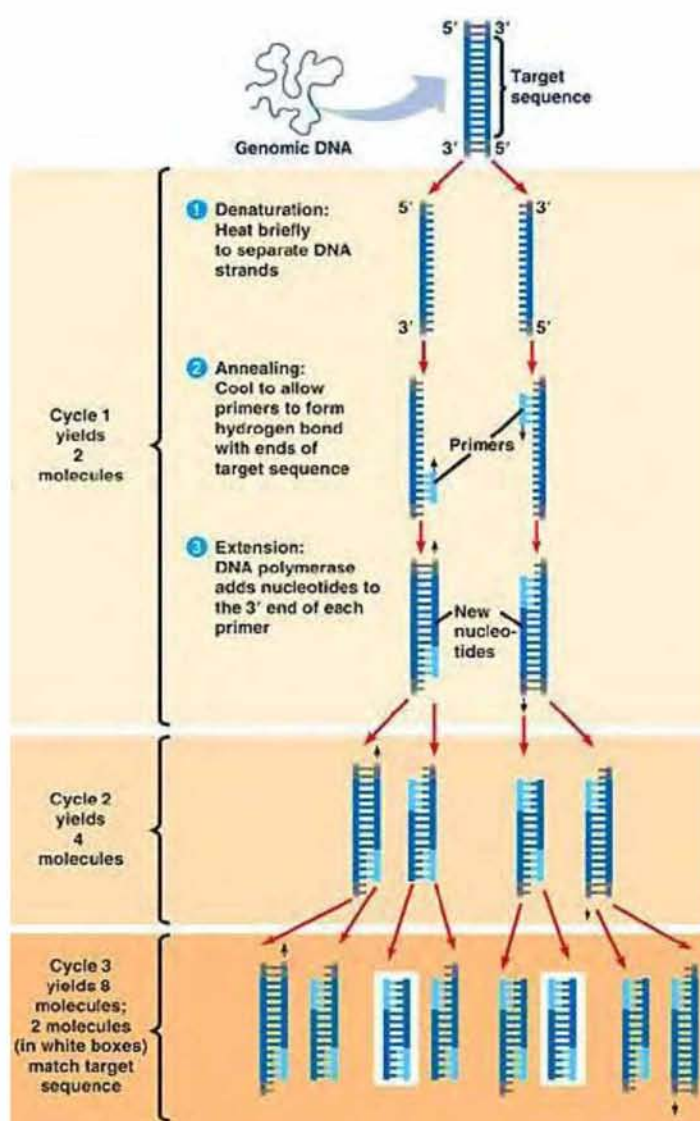
1^ο στάδιο: Αποδιάταξη. Αρχικά, αναμειγνύονται όλα τα αντιδραστήρια και επωάζονται σε υψηλή θερμοκρασία συνήθως 94-97 °C. Όλα τα δίκλινα μόρια νουκλεϊκών οξέων αποδιατάσσονται σε αυτές τις θερμοκρασίες (εξασθενούν οι δεσμοί υδρογόνου και απομακρύνονται οι δύο αλυσίδες).

2^ο στάδιο: Υβριδοποίηση. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται σημαντικά χαμηλότερα, ώστε να συμπίπτει με την χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών

(θερμοκρασία τήξης T_m) στη μήτρα DNA ελαττούμενη κατά $5\text{ }^\circ\text{C}$. Έκαστος εκκινητής του ζεύγους αναγνωρίζει διαφορετική αλυσίδα της μήτρας DNA. Η πρόσδεσή τους γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε η επιθυμητή αλληλουχία να βρίσκεται καθοδικά του $3'$ άκρου του κάθε εκκινητή και να περιέχεται ανάμεσα στις θέσεις πρόσδεσής τους.

3ο στάδιο: Επιμήκυνση. Στο τελευταίο στάδιο, η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα, ώστε να συμπίπτει με την βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας του ενζύμου. Σε αυτό το στάδιο, η πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο της κάθε αλυσίδας επιμηκώνοντας το $3'$ άκρο του κάθε εκκινητή.

Στην Εικόνα 2.3 συνοψίζονται τα τρία στάδια κάθε κύκλου, καθώς και οι τύποι των παραγόμενων μορίων στους τρεις πρώτους κύκλους.

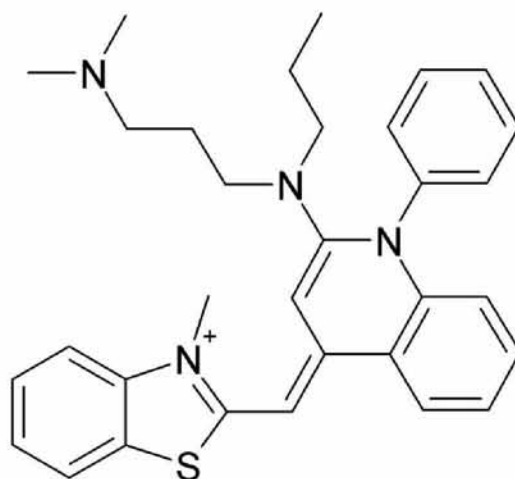


Εικόνα 2.3: Η μέθοδος της PCR. Απεικονίζονται οι τύποι των παραγόμενων μορίων στους τρεις πρώτους κύκλους αντιδράσεων. Στο τέλος του πρώτου κύκλου υπάρχει μόνο ένας τύπος προϊόντος (διαθέτει μονόκλωνο άκρο ανοδικά του $5'$ άκρου του εκκινητή). Στο τέλος του δεύτερου κύκλου παράγεται ένας επιπλέον τύπος προϊόντος (επίσης με μονόκλωνο άκρο), του οποίου η μία αλυσίδα αποτελεί το επιθυμητό τελικό προϊόν. Στον τρίτο κύκλο παράγεται ο τελευταίος τύπος προϊόντος που αποτελεί το επιθυμητό δίκλωνο μόριο. Στον πρώτο κύκλο της εικόνας διακρίνονται τα τρία επαναλαμβανόμενα στάδια κάθε κύκλου: 1. Αποδιάταξη, 2. Υβριδοποίηση, 3. Επιμήκυνση. (Πηγή: <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/mod/mol/>)

Μία τυπική λοιπόν PCR αποτελείται από 30 έως 40 επαναλήψεις των παραπάνω τριών σταδίων. Επιπλέον, δύναται να υπάρχει ένα στάδιο πριν την έναρξη της πρώτης αποδιάταξης, το οποίο ρυθμίζεται στην ίδια θερμοκρασία με αυτήν, όμως διαρκεί περισσότερο με σκοπό την εξασφάλιση της πλήρους αποδιάταξης των δίκλωνων μορίων. Επίσης, στο τέλος της διαδικασίας δύναται να υπάρξει επιπλέον στάδιο επιμήκυνσης με μεγαλύτερη διάρκεια για πολυμερισμό κλώνων που ενδέχεται να είναι ημιτελείς. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί πως το επιθυμητό δίκλωνο μόριο πρωτοσηματίζεται κατά τον τρίτο κύκλο. Τέλος, χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο υψηλής σταθερότητας και αποδοτικότητας, αλλά και μικρού ποσοστού λαθών αντιγραφής, μετά το πέρας 30 κύκλων, θα έχουν παραχθεί περισσότερα από ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα του επιθυμητού δίκλωνου μορίου, έχοντας ως μήτρα ένα και μοναδικό δίκλωνο μόριο DNA. Η θερμοανθεκτική πολυμεράση Taq (του αρχαιοβακτηρίου *Thermus Aquaticus*) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πολυμεράση. Υπάρχουν άλλες πολυμεράσες πολύ περισσότερο ανθεκτικές στην υψηλή θερμοκρασία και με δυνατότητα επιδιόρθωσης λαθών αντιγραφής (δράση 3' → 5' εξωνουκλεάσης), όπως η Pfu (ενός εκ των πιο ακραίων θερμοανθεκτικών αρχαιοβακτηρίων, του *Pyrococcus furiosus*), η Pwo (του αρχαίου *Pyrococcus woesei*) και η πολυμεράση Vent, που όμως παράγουν σημαντικά μικρότερη ποσότητα τελικού προϊόντος. Προτιμώνται λοιπόν ως περισσότερο αξιόπιστα και ανθεκτικά από την Taq, όμως όχι σε περιπτώσεις που δίνεται βαρύτητα στο μέγεθος του τελικού προϊόντος (για πολλαπλασιασμό μικρής αρχικής ποσότητας DNA με σκοπό την ανίχνευσή του, ή την επιθυμητή αυξημένη παραγωγή τελικού προϊόντος για πολλαπλά μετέπειτα πειράματα). Η αδυναμία όμως επιδιόρθωσης λαθών από την Taq, πολλές φορές την οδηγεί στην πρόωμη λήξη του πολυμερισμού (αδυνατεί να αντιγράψει μεγάλα μήκη αλληλουχιών). Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση προτιμώνται οι πιο ακριβείς και αξιόπιστες πολυμεράσες, όταν δηλαδή χρειάζεται να αντιγραφούν μεγάλα μήκη αλληλουχιών (>3-4 kb) (Russell, 2006).

Υπάρχουν πολλές τροποποιημένες μέθοδοι PCR εκτός από την κλασική, όπως η επάλληλη (nested PCR), η αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), η ανεστραμμένη (Inverse PCR), η μειούμενης θερμοκρασίας υβριδοποίησης (Touch-down PCR), η θερμής έναρξης (Hot-start PCR) και η πραγματικού χρόνου ή ποσοτική (Real Time PCR/ qPCR).

Η ποσοτική PCR (qPCR/real-time PCR), επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων των προϊόντων με ποικίλες μεθόδους που επιτρέπουν ανίχνευση φθορισμού σε πραγματικό χρόνο, σε αντίθεση με την συμβατική PCR που επιτρέπει μια σχετική ποσοτικοποίηση μόνο στο τέλος της αντίδρασης (PCR τελικού σημείου). Στις εφαρμογές της συμπεριλαμβάνονται η ποσοτικοποίηση γονιδιακής έκφρασης, η ανάλυση πολυμορφισμών, η διάκριση αλληλομόρφων, η δημιουργία προφίλ έκφρασης, η ανίχνευση γενώματος παθογόνων μικροοργανισμών/ιών κι η μέτρηση του ιικού φορτίου. Σημαντικός δείκτης ποσοτικοποίησης για τον αρχικό αριθμό αντιγράφων στο δείγμα είναι ο ουδικός κύκλος (C_T), κατά τον οποίο εμφανίζονται ανιχνεύσιμα ποσά φθορισμού. Μερικές από τις μεθόδους ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι: SYBR Green, Taqman probe, molecular beacons (μοριακοί φάροι), scorpions κλπ. Γενικά χρησιμοποιούνται χρωστικές ειδικές για την αλληλουχία DNA (φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια), όπως ο ιχνηθέτης Taqman και μη ειδικές, όπως το SYBR Green (*Stratagene, Introduction to qPCR*).



Εικόνα 2.4: Χημικός τύπος της χρωστικής SYBR Green I (SGI) ή N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine, κατά IUPAC.

Για την ανάπτυξη της multiplex qPCR, χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green (Εικόνα 2.4), η οποία είναι ανεξάρτητη αλληλουχίας DNA και πλεονεκτεί έναντι του Taqman probe, καθώς δεν χρειάζεται περαιτέρω χρόνος για κατασκευή φθορίζοντων ολιγονουκλεοτιδίων για κάθε τύπο HPV, δεν υφίσταται τους σημαντικούς περιορισμούς στο μήκος της αλληλουχίας των προϊόντων, είναι πιο οικονομική μέθοδος και η εφαρμογή της μπορεί να επεκταθεί και σε περισσότερους

τύπους HPV. Επιπλέον θεωρείται πιο ασφαλής χρωστική συγκριτικά με το EtBr (Βρωμιούχο αιθίδιο), που είναι καρκινογόνο και το έχει αντικαταστήσει πλέον στην real time PCR. Όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα είναι πολύ σημαντικά για τη μοριακή διαγνωστική και γι αυτό επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος ανίχνευσης (Εικόνα 2.5).

SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

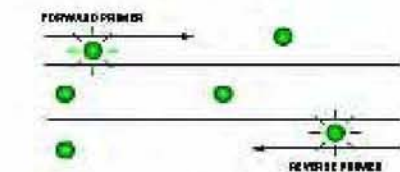
1. Reaction setup: The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



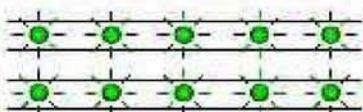
2. Denaturation: When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. Polymerization: During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. Polymerization completed: When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.



Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ποσοτικοποίησης με τη SYBR Green. Η χρωστική δεσμεύεται και φθορίζει σε δίκλωνο DNA. Κατά την αποδιάταξη των κλώνων αποδεσμεύεται από το DNA και ο φθορισμός ελαχιστοποιείται. Κατά τον πολυμερισμό και τον σχηματισμό νέων κλώνων, επαναδεσμεύεται στα δίκλιωνα μόρια και επομένως, στο τέλος του κάθε κύκλου ο φθορισμός έχει αυξηθεί εκθετικά. Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται από εξειδικευμένα συστήματα real-time PCR, στο τέλος κάθε κύκλου και ρυθμίζεται από κατάλληλο λογισμικό που συνδέεται απευθείας με το σύστημα ανίχνευσης.

2.2.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Για την επιβεβαίωση της ομαλής διεξαγωγής της αντίδρασης real-time PCR, απαραίτητη είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης για τον κάθε τύπο HPV. Η πρότυπη καμπύλη σχηματίζεται από διαδοχικές αραιώσεις ενός θετικού ελέγχου, στην προκειμένη περίπτωση, των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από κάθε τύπο,

όπου το κάθε σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί σε μία διαφορετική αραιώση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν συμβατικές PCR με διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του κάθε πλασμιδίου, με ακόλουθη ηλεκτροφόρηση για έλεγχο των αραιώσεων και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου με τις ίδιες αραιώσεις, για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης.

2.2.1.1. Αντιδράσεις PCR των διαδοχικών αραιώσεων

Αρχικά, ελέγχθηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων με συμβατική PCR. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Maximo Taq DNA Polymerase (dNTPs 1mM, MgCl₂ 1,5 mM) και οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στον θερμοκυκλοποιητή Stratagene Robocycler Gradient 96-Well Thermal Cycler PCR. Η προετοιμασία όλων των αντιδράσεων της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες (ειδικοί θάλαμοι κάθετης νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II). Ενδεικτικά, για τον HPV 33, ακολουθούν τα δείγματα των διαδοχικών αραιώσεων που επιλέχθηκαν, οι όγκοι των αντιδραστηρίων και το πρόγραμμα στο οποίο ρυθμίστηκε ο θερμοκυκλοποιητής.

Πίνακας 2.2: Αύξων αριθμός δειγμάτων και διαδοχικές αραιώσεις για τον HPV 33. Στο τελευταίο μικροσωληνάριο προστίθεται ο αρνητικός έλεγχος (ποσότητα καθαρού ύδατος αντί του πλασμιδίου).

DNA	Tubes
HPV 33 (10 ⁻⁵)	1
HPV 33 (10 ⁻⁶)	2
HPV 33 (10 ⁻⁷)	3
HPV 33 (10 ⁻⁸)	4
HPV 33 (10 ⁻⁹)	5
HPV 33 (10 ⁻¹⁰)	6
(-) ddH ₂ O	7

Ακολουθεί στον Πίνακα 2.3 η ποσότητα των αντιδραστηρίων για το μίγμα που διαχωρίζεται στο κάθε μικροσωληνάριο (47μl/tube + 3 μl κάθε δείγμα).

Πίνακας 2.3: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά μία μονάδα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (HPV 33 L1 f/r) 25 pmol/μl	1 μl x 8 = 8 μl
dNTPs 10 mM	5 μl x 8 = 40 μl
Taq buffer 10x	5 μl x 8 = 40 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	35,5 μl x 8 = 284 μl
Taq (5u/μl) (2,5μl/tube)	0,5 μl x 8 = 4 μl

Τέλος, ακολουθεί το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR.

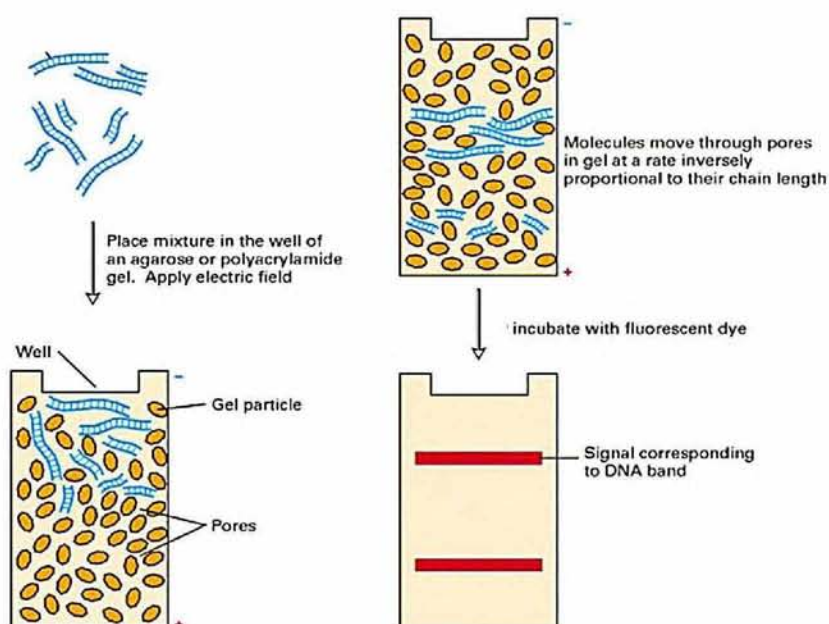
ROBOCYCLER

95°C	→	2 min	
95°C	→	40sec	} 40 Cycles
60°C	→	50sec	
72°C	→	20sec	
72°C	→	5 min	
4°C	→	∞	

2.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων μορίων με βάση την κινητικότητά τους παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια απλή και κοινή μέθοδος για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο αντιδράσεων PCR. Με αυτή τη μέθοδο γίνεται ο έλεγχος των επιθυμητών προϊόντων και των πιθανών παραπροϊόντων με βάση το μήκος των μορίων, καθώς και η σχετική ποσότητά τους με βάση τον αριθμό των μορίων. Ο διαχωρισμός με βάση το μήκος των μορίων επιτυγχάνεται με την τελική θέση (ύψος) των ζωνώσεων που δημιουργούνται μετά την ηλεκτροφόρηση και η σύγκριση του σχετικού αριθμού μορίων γίνεται με βάση τις εντάσεις των ζωνώσεων. Ενδείκνυται για διαχωρισμό μορίων DNA που διαφέρουν κατά μερικές

εκατοντάδες έως και χιλιάδες αζωτούχες βάσεις. Για διάκριση διαφορών μερικών δεκάδων βάσεων προτιμάται γενικά το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ενώ για μεγαλύτερες διαφορές (π.χ. άνω των 50 βάσεων), προτιμάται η αγαρόζη. Το πήκτωμα αγαρόζης (ή πολυακρυλαμίδης) είναι ένα πολυμερές που σχηματίζει μοριακά δομή πλέγματος. Τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνονται από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό, διερχόμενα από τους πόρους του πλέγματος αγαρόζης. Μικρότερου μήκους μόρια DNA διέρχονται ταχύτερα μέσω των πόρων και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, συγκριτικά με μεγάλου μήκους μόρια DNA (Εικόνα 2.6) (Watson et al, 2007).

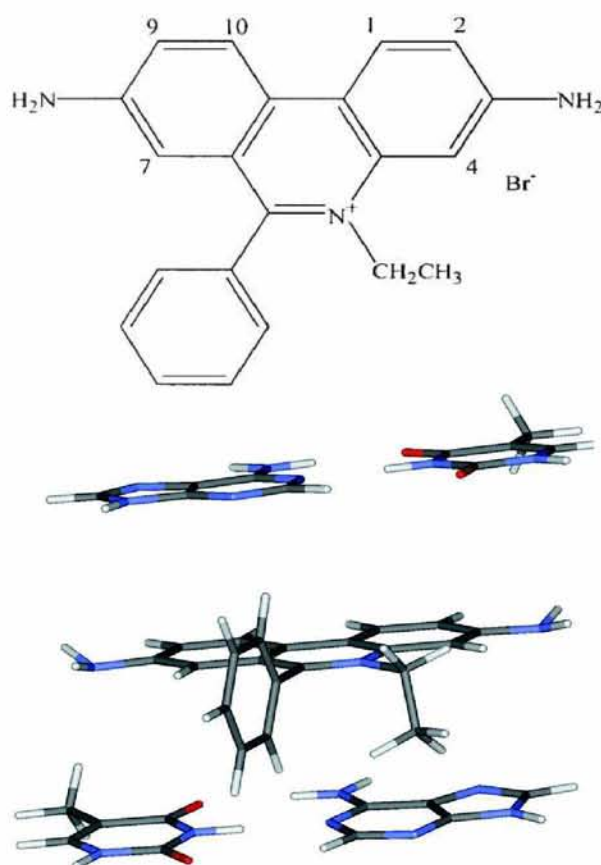


Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται από το αρνητικό ηλεκτρόδιο προς το θετικό, διαπερνώντας το πήκτωμα μέσω των πόρων του. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μήκος τους, καθώς τα μικρότερου μήκους μόρια είναι πιο ευκίνητα στους πόρους. Οι τελικές ζώνες αντιστοιχούν σε μόρια συγκεκριμένου μήκους.

Η οπτικοποίηση των ζωνώσεων μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται συνήθως με την αρχική προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και την μετέπειτα διέγερσή του με υπεριώδη ακτινοβολία. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται άλλες χρωστικές, ασφαλείς (το EtBr και η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μεταλλαξιογόνοι παράγοντες), όπως το Gel Red και το Gel Green, που όμως αποδίδουν χαμηλότερες εντάσεις στις ζωνώσεις (και επομένως χρησιμοποιούνται

σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες, ώστε οι εντάσεις να είναι συγκρίσιμες με του βρωμιούχου αιθιδίου).

Η ικανότητα δέσμευσης στο DNA, αλλά και πρόκλησης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, του βρωμιούχου αιθιδίου, οφείλεται στην παρεμβολή του μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, δημιουργώντας ασθενείς αλληλεπιδράσεις με αυτές και αποδιατάσσοντας τοπικά το DNA (Εικόνα 2.7). Η τοπική αυτή αποδιάταξη είναι αρκετή για την εισαγωγή μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA και γι αυτό, το EtBr χαρακτηρίζεται ως μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο ή τερατογόνο (Davies et al, 1997, Reha et al, 2002). Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η λήψη κατάλληλων μέτρων προστασίας κατά την χρήση του (γάντια, εργαστηριακές ποδιές, μάσκες προστασίας από την εισπνοή του, ειδικά προστατευτικά γυαλιά ή διαφανής πλάκα προστασίας κατά την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας με σκοπό την διέγερσή του κλπ).



Εικόνα 2.7: Δομή και ιδιότητες του EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο).

Επάνω: Διακρίνεται ο συντακτικός τύπος του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

(Πηγή: Davies et al, 1997)

Κάτω: Απεικόνιση με ράβδους της δομής του συμπλόκου παρεμβολής του EtBr ανάμεσα σε δύο ζεύγη αζωτούχων βάσεων (Αδενίνης - Θυμίνης επάνω και Θυμίνης - Αδενίνης κάτω). Παραλείπεται ο σκελετός της δίκλωνης πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας DNA χάριν απλούστευσης.

(Πηγή: Reha et al, 2002)

Με την ίδια λογική ηλεκτροφορήθηκαν και ελέγχθηκαν και τα προϊόντα των PCR των διαδοχικών αραιώσεων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (σε διάλυμα TBE – Tris base/Boric acid/EDTA) στα 130V.

2.2.1.3. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR

Οι αντιδράσεις των PCR διαδοχικών αραιώσεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων είχαν ως στόχο τη μετέπειτα δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την real-time PCR. Η συσκευή real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ποσοτικής PCR, ήταν η Stratagene Mx3000P, συνοδευόμενη με το αντίστοιχο λογισμικό (MxPro software). Τα αντιδραστήρια περιέχοντας τις φωτοευαίσθητες φθορίζουσες χρωστικές ποσοτικοποίησης SYBR Green και αναφοράς ROX high fidelity, χρησιμοποιήθηκαν την κάθε φορά σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού για προστασία. Το ένζυμο της qPCR ήταν ήδη έτοιμο σε διάλυμα με το buffer και τα dNTPs (KAPA SYBR FAST qPCR kit, master mix 2x universal). Ακολουθούν ενδεικτικά για τον HPV 33, οι όγκοι των αντιδράσεων, ο αριθμός των δειγμάτων στις αντίστοιχες σειρές της συσκευής καθώς και το πρόγραμμα στο οποίο ρυθμίστηκε η real time PCR.

Πίνακας 2.4: Αύξων αριθμός θέσεων στην σειρά H της συσκευής qPCR και οι διαδοχικές αραιώσεις για τον HPV 33. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes
HPV 33 (10^{-6})	H1
HPV 33 (10^{-7})	H2
HPV 33 (10^{-8})	H3
HPV 33 (10^{-9})	H4
HPV 33 (10^{-10})	H5
(-) ddH ₂ O	H6

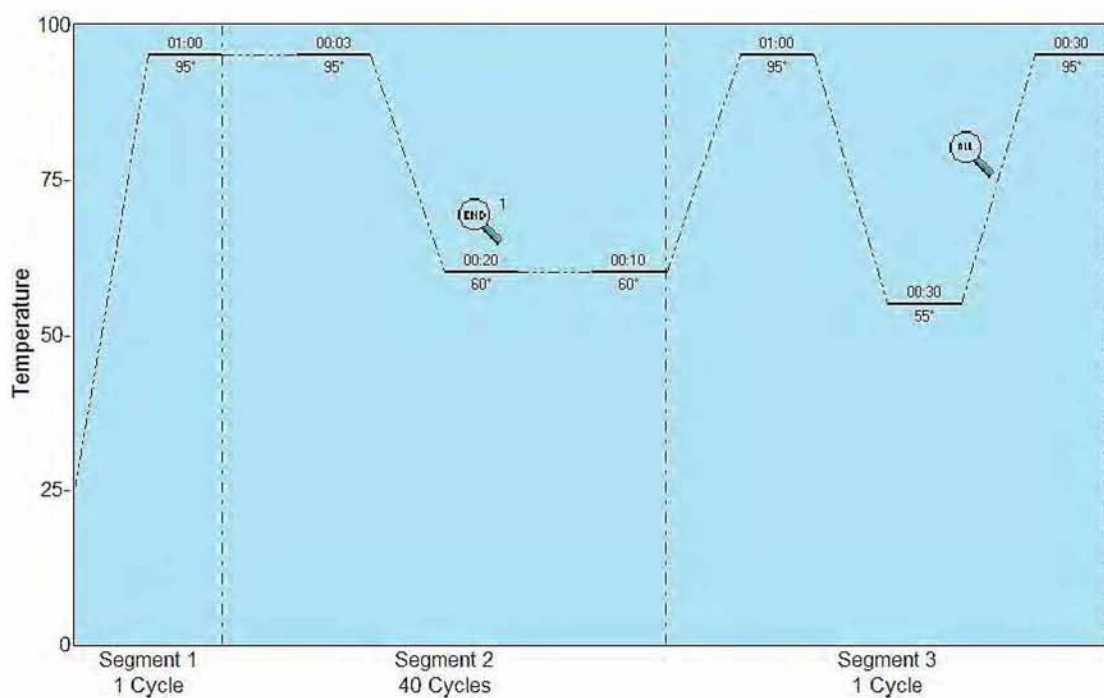
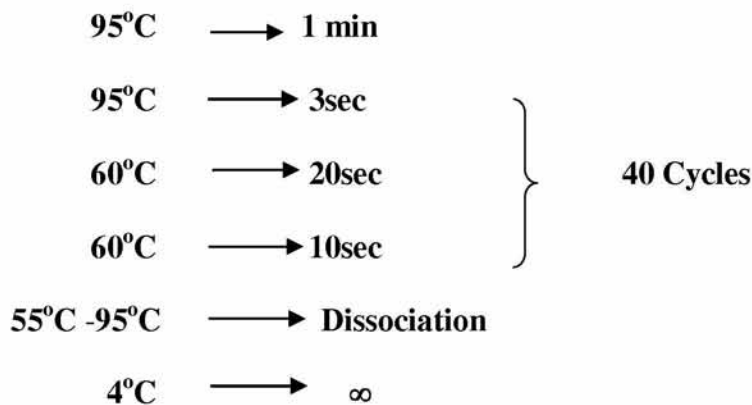
Πίνακας 2.5: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (HPV 33 L1 f/r) 10 pmol/μl	2 μl x 7 = 14 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	9,6 μl x 7 = 67,2 μl
2x Master Mix	10 μl x 7 = 70 μl
ROX high	0,4 μl x 7 = 2,8 μl

Σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκε δηλαδή ποσότητα 22 μl από το μίγμα και 3 μl από το δείγμα της αραιώσης, εκτός από το αρνητικό, στο οποίο προστέθηκε ddH₂O.

Τέλος, το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση real time PCR (Εικόνα 2.8.).

STRATAGENE



Εικόνα 2.8: Ρύθμιση του λογισμικού MxPro qPCR, σύμφωνα με το παραπάνω πρόγραμμα. Δυνατότητα επιλογής των σημείων ανίχνευσης φθορισμού. Στο παρόν, ανίχνευση στο τέλος του κάθε κύκλου και στο τέλος της αντίδρασης.

2.2.2. Δημιουργία ομάδων αντιδράσεων ποσοτικής PCR πολύπλεξης (multiplex real time PCR groups)

Έχοντας τις πρότυπες καμπύλες για τους 9 τύπους HPV, επόμενο βήμα ήταν η οργάνωσή τους σε ομάδες αντιδράσεων multiplex real-time PCR.

Το SYBR Green, καθώς και οι λοιπές μη ειδικές για την αλληλουχία χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τη real time PCR, προσδένονται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA και επομένως σε μια αντίδραση πολύπλεξης, η χρωστική είναι κοινή για όλους τους στόχους. Η διάκρισή τους όμως είναι εφικτή με βάση την απόκλιση των T_m των προϊόντων κάθε στόχου, που προκύπτει από την διαφορά στον χρόνο αποδιάταξης. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η διάκρισή τους από την συσκευή qPCR, εφόσον όμως ότι η απόκλιση των T_m είναι κατ' ελάχιστο περίπου 2°C . Πραγματοποιήθηκαν αρκετοί δοκιμαστικοί συνδυασμοί, όμως σε πολλές περιπτώσεις η διαφορά T_m ήταν μικρή και η qPCR έδινε τον μέσο όρο των απορροφήσεων δύο προϊόντων ως ένα. Επομένως, οι συγκεκριμένοι συνδυασμοί απορρίφθηκαν. Οι τελικοί συνδυασμοί που λειτούργησαν περιέλαβαν συνολικά τους 7 από τους 9 τύπους HPV (εξαιρέθηκαν οι HPV 45/58) σε 3 ομάδες αντιδράσεων πολύπλεξης (Πίνακας 2.6).

Πίνακας 2.6: Ομάδες μιγμάτων HPV στόχων για multiplex real-time PCR, θερμοκρασίες T_m και μήκος προϊόντων σε ζεύγη βάσεων.

Μίγματα	Τύποι HPV	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Μήκος προϊόντων (bp)
mixA	HPV 16	81	291
	HPV 35	79,5	227
mixB	HPV 18	82	292
	HPV 31	79,7	291
mixC	HPV 51	80,2	155
	HPV 66	82	168
	HPV 33	85,3	202

Ακολουθούν ενδεικτικά, οι όγκοι αντιδραστηρίων (22μl αντιδραστήρια + 3 μl DNA μήτρα ανά αντίδραση), ο αριθμός δειγμάτων και το πρόγραμμα της real time PCR για το mixC. Το πρόγραμμα ήταν κοινό για όλα τα μίγματα αντιδράσεων multiplex qPCR, η μόνη διαφορά ήταν οι ειδικοί εκκινητές, καθώς και ο όγκος των εκκινητών, 2μl στα μίγματα των duplex qPCR (mixA,B), έναντι 3μl στα μίγματα των triplex qPCR, mixC.

Πίνακας 2.7: Αύξων αριθμός θέσεων στην σειρά Η της συσκευής qPCR και οι επιλεγμένες αραιώσεις για τον mixC (HPV 33/51/66). Χρήση 2 κλινικών δειγμάτων για σύγκριση. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes
Control C1 (10^{-9})	H1
Control C2 (10^{-8})	H2
Control C3 (10^{-7})	H3
ATT5 (16/66/51)	H4
ATT16 (16/33)	H5
(-) ddH ₂ O	H6

Πίνακας 2.8: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (mix C) 10 pmol/μl	3 μl x 7 = 21 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	8,6 μl x 7 = 60,2 μl
2x Master Mix	10 μl x 7 = 70 μl
ROX high	0,4 μl x 7 = 2,8 μl

Τέλος, το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις multiplex qPCR.

STRATAGENE

95°C	→	1 min	}	40 Cycles
95°C	→	3sec		
60°C	→	20sec		
60°C	→	10sec		
55°C -95°C	→	Dissociation		
4°C	→	∞		

2.2.3. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα από 90 κλινικά δείγματα διαγνωσμένα θετικά για συγκεκριμένους τύπους HPV, από τα προαναφερόμενα νοσοκομεία της Ελλάδας. Η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια της διάγνωσης των τριών ομάδων

ποσοτικής PCR πολύπλεξης για τους 7 πλέον τύπους HPV, ελέγχθηκε στο σύνολο των δειγμάτων. Ως εσωτερικός θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ζεύγος εκκινητών για το GAPDH (housekeeping gene). Σε περιπτώσεις με όχι τόσο ξεκάθαρη ταυτοποίηση, πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις qPCR ενός στόχου, αντί για multiplex, για αποσαφήνιση. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της real time PCR, ελέγχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις και με μετέπειτα ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης (διάκριση ζωνών-τύπων με βάση το μήκος των προϊόντων και όχι τις θερμοκρασίες αποδιάταξης – εξαίρεση αποτέλεσε μόνο η ομάδα Β, όπου η διαφορά 1 μόνο βάσης δεν είναι ανιχνεύσιμη στην αγαρόζη).

2.2.3.1. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με multiplex real-time PCR

Τα 90 και πλέον κλινικά δείγματα ελέγχθηκαν με αντιδράσεις ποσοτικής PCR πολύπλεξης σε κάθε μία από τις ομάδες μιγμάτων για τους 7 συνολικά τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας.

Το πρόγραμμα στο οποίο ρυθμίστηκε η συσκευή Stratagene qPCR ήταν κοινό για όλες τις αντιδράσεις πολύπλεξης, όπου οι χρόνοι ήταν ελαφρά διαφοροποιημένοι από τις απλές ποσοτικές PCR για βελτιστοποιημένη αποτελεσματικότητα:

STRATAGENE

95°C	→	1 min	
95°C	→	5sec	} 40 Cycles
60°C	→	20sec	
60°C	→	15sec	
55°C -95°C	→	Dissociation	
4°C	→	∞	

Ακολουθούν ο αριθμός και η θέση των δειγμάτων της αντίδρασης και οι όγκοι των αντιδραστηρίων για ορισμένα από τα κλινικά δείγματα που ελέγχθηκαν με κάθε ομάδα στόχων HPV ξεχωριστά.

Για την ομάδα A (HPV 16/35), ακολουθούν ενδεικτικά δύο σειρές αντιδράσεων. Ως έλεγχοι, χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις πλασμιδίων Control A1 (10^{-9} , 10 αντίγραφα) και Control A2 (10^{-8} , 100 αντίγραφα).

Πίνακας 2.9: Αύξων αριθμός θέσεων κλινικών δειγμάτων στις σειρές G & H της συσκευής qPCR και επιλεγμένες αραιώσεις για τον mixA (HPV 16/35) ως θετικοί μάρτυρες. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes	DNA	Tubes
ΠΝΛ9	G1	2186	H1
2209	G2	ΠΝΛ8	H2
2121	G3	ΠΝΛ5	H3
2148	G4	ΠΝΛ6	H4
2127	G5	ΠΝΛ7	H5
2216	G6	Control A2 (10^{-8})	H6
Control A1 (10^{-9})	G7	(-) ddH ₂ O	H7
(-) ddH ₂ O	G8		

Πίνακας 2.10: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (mix A) 10 pmol/μl	2 μl x 16 = 32 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	9,6 μl x 16 = 153,6 μl
2x Master Mix	10 μl x 16 = 160 μl
ROX high	0,4 μl x 16 = 6,4 μl

Επίσης, για την ομάδα B (HPV 18/31), ακολουθούν ενδεικτικά δύο σειρές αντιδράσεων. Ως έλεγχοι, χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις πλασμιδίων Control B1 (10^{-9} , 10 αντίγραφα) και Control B2 (10^{-8} , 100 αντίγραφα).

Πίνακας 2.11: Αύξων αριθμός θέσεων κλινικών δειγμάτων στις σειρές G & H της συσκευής qPCR και επιλεγμένες αραιώσεις για τον mixB (HPV 18/31) ως θετικοί μάρτυρες. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes	DNA	Tubes
ΠINA11	G1	ΠINA32	H1
ΠINA24	G2	ΠINA33	H2
ΠINA25	G3	ATT11	H3
ΠINA37	G4	ATT84	H4
ΠINA38	G5	ATT99	H5
ΠINA39	G6	Control B2 (10^{-8})	H6
Control B1 (10^{-9})	G7	(-) ddH ₂ O	H7
(-) ddH ₂ O	G8		

Πίνακας 2.12: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (mix B) 10 pmol/μl	2 μl x 16 = 32 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	9,6 μl x 16 = 153,6 μl
2x Master Mix	10 μl x 16 = 160 μl
ROX high	0,4 μl x 16 = 6,4 μl

Όμοια και για την ομάδα C (HPV 33/51/66), ακολουθούν ενδεικτικά δύο σειρές αντιδράσεων. Ως έλεγχοι, χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις πλασμιδίων Control C1 (10^{-9} , 10 αντίγραφα) και Control C2 (10^{-8} , 100 αντίγραφα).

Πίνακας 2.13: Αύξων αριθμός θέσεων κλινικών δειγμάτων στις σειρές F & G της συσκευής qPCR και επιλεγμένες αραιώσεις για τον mixC (HPV 33/51/66) ως θετικοί μάρτυρες. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes	DNA	Tubes
3025	F1	3107	G1
3062	F2	3246	G2
3235	F3	3260	G3
3236	F4	ATT83	G4
3257	F5	ATT85	G5
3289	F6	ATT78	G6
Control C1 (10^{-9})	F7	Control C2 (10^{-8})	G7
(-) ddH ₂ O	F8	(-) ddH ₂ O	G8

Πίνακας 2.14: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (mix C) 10 pmol/μl	3 μl x 17 = 51 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	8,6 μl x 17 = 146,2 μl
2x Master Mix	10 μl x 17 = 170 μl
ROX high	0,4 μl x 17 = 6,8 μl

2.2.3.2. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη

Η διάκριση και η ταυτοποίηση των 7 τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας δεν ήταν εφικτή σε όλα τα κλινικά δείγματα με απόλυτη βεβαιότητα, επομένως η εγκυρότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου επαληθεύτηκε και ενισχύθηκε αφενός μεν με μονές αντιδράσεις real-time PCR με ειδικούς εκκινητές για έναν τύπο ανά δείγμα και αφετέρου με την κλασική ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης. Έγινε ποιοτικός έλεγχος δηλαδή σε περιπτώσεις χαμηλής έντασης φθορισμού (ύπαρξη ή μη ζώνης στο πήκτωμα) ή σε διπλο/τριπλο-θετικά δείγματα (διάκριση πολλαπλών ζωνώσεων με βάση το μήκος των προϊόντων με εξαίρεση την ομάδα Β, όπου τα προϊόντα διέφεραν μόνο κατά μία βάση).

Με αυτή την απλή λογική ηλεκτροφορήθηκαν όλες οι αντιδράσεις ποσοτικής PCR πολύπλεξης (ή μονής) σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (σε διάλυμα TBE), στα 130V.

2.2.4. Ποσοτικοποίηση κλινικών δειγμάτων με real-time PCR

Η εγκυρότητα, η αξιοπιστία, η διακριτική ικανότητα και τελικά η επιτυχία της μεθόδου των 3 ομάδων multiplex qPCR, ελέγχθηκε και ενισχύθηκε με επανάληψη μονών real-time PCR ανά περίπτωση και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε όλα τα κλινικά δείγματα. Πολύ σημαντικός όμως ήταν και ο έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου στα κλινικά δείγματα. Αυτό πραγματοποιήθηκε με μονές

real-time PCR για στόχους ήδη γνωστών θετικών δειγμάτων με παράλληλη χρήση πρότυπης καμπύλης. Οι πρότυπες καμπύλες που είχαν ήδη δημιουργηθεί με βάση τις διαδοχικές αραιώσεις, επαναλήφθηκαν μαζί με αντιδράσεις κλινικών δειγμάτων για ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων και υπολογισμού της σχετικής ευαισθησίας της μεθόδου. Χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα κλινικά δείγματα από το σύνολο των θετικών δειγμάτων για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου. Για τον σχετικό υπολογισμό της αρχικής ποσότητας αντιγράφων στο κλινικό δείγμα, σημαντικός παράγοντας είναι ο ουδικός κύκλος αντίδρασης (C_T - Threshold Cycle), όπως προαναφέρθηκε, δηλαδή ο κύκλος στον οποίο αρχίζει να εμφανίζεται αξιολογήσιμο ποσό φθορισμού (εξαρτάται από το κατώφλι που απορρίπτει φθορισμό αμελητέας ποσότητας ή φθορισμό που οφείλεται σε θόρυβο και όχι σε ειδικό σήμα και ορίζεται συνήθως εμπειρικά, αν και το λογισμικό προτείνει αυτόματα μια τιμή).

Ενδεικτικά, αναφέρονται οι θέσεις των δειγμάτων στην συσκευή real-time και οι όγκοι των αντιδραστηρίων, για δείγματα θετικά είτε στον HPV 51, είτε στον τύπο 33, δηλαδή τους δύο εκ των τριών τύπων της ομάδας μιγμάτων C. Ακολουθεί αρχικά το πρόγραμμα, στο οποίο ρυθμίστηκε η συσκευή qPCR:

STRATAGENE

95°C	→	1 min	}	40 Cycles
95°C	→	3sec		
60°C	→	20sec		
60°C	→	10sec		
55°C -95°C	→	Dissociation		
4°C	→	∞		

Στην συνέχεια, ακολουθούν οι όγκοι των αντιδράσεων (όπως σε όλες τις αντιδράσεις το DNA-μήτρα ήταν 3 μl, ενώ ο όγκος των αντιδραστηρίων 22 μl ανά αντίδραση, όπως σε κάθε αντίδραση real-time PCR).

Πίνακας 2.15: Όγκοι αντιδραστηρίων για το μίγμα της αντίδρασης. Υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων αυξημένος τουλάχιστον κατά ένα για ασφάλεια.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ζεύγος εκκινητών (HPV 33 ή 51) 10 pmol/μl	1 μl x 10 = 10 μl
ddH ₂ O (nuclease free)	10,6 μl x 10 = 106 μl
2x Master Mix	10 μl x 10 = 100 μl
ROX high	0,4 μl x 10 = 4 μl

Στην συγκεκριμένη περίπτωση προετοιμάστηκαν δύο μίγματα αντιδράσεων, ένα για κάθε τύπο (HPV 33 ή 51), με μοναδική διαφορά το ζεύγος ειδικών εκκινητών.

Τέλος, ακολουθούν τα αντίστοιχα κλινικά δείγματα και οι αραιώσεις που επιλέχθηκαν:

Πίνακας 2.16: Αύξων αριθμός θέσεων κλινικών δειγμάτων στις σειρές F, G & H της συσκευής qPCR και διαδοχικές αραιώσεις για τον HPV 33 και 51 για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης. Τελευταίος ο αρνητικός έλεγχος με καθαρό ύδωρ.

DNA	Tubes	DNA	Tubes	DNA	Tubes
ATT101	F1	HPV 51 (10^{-5})	G1	HPV 33 (10^{-5})	H1
ΠINA22	F2	HPV 51 (10^{-6})	G2	HPV 33 (10^{-6})	H2
ATT5	F3	HPV 51 (10^{-7})	G3	HPV 33 (10^{-7})	H3
ATT94	F4	HPV 51 (10^{-8})	G4	HPV 33 (10^{-8})	H4
ΠINA101	F5	HPV 51 (10^{-9})	G5	HPV 33 (10^{-9})	H5
(-) ddH ₂ O	F6	HPV 51 (10^{-10})	G6	HPV 33 (10^{-10})	H6
		(-) ddH ₂ O	G7	(-) ddH ₂ O	H7

Στο κάθε μικροσωληνάριο των κλινικών δειγμάτων προστέθηκε το ειδικό ζεύγος εκκινητών για τον τύπο που είχε ήδη διαγνωσθεί ως θετικό, για υπολογισμό της αρχικής ποσότητας αντιγράφων και επομένως της ευαισθησίας της μεθόδου, σύμφωνα με τις πρότυπες καμπύλες και τον ουδικό κύκλο της αντίδρασης (C_T).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

3.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου L1 των υψηλής επικινδυνότητας τύπων HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της ανάπτυξης multiplex real-time PCR για τους 9 τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας, προηγήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου L1 του κάθε τύπου σε βακτηριακούς πλασμιδιακούς φορείς pGEM με τις κλασικές μεθόδους κλωνοποίησης νουκλεϊκών οξέων σε βακτηριακά στελέχη, τα οποία μετασχηματίστηκαν με χημική μέθοδο, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2. Η επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης επαληθεύτηκε με την τελική αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα βάση σχεδιασμού του ανασυνδυασμού.

3.2. Ανάπτυξη Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πολύπλεξης, πραγματικού χρόνου (multiplex Real-time PCR) για την ανίχνευση τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ποσοτικών PCR πολύπλεξης που θα ανιχνεύουν τους 9 τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας. Πραγματοποιήθηκαν για αυτό τον σκοπό πειράματα για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR, δοκιμές ελέγχου συνδυασμών τύπων HPV για την διάκριση των τύπων σε κλινικά δείγματα, πειράματα ελέγχου αποτελεσματικότητας ανίχνευσης της μεθόδου σε περισσότερα από 90 κλινικά δείγματα και τέλος πειράματα ελέγχου της ευαισθησίας της μεθόδου, με ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων HPV στα κλινικά δείγματα. Ακολουθούν τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων.

3.2.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Το πρώτο μέρος της ανάπτυξης της μεθόδου περιελάμβανε την δημιουργία πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR, για τον κάθε τύπο HPV.

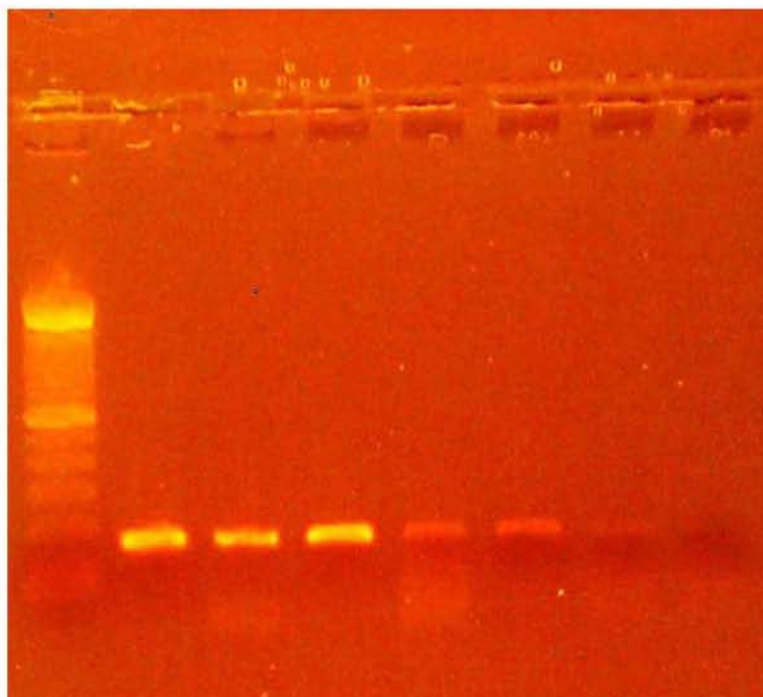
Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν όπως αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 2, διαδοχικές αραιώσεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, αντίδραση PCR των αραιώσεων και έλεγχος με ηλεκτροφόρηση και τέλος αντίδραση real-time PCR των διαδοχικών αραιώσεων για κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

3.2.1.1. Αντιδράσεις PCR των διαδοχικών αραιώσεων

Το πρώτο τμήμα της δημιουργίας πρότυπης καμπύλης περιελάμβανε αντιδράσεις PCR διαδοχικών αραιώσεων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για κάθε τύπο HPV. Με αυτόν τον τρόπο θα ελέγχονταν οι διαδοχικές αραιώσεις ποιοτικά και ημι-ποσοτικά. Ο ποσοτικός έλεγχος ήταν ουσιαστικά σύγκριση σχετικών εντάσεων των ζωνώσεων στη μετέπειτα ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της κάθε αντίδρασης.

3.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Όλες οι αντιδράσεις PCR των διαδοχικών αραιώσεων για τον κάθε τύπο HPV, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφηκε και στην αντίστοιχη ενότητα του κεφαλαίου 2. Όλα τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσαν την ορθότητα των αντιδράσεων, καθώς ήταν τα αναμενόμενα. Ενδεικτικά, για τον τύπο HPV 33 (πίνακας 2.2), η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης ήταν η ακόλουθη (Εικόνα 3.1).

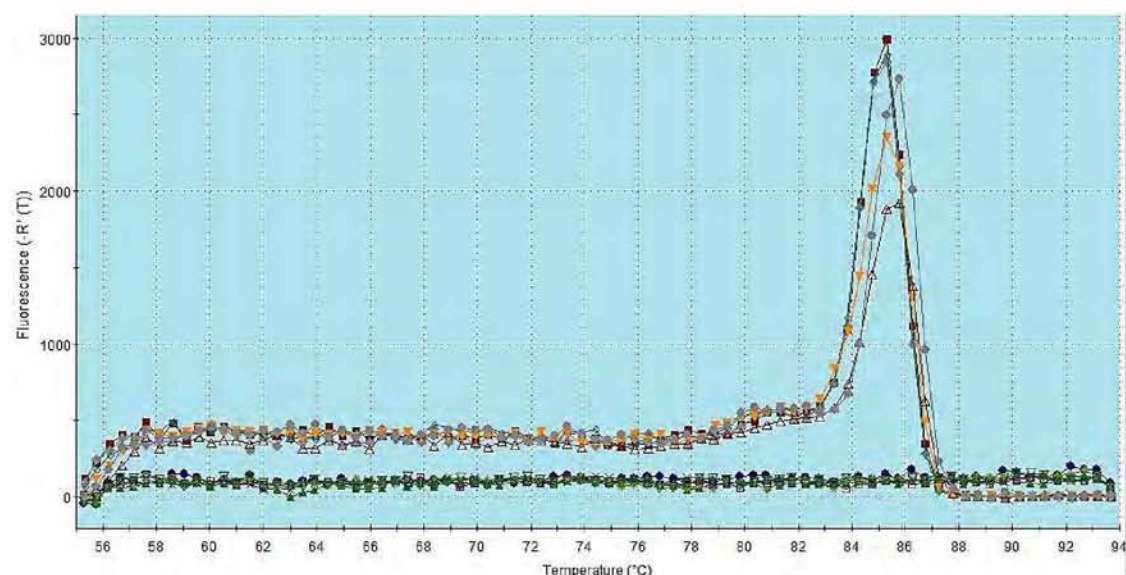


Εικόνα 3.1: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης 2%, με τα προϊόντα PCR από ανασυνδυασμένα πλασμίδια με HPV 33 L1, σε διαδοχικές αραιώσεις (φθίνουσα σειρά). Στην πρώτη διαδρομή είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (κατώτερη ζώνη 100 bp, αυξάνει ανά 100 έως την πρώτη έντονη ζώνη 600), ενώ στην τελευταία ο αρνητικός έλεγχος της PCR (ddH₂O).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1, οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται ευθυγραμμισμένες στο ίδιο ύψος, οι σχετικές εντάσεις τους εμφανίζουν γενικά κλιμάκωση, ενώ δεν υπάρχουν παραπροϊόντα, ούτε κάποια επιμόλυνση (στον αρνητικό έλεγχο διακρίνονται χαμηλά μόνο οι εκκινητές). Ο χρωματισμός των εικόνων πηκτώματος αγαρόζης οφείλεται στο ειδικό φίλτρο που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία της πλάκας UV, ώστε να φωτογραφηθεί το πήκτωμα.

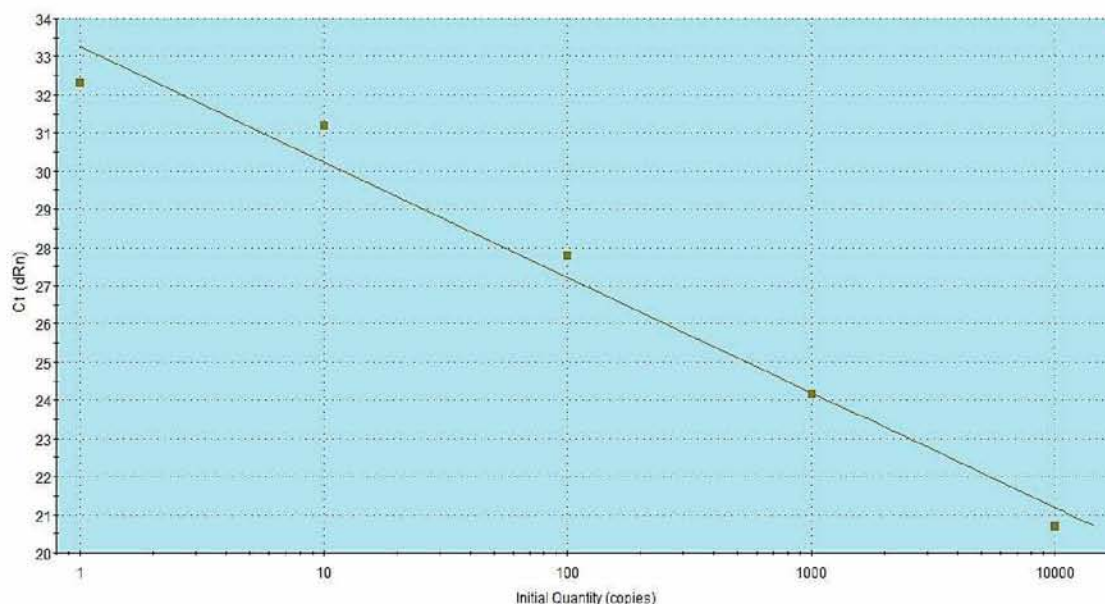
3.2.1.3. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης στην real-time PCR

Έπειτα από την αρχική επιβεβαίωση των αντιδράσεων PCR των διαδοχικών αραιώσεων, ακολούθησαν αντιδράσεις real-time PCR για τον κάθε τύπο HPV, με στόχο τους μετέπειτα ελέγχους και ποσοτικοποιήσεις των κλινικών δειγμάτων. Η συσκευή real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ποσοτικής PCR, όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 2, ήταν η Stratagene Mx3000P, συνοδευόμενη με το αντίστοιχο λογισμικό (MxPro software). Το λογισμικό αποθηκεύει τις απορροφήσεις για τον κάθε κύκλο της αντίδρασης και τις απεικονίζει σε γράφημα. Ενδεικτικά, για τον HPV 33 (σειρά φόρτωσης αντιδράσεων στη συσκευή real-time PCR, Πίνακας 2.4.), ακολουθεί η καμπύλη αποδιάταξης (Εικόνα 3.2) και η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2: Καμπύλη αποδιάταξης των αντιδράσεων qPCR διαδοχικών αραιώσεων HPV33 ($T_m \sim 85,3$), από το πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR.

Επιλέχθηκαν όλες οι διαδοχικές αραιώσεις HPV33, για την απεικόνιση της καμπύλης αποδιάταξης. Οι κορυφές συγκλίνουν στην ίδια θερμοκρασία T_m (~85,3 για τον HPV33), όπως ήταν αναμενόμενο.



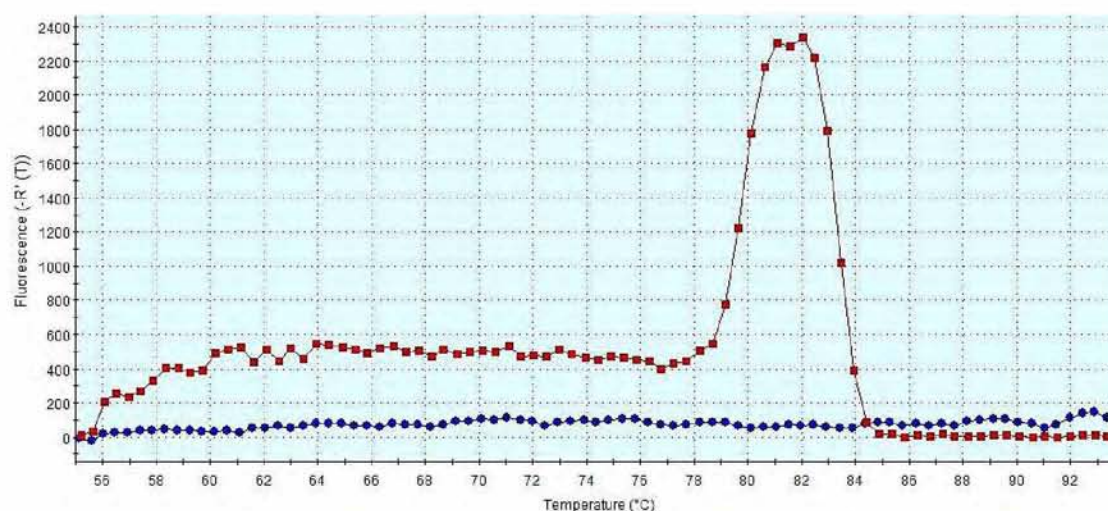
Εικόνα 3.3: Πρότυπη καμπύλη των αντιδράσεων qPCR των διαδοχικών αραιώσεων του HPV33 στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η μεταβλητή Ct (συδικός κύκλος), ενώ στον οριζόντιο άξονα υπολογίζεται ο αρχικός αριθμός αντιγράφων, σύμφωνα με τον Ct και την τελική απορρόφηση.

Οι επιλεγμένες οι θέσεις φόρτωσης των αντιδράσεων των διαδοχικών αραιώσεων, δίνουν την πρότυπη καμπύλη στον δισδιάστατο πίνακα του λογισμικού της qPCR. Τα 5 σημεία (5 επιλεγμένες αραιώσεις) που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, τοποθετούνται στην αρχική συγκέντρωση από 1 (αραίωση 10-10) έως και 10.000 (αραίωση 10-6) αντίγραφα. Με την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης για τον κάθε τύπο HPV ήταν εφικτή η μετέπειτα ποσοτικοποίηση των ιικών αντιγράφων (κι επομένως έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου), στα κλινικά δείγματα.

3.2.2. Δημιουργία ομάδων αντιδράσεων ποσοτικής PCR πολύπλεξης (multiplex real time PCR groups)

Έχοντας τις πρότυπες καμπύλες για τους 9 τύπους HPV, πραγματοποιήθηκαν πειράματα δοκιμών συνδυασμού, για την οργάνωσή τους σε ομάδες αντιδράσεων multiplex real-time PCR.

Θεωρητικά, διάκριση των προϊόντων σε multiplex qPCR με μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. SYBR Green), είναι εφικτή μέσω των θερμοκρασιών αποδιάταξης, εφόσον διαφέρουν μεταξύ τους κατά τουλάχιστον 2 °C περίπου. Δοκιμάστηκαν ποικίλοι συνδυασμοί των 9 τύπων, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις η διάκριση δεν ήταν εφικτή, καθώς το λογισμικό απέδιδε μία κορυφή αποδιάταξης, η οποία βρισκόταν στο ενδιάμεσο των αναμενόμενων κορυφών T_m (δηλαδή ο μέσος όρος των απορροφήσεων). Συχνά, η κορυφή σχημάτιζε ένα ψευδοπλατώ μεταξύ των δύο T_m. Ενδεικτικά, απεικονίζεται το παράδειγμα συνδυασμού των HPV 45 και 58 (που απορρίφθηκαν), με αναμενόμενα T_m 80,6 και 82,1, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4).



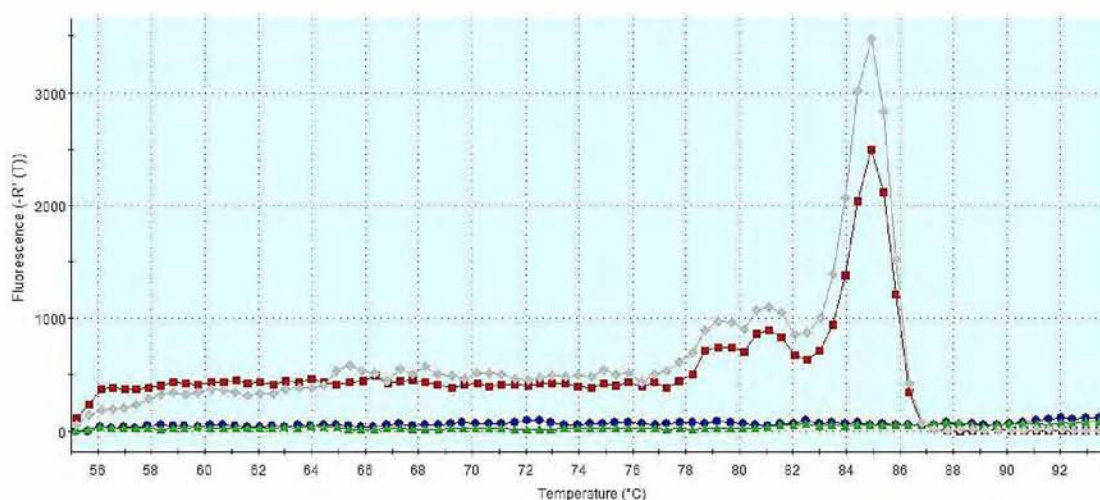
Εικόνα 3.4: Καμπύλη αποδιάταξης επιλεγμένης αραιώσης εκ των αντιδράσεων multiplex qPCR των HPV 45 (T_m ~80,6) και 58 (T_m ~82,1) στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Η διαφορά ~1,5 °C στις θερμοκρασίες αποδιάταξης των δύο τύπων HPV δεν ήταν αρκετή για την διάκρισή τους με τις συγκεκριμένες συνθήκες. Η καμπύλη αποδιάταξης σχηματίζεται από την τελική απορρόφηση φθορισμού από την συσκευή qPCR, μετά το πέρας όλων των κύκλων των αντιδράσεων. Επηρεάζεται από την ταχύτητα μεταβολής της θερμοκρασίας και τον χρόνο ανίχνευσης φθορισμού (ramp rate). Δυστυχώς οι συσκευές Stratagene qPCR Mx3005P και Mx3000P δεν έχουν δυνατότητα παραμετροποίησης της ταχύτητας μεταβολής θερμοκρασίας σε αντίθεση με το νεότερο μοντέλο της εταιρείας Stratagene qPCR Mx5000P, το οποίο όμως κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων δεν ήταν διαθέσιμο. Η μέγιστη ταχύτητα, θεωρητικά, για την παρούσα συσκευή (Mx3005P) είναι 2.5°C/sec, όμως αν ήταν

εφικτή η παραμετροποίησή της, ενδεχομένως να ήταν δυνατή η διάκριση των συγκεκριμένων T_m .

Οι τελικοί συνδυασμοί με τους υπόλοιπους 7 τύπους HPV, που χρησιμοποιήθηκαν για τα μετέπειτα πειράματα, ήταν οι τρεις που αναφέρονται στον πίνακα 2.6. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ομάδα της τριπλής ποσοτικής PCR (mixC) και τους τύπους HPV 33, 51, 66 (T_m 85,3, 80,2 & 82, αντίστοιχα), όπως φορτώθηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 2.7.

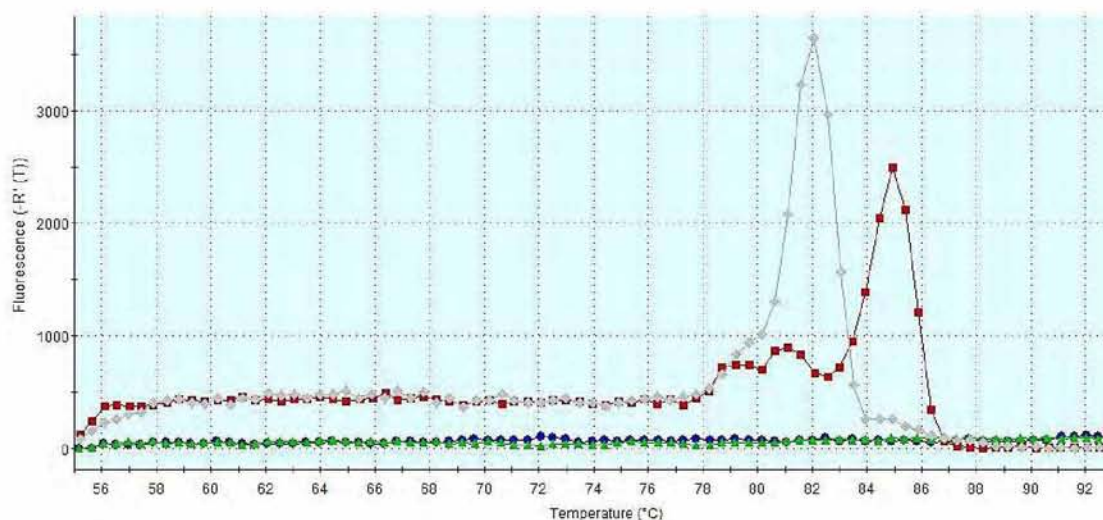
Στην Εικόνα 3.5, επιλέχθηκαν οι δύο εκ των τριών αραιώσεων του mixC, χάριν απλούστευσης για την καμπύλη αποδιάταξης.



Εικόνα 3.5: Καμπύλη αποδιάταξης δύο επιλεγμένων αραιώσεων των αντιδράσεων multiplex qPCR των HPV 33 (T_m ~85,3), 51 (T_m ~79,5) και 66 (T_m ~81) στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Η καμπύλη αποδιάταξης του mixC, καθώς και των άλλων δύο που χρησιμοποιήθηκαν, δείχνει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα της μεθόδου, μεταξύ των διαφορετικών T_m . Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε το φαινόμενο ανταγωνισμού ενίσχυσης αλληλουχίας στο σύνολο των περιπτώσεων, δηλαδή η αυξημένη ενίσχυση ενός στόχου έναντι των υπολοίπων σε μια αντίδραση PCR πολύπλεξης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως το φαινόμενο του ανταγωνισμού μεταβάλλεται με την ίση μεταβολή συγκέντρωσης των πλασμιδίων και σε ορισμένες περιπτώσεις αντιστρέφεται. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το προϊόν της αντίδρασης με την υψηλότερη τιμή T_m , ενισχύεται όλο και περισσότερο σε βάρος των υπολοίπων, όσο

αυξάνεται η συγκέντρωση των πλασμιδίων στο μίγμα, ενώ σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, ενισχύεται περίπου το ίδιο με τα υπόλοιπα. Το φαινόμενο του ανταγωνισμού πάντως δεν επηρεάζει, όπως φαίνεται την διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Στην Εικόνα 3.6, γίνεται ένας πρωταρχικός έλεγχος του mixC σε κλινικά δείγματα (παρουσιάζεται μόνο το πρώτο χάρην απλούστευσης).



Εικόνα 3.6: Καμπύλη αποδιάταξης επιλεγμένης αραιώσης (κόκκινη) mixC (HPV 33, 51 & 66) και του κλινικού δείγματος (γκρί) ATT5 (θετικό για HPV 16/51/66) στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Το κλινικό δείγμα ATT5 ήταν θετικό, σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα, για τους τύπους HPV 16, 51 και 66. Ο τύπος 16 δεν ανιχνεύεται με το mixC και επομένως δεν αναμενόταν κορυφή. Για τους τύπους 51 και 66, όμως για τους οποίους είναι ειδικό το συγκεκριμένο μίγμα, παρατηρήθηκαν αντίστοιχες κορυφές, συγκρινόμενες με την επιλεγμένη αραιώση του mixC. Παρόλα αυτά, όμως, παρατηρήθηκε το φαινόμενο του ανταγωνισμού, όπως και στα μίγματα ελέγχου, με αποτέλεσμα το προϊόν με υψηλότερο T_m , να αποδίδει σημαντικά υψηλότερη κορυφή συγκριτικά με το άλλο προϊόν. Η διάκριση δηλαδή, της ύπαρξης των δύο κορυφών ήταν εφικτή, όμως, λόγω του ανταγωνισμού, δεν ήταν δυνατή η άμεση ποσοτικοποίηση του κάθε τύπου στο κλινικό δείγμα. Ακολούθησαν αντιδράσεις ποσοτικής PCR πολύπλεξης για περισσότερα από 90 κλινικά δείγματα για καλύτερο έλεγχο της μεθόδου.

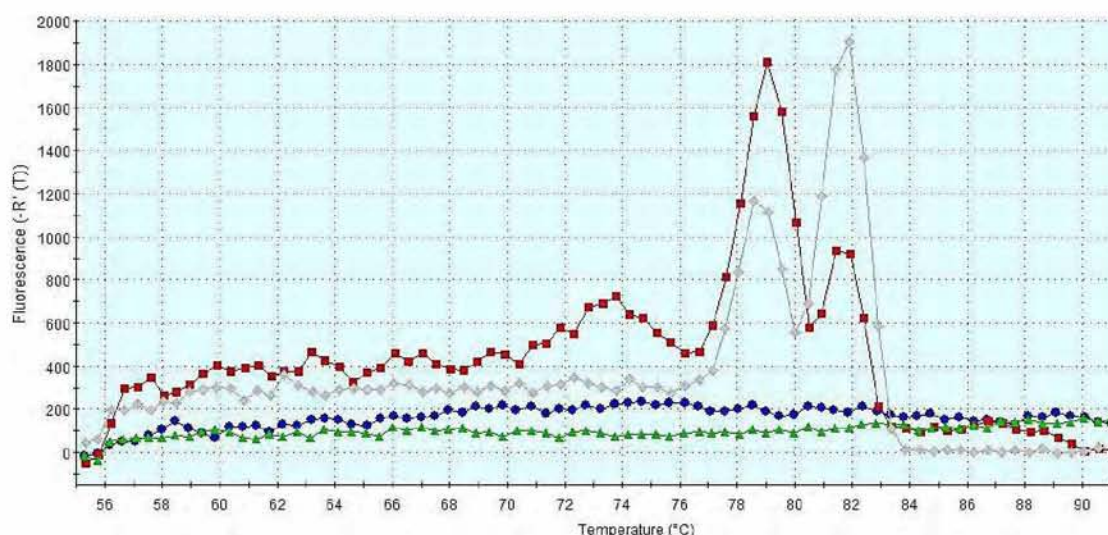
3.2.3. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων

Όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 2, επιλέχθηκαν κλινικά δείγματα διαγνωσμένα θετικά για συγκεκριμένους τύπους HPV, από διαφορετικά νοσοκομεία της Ελλάδας. Για τα κλινικά δείγματα, εφαρμόστηκαν οι 3 ομάδες ποσοτικής PCR πολύπλεξης, πραγματοποιήθηκαν, ανά περίπτωση, επαναληπτικές μεμονωμένες qPCR και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλων των αντιδράσεων σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.3.1. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με multiplex real-time PCR

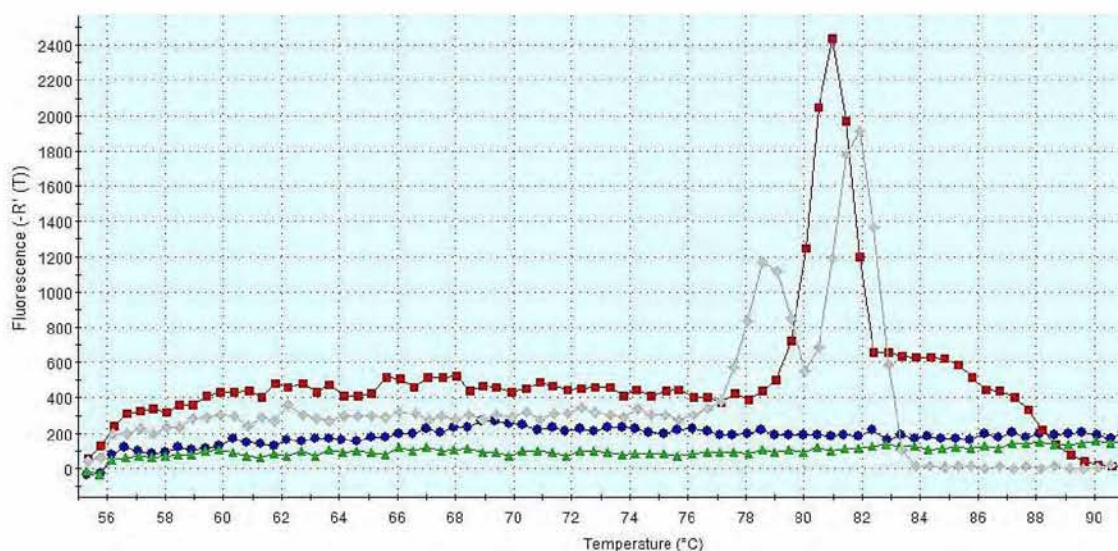
Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν διαγνωστεί θετικά για συγκεκριμένους τύπους HPV και επομένως, ελέγχθηκαν με αντιδράσεις ποσοτικής PCR πολύπλεξης, με την κατάλληλη ομάδα που στόχευε τον έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας. Στο κεφάλαιο 2 αναφέρθηκαν ενδεικτικά παραδείγματα αντιδράσεων για την κάθε ομάδα αντίδρασης πολύπλεξης και εδώ παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

Για την ομάδα A (HPV 16/35), τα κλινικά δείγματα, οι αραιώσεις και ο αρνητικός έλεγχος φορτώθηκαν στην συσκευή qPCR σύμφωνα με τον Πίνακα 2.9. Ακολουθεί η καμπύλη αποδιάταξης για επιλεγμένα δείγματα και θετικούς ελέγχους.



Εικόνα 3.7: Καμπύλη αποδιάταξης των δύο θετικών ελέγχων Control A1 (κόκκινο) & A2 (γκρι), (αραιώσεις mixA (HPV 16, 35) 10^{-9} & 10^{-8} , αντίστοιχα), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

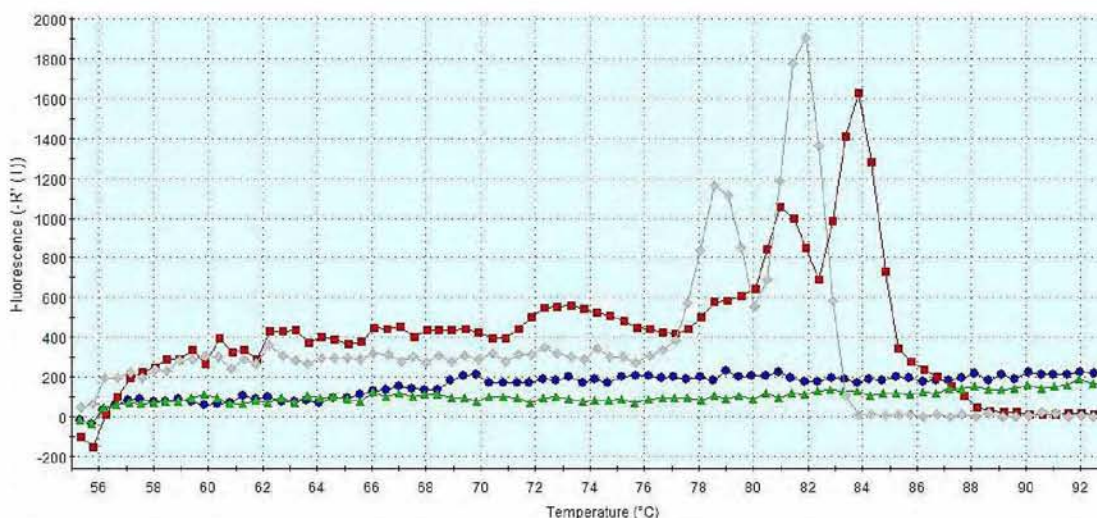
Στην Εικόνα 3.7, με τις καμπύλες αποδιάταξης δύο διαφορετικών αραιώσεων του μίγματος A, παρατηρείται το φαινόμενο του ανταγωνισμού, όπως περιγράφηκε παραπάνω, όπου η μεταβολή συγκεντρώσεων μπορεί να αναστρέψει πλήρως την ενίσχυση του ενός τύπου έναντι των υπολοίπων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση (όπως παρατηρήθηκε και στο σύνολο), η αύξηση της συγκέντρωσης συνεπάγεται ενίσχυση του στόχου με το υψηλότερο T_m, σε βάρος του άλλου. Για αυτόν τον σκοπό, στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR πολύπλεξης, χρησιμοποιήθηκαν, παράλληλα, περισσότερες της μιας αραιώσεις πλασμιδίων για θετικό έλεγχο.



Εικόνα 3.8: Καμπύλη αποδιάταξης του κλινικού δείγματος 2216 (κόκκινο), θετικού για HPV 16 (T_m ~81) και ενός θετικού ελέγχου για το mixA, Control A2 (γκρι), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Στην Εικόνα 3.8, έγινε σύγκριση του θετικού ελέγχου με επιλεγμένο κλινικό δείγμα, το οποίο είχε ήδη διαγνωσθεί ως θετικό για HPV 16. Το αναμενόμενο T_m για τον συγκεκριμένο τύπο, ήταν περίπου 81 °C, όμως παρατηρήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων, απόκλιση των κορυφών τους από τις αντίστοιχες του θετικού ελέγχου κατά περίπου 0,5 °C. Οι κορυφές του θετικού ελέγχου, εμφανίζουν μια μικρή μετατόπιση σε υψηλότερες θερμοκρασίες συγκριτικά με τα κλινικά δείγματα. Ενδεχομένως, με την δυνατότητα αύξησης της ταχύτητας μεταβολής θερμοκρασίας της συσκευής (π.χ. στο νεότερο μοντέλο Mx5000P), η μετατόπιση να περιοριζόταν στο ελάχιστο, καθώς και να βελτιωνόταν η διάκριση κοντινών κορυφών (όπως π.χ. στους τύπους HPV 45, 58 που απορρίφθηκαν για τον συγκεκριμένο λόγο). Η

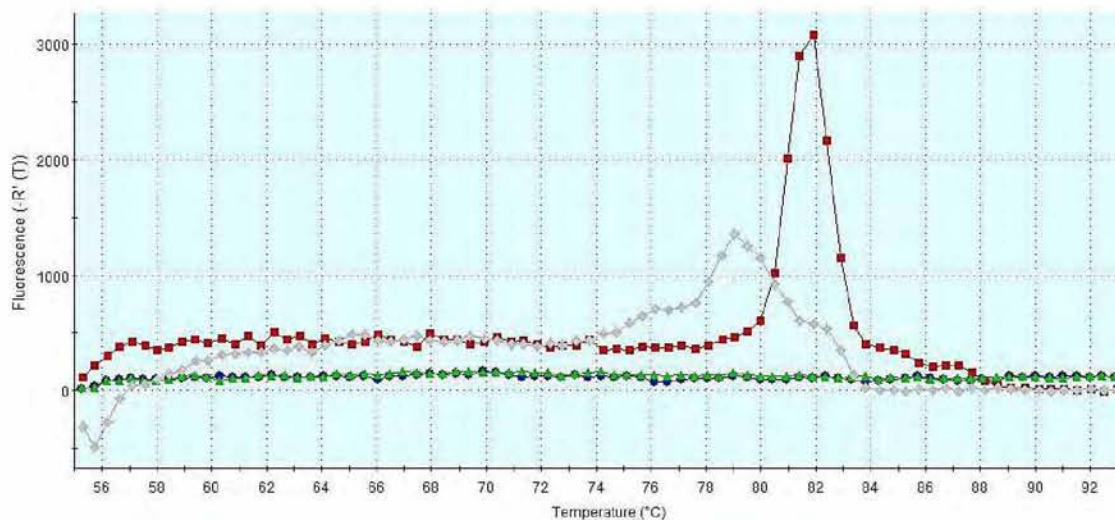
διάκριση όμως στις 3 ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρεάστηκε γενικά από αυτή τη μετατόπιση, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων, στις οποίες οι τύποι αποσαφηνίστηκαν κατά την μετέπειτα ηλεκτροφόρηση ή με επανάληψη απλής qPCR για τον συγκεκριμένο τύπο HPV.



Εικόνα 3.9: Καμπύλη αποδιάταξης του κλινικού δείγματος ΠΙΝΑ9 (κόκκινο), θετικού για HPV 16 ($T_m \sim 81$) & 35 ($T_m \sim 79$) και ενός θετικού ελέγχου για το mixA, Control A2 (γκρι), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

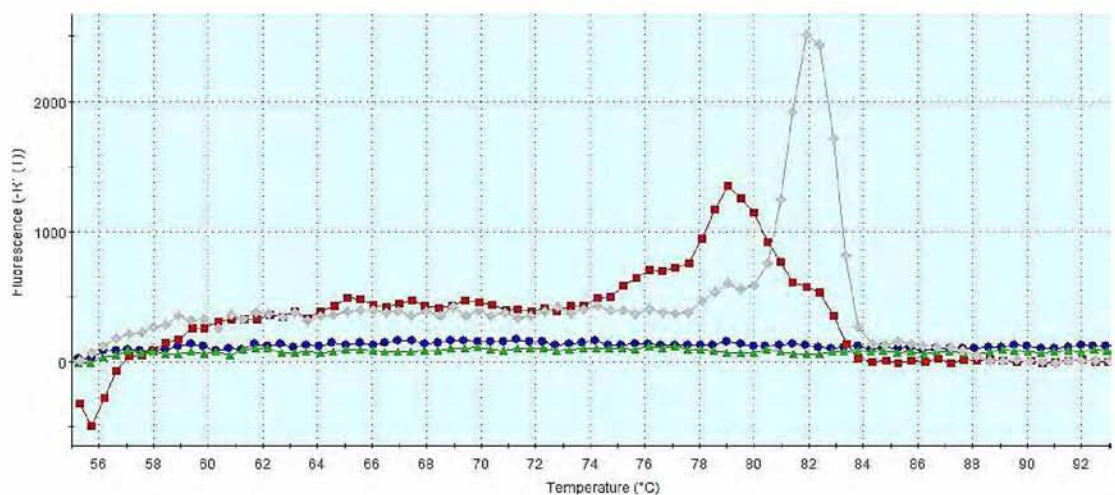
Στην Εικόνα 3.9, συγκρίνεται κλινικό δείγμα διπλοθετικό για HPV 16/35 με τον ίδιο θετικό έλεγχο της ομάδας A. Διακρίνονται τρεις κορυφές συνολικά στο δείγμα, από τις οποίες οι δύο συμπίπτουν με τις αντίστοιχες των τύπων 16 και 35 του θετικού ελέγχου. Αξίζει να σημειωθεί πως η κορυφή που αντιστοιχεί στον τύπο 35 (~ 79 °C), εμφάνισε χαμηλό φθορισμό, ελάχιστα ανώτερο του αναμενόμενου θορύβου. Η τελευταία κορυφή αν και δεν αντιστοιχεί σε κάποιο τύπο (πιθανά παραπροϊόν ή artifact της συγκεκριμένης τεχνολογίας που εμφανίζεται συχνά σε προϊόντα άνω των 100 bp, λόγω του ποσοστού G/C και συγκέντρωσής τους σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας που μεταβάλουν την σταθερότητα και επομένως την θερμοκρασία αποδιάταξης), σε άλλη περίπτωση θα μπορούσε να προκαλέσει σύγχυση εφόσον ήταν πλησίον κάποιου T_m στόχου. Σε περιπτώσεις αμφιβολίας, επαναλήφθηκαν μονές qPCR σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση. Ομοιοτρόπως, αξιολογήθηκαν κι οι υπόλοιπες αντιδράσεις. Ακολουθούν παραδείγματα και για τις άλλες δύο ομάδες.

Για την ομάδα B (18/31) ακολουθούν 2 αποτελέσματα δειγμάτων του Πίνακα 2.11.



Εικόνα 3.10: Καμπύλη αποδιάταξης του κλινικού δείγματος ΠΝΛ39 (κόκκινο), θετικού για HPV 18 ($T_m \sim 82$) και ενός θετικού ελέγχου για το mixB, Control B1 (γκρι), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα η ποσότητα φθορισμού που ανιχνεύθηκε, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

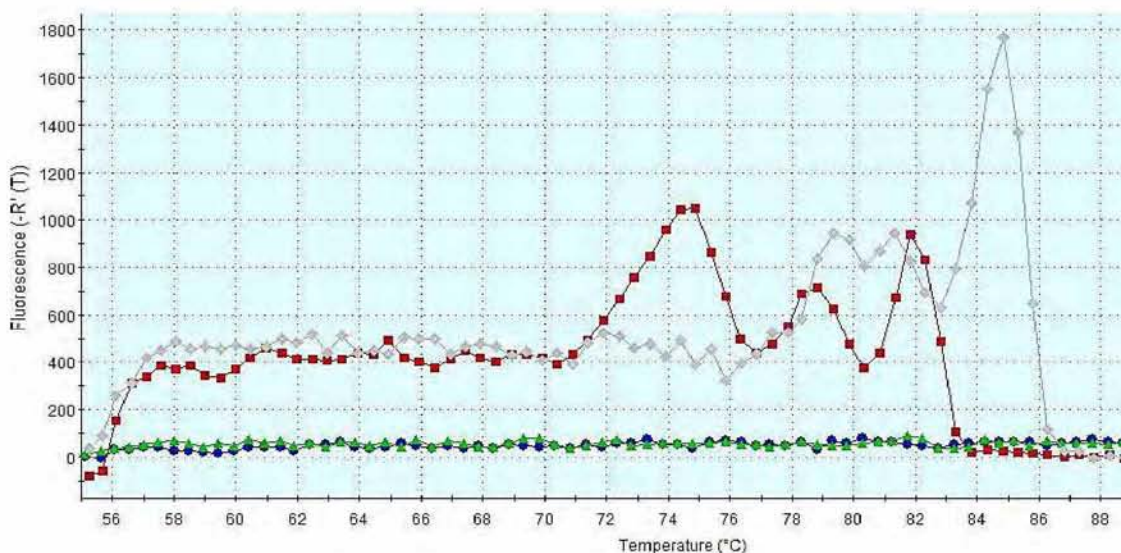
Στην Εικόνα 3.10, είναι επίσης ορατό το φαινόμενο του ανταγωνισμού στον θετικό έλεγχο. Στην συγκεκριμένη αραίωση, ο τύπος με το χαμηλότερο T_m (HPV 31, 79,7°C), ενισχύεται περισσότερο σε βάρος του άλλου (HPV 18, 82°C), ενώ υπάρχει και μια 3^η ψευδώς θετική κορυφή. Η ταυτοποίηση του τύπου στο κλινικό δείγμα είναι ξεκάθαρη και συμπίπτει με την προηγηθείσα διάγνωση ως HPV 18 θετικού.



Εικόνα 3.11: Καμπύλη αποδιάταξης του κλινικού δείγματος ΑΤΤ99 (γκρι), θετικού για HPV 18 ($T_m \sim 82$) και ενός θετικού ελέγχου για το mixB, Control B1 (κόκκινο), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα η ποσότητα φθορισμού που ανιχνεύθηκε, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Στην Εικόνα 3.11, για το δείγμα ΑΤΤ99, διακρίνονται δύο κορυφές, και για τους δύο τύπους (HPV 18 & 31), αν και η κορυφή για τον HPV 31 ήταν σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τον HPV 18. Η δεδομένη διάγνωση ήταν μονάχα για τον HPV 18, επομένως έπρεπε να ελεγχθεί η ταυτοποίηση του HPV 31, κάτι που έγινε με απλή qPCR για τον συγκεκριμένο τύπο. Σε αυτή την περίπτωση ήταν πιθανά κάποια επιμόλυνση, κάτι που δεν είναι εφικτό να αποφευχθεί πάντα με αυξημένο αριθμό αντιδράσεων, όμως είναι εύκολο να επαληθευθεί με επαναληπτική απλή qPCR και φυσικά μπορεί να διακριθεί με τη μετέπειτα ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος.

Τέλος, ακολουθούν τα αποτελέσματα για το παράδειγμα της ομάδας C (HPV 33, 51, 66), οι αντιδράσεις του οποίου φορτώθηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 2.13.



Εικόνα 3.12: Καμπύλη αποδιάταξης του κλινικού δείγματος ΑΤΤ78 (κόκκινο), θετικού για HPV 51 και ενός θετικού ελέγχου για το mixC, Control C2 (γκρι), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Στην εικόνα 3.12, όσον αφορά τον θετικό έλεγχο, εξακολουθεί να υπάρχει το φαινόμενο ανταγωνισμού υπέρ της ενίσχυσης στόχων με υψηλότερο T_m , όμως πάραυτα, είναι ευδιάκριτες και οι τρεις κορυφές, αν και οι δύο με χαμηλότερο T_m συγκλίνουν. Το κλινικό δείγμα είχε διαγνωσθεί ως θετικό για τον HPV 51 (T_m ~80°C), όμως εμφάνισε τρεις κορυφές συνολικά. Η πρώτη με το χαμηλότερο T_m , δεν συμπίπτει με κάποιο ειδικό στόχο, επομένως απορρίπτεται εξαρχής. Ενδεχομένως, να

σχετίζεται με κάποιο παραπροϊόν της αντίδρασης, διμερή εκκινητών ή πολύ πιο πιθανά με τα λεγόμενα artifacts της τεχνολογίας που είναι συχνά σε προϊόντα άνω των 100 bp (τα προϊόντα όλων των αντιδράσεων είναι περίπου ~150-300 bp). Οι άλλες δύο κορυφές συμπίπτουν με τους δύο από τους τρεις τύπους, (με μικρή μετατόπιση), που ανιχνεύει το συγκεκριμένο μίγμα, δηλαδή τους HPV 51 & 66 (T_m ~80 & 82°C, αντίστοιχα). Επομένως, όπως και σε κάθε άλλη περίπτωση αμφιβολίας, ελέγχθηκε αρχικά με ηλεκτροφόρηση και εάν δεν ήταν ευδιάκριτα τα αποτελέσματα, πραγματοποιούταν επαναληπτική qPCR για τον συγκεκριμένο τύπο. Για αυτό το δείγμα όμως, η ηλεκτροφόρηση έδειξε ξεκάθαρα την ύπαρξη της ζώνης που αντιστοιχεί στον HPV 51, επομένως η δεύτερη κορυφή, οφείλεται ενδεχομένως στα λεγόμενα artifacts της μεθόδου.

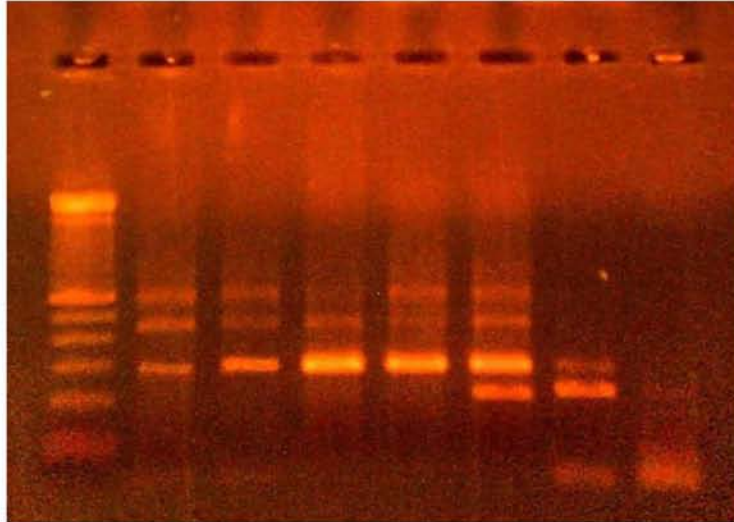
Με τον ίδιο τρόπο, αξιολογήθηκαν όλες οι αντιδράσεις, όμως η επαλήθευση και η αποσαφήνιση κατά περίπτωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε με τη μετέπειτα ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων, η οποία εφαρμόστηκε για όλα τα κλινικά δείγματα.

3.2.3.2. Έλεγχος κλινικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη

Όλα τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκαν αρχικά με τις τρεις ομάδες αντιδράσεων qPCR πολύπλεξης και στην συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.3.2. του κεφαλαίου 2.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων, για τις αντιδράσεις που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

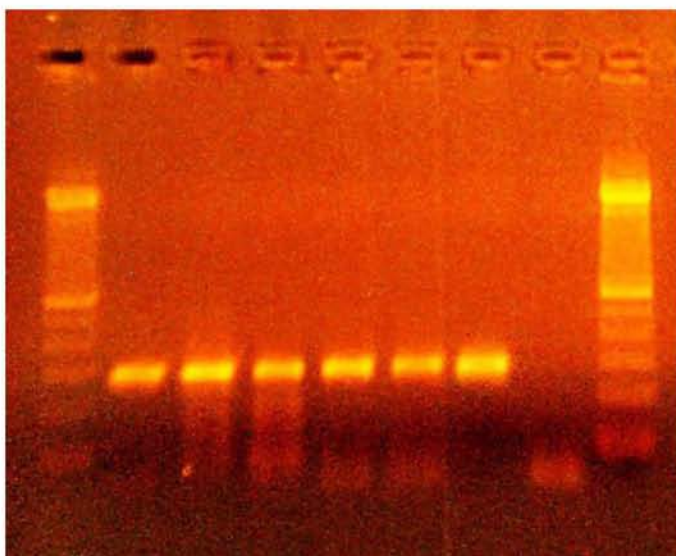
Αρχικά, για την ομάδα Α και τις αντιδράσεις του Πίνακα 2.9, ακολουθεί η εικόνα 3.13 με τα αποτελέσματα της σειράς Η.



Εικόνα 3.13: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης 2%, με ειδικό φίλτρο. Με την σειρά φόρτωσης διακρίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, οι αντιδράσεις multiplex qPCR των κλινικών δειγμάτων 2186, ΠΝΛ8, ΠΝΛ5, ΠΝΛ6, ΠΝΛ7, του θετικού ελέγχου για το mixA (HPV 16, 291bp & HPV 35, 227bp) Control A2 (10^{-8}) και του αρνητικού ελέγχου (ddH₂O).

Όλα τα κλινικά δείγματα ήταν διαγνωσμένα θετικά για τον HPV 16, εκτός από το τελευταίο που ήταν θετικό και για τους δύο τύπους. Τα αρχικά δεδομένα συμφωνούσαν με τα αποτελέσματα της real-time multiplex PCR που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, καθώς και με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Οι δύο επιπλέον ζώνες που βρίσκονται ανοδικά στις διαδρομές των κλινικών δειγμάτων οφείλονται πιθανά σε παραπροϊόντα.

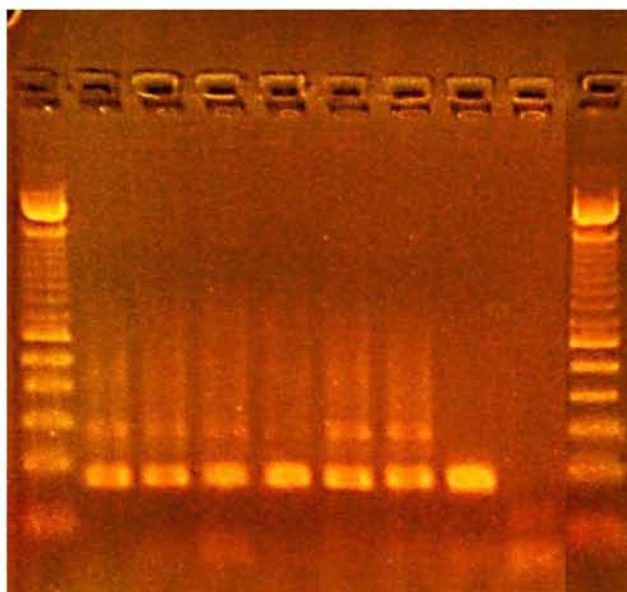
Ακολουθεί η Εικόνα 3.14, με τα κλινικά δείγματα που ελέγχθηκαν στο παράδειγμα του κεφαλαίου 2, με το μίγμα Β.



Εικόνα 3.14: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης 2%, με ειδικό φίλτρο. Με την σειρά φόρτωσης διακρίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, οι αντιδράσεις multiplex qPCR των κλινικών δειγμάτων ΠΝΛ32, ΠΝΛ33, ΑΤΤ11, ΑΤΤ84, ΑΤΤ99, του θετικού ελέγχου για το mixB (HPV 18, 292bp & HPV 31, 291bp) Control B2 (10^{-8}) και του αρνητικού ελέγχου (ddH₂O).

Στην περίπτωση του μίγματος Β δυστυχώς δεν ήταν εφικτή η διάκριση των δύο τύπων στην αγαρόζη, καθώς τα προϊόντα τους διαφέρουν μόνο κατά μία βάση. Επομένως, η εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης στο μίγμα Β, έχει αξία μόνο για την ύπαρξη ή μη οποιουδήποτε από τους δύο τύπους στο κλινικό δείγμα. Όλα τα δείγματα ήταν θετικά στην συγκεκριμένη περίπτωση (Εικόνα 3.14) και αυτό φαίνεται από τις αντίστοιχες ζώνες των κλινικών δειγμάτων και του θετικού ελέγχου.

Τέλος, ακολουθεί το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης από το παράδειγμα αντιδράσεων για το mixC, ενδεικτικά για την πρώτη σειρά (F) του πίνακα 2.13.



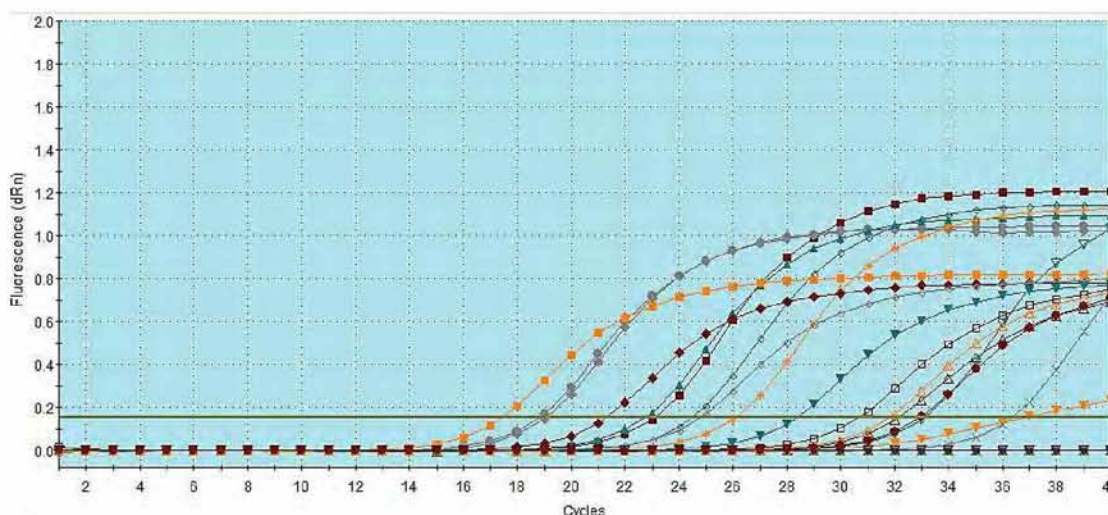
Εικόνα 3.15: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης 2%, με ειδικό φίλτρο. Με την σειρά φόρτωσης διακρίνονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, οι αντιδράσεις multiplex qPCR των κλινικών δειγμάτων 3025, 3062, 3235, 3236, 3257, 3289, του θετικού ελέγχου για το mixC (HPV 33, 202bp, HPV 51, 155bp & HPV 66, 168bp) Control C1 (10^{-9}) και του αρνητικού ελέγχου (ddH₂O). Χάριν ευκολίας σύγκρισης, παρατείνεται ξανά στην τελευταία στήλη ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Όλα τα κλινικά δείγματα είχαν διαγνωσθεί από το νοσοκομείο ως θετικά για τον HPV 66 (168bp) και η ταυτοποίηση επαληθεύτηκε και με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης. Παρατηρήθηκε βέβαια και μια επιπλέον ζώνη στα κλινικά δείγματα σε ύψος (~300 bp) που δεν αντιστοιχεί σε κάποιο προϊόν που ανιχνεύει η ομάδα C, επομένως είτε πρόκειται για κάποιο παραπροϊόν της αντίδρασης, κοινό στα κλινικά δείγματα, είτε κάποια προηγηθείσα επιμόλυνσή τους πριν την έναρξη της αντίδρασης. Παρόλα αυτά δεν επηρεάζει την εικόνα της ηλεκτροφόρησης, όσον αφορά την ανίχνευση και την ταυτοποίηση του ιού.

Με την ίδια λογική ελέγχθηκαν όλα τα κλινικά δείγματα σε δύο στάδια, τις αντιδράσεις multiplex real-time PCR και την ακόλουθη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά περίπτωση, όπου χρειάστηκε αποσαφήνιση στην ταυτοποίηση του ιού, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική qPCR για έναν μόνο συγκεκριμένο τύπο HPV.

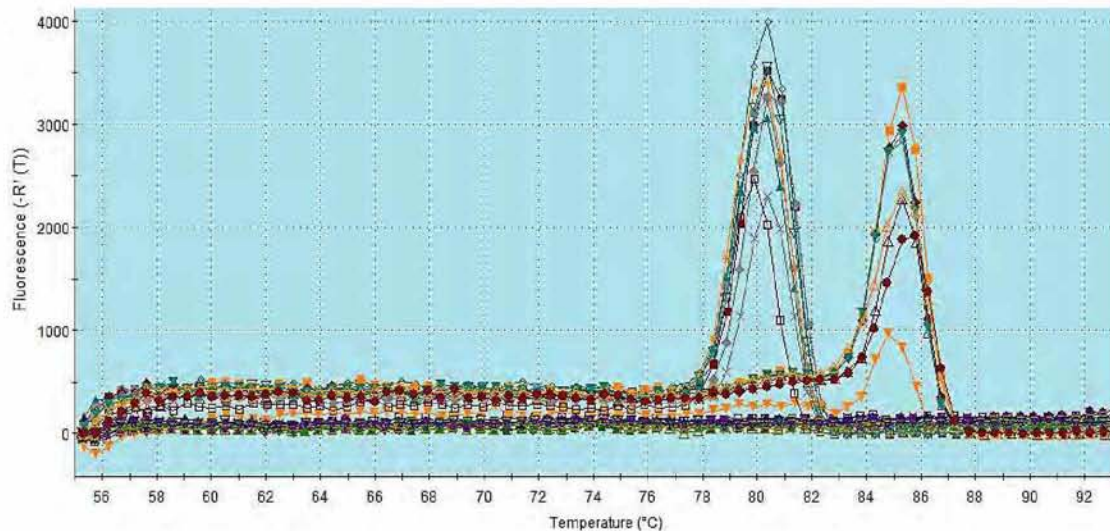
3.2.4. Ποσοτικοποίηση κλινικών δειγμάτων με real-time PCR

Στο τελευταίο τμήμα της εργασίας ελέγχθηκε η ευαισθησία της μεθόδου, δηλαδή η ικανότητά της να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί ελάχιστα αντίγραφα τύπων HPV σε κλινικά δείγματα. Ο έλεγχος έγινε σε επιλεγμένα κλινικά δείγματα από το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Στο κεφάλαιο 2, αναφέρονται ενδεικτικά κάποια κλινικά δείγματα (Πίνακας 2.16) και εδώ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του αρχικού αριθμού ικών αντιγράφων.



Εικόνα 3.16: Καμπύλες ενίσχυσης στην qPCR, για διαδοχικές αραιώσεις για τον HPV 33 και 51 για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης, καθώς και κλινικών δειγμάτων θετικών για έναν από τους δύο τύπους, στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού για κάθε κύκλο της αντίδρασης, ενώ στον οριζόντιο άξονα αναγράφεται ο αριθμός των κύκλων.

Στην εικόνα 3.16, φαίνονται όλες οι καμπύλες ενίσχυσης των αντιδράσεων του πίνακα 2.16. Όλες οι αντιδράσεις φαίνεται πως λειτούργησαν ορθά και απέδωσαν ανιχνεύσιμα ποσά φθορισμού. Ορισμένες βέβαια, όπως η αντίδραση του κλινικού δείγματος AT194 (πορτοκαλί, τρίγωνα σημεία), απέδωσαν χαμηλότερα ποσά φθορισμού με Ct ~36. Αυτό ερμηνεύεται πιθανά ως χαμηλός αριθμός αντιγράφων στο αρχικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα.

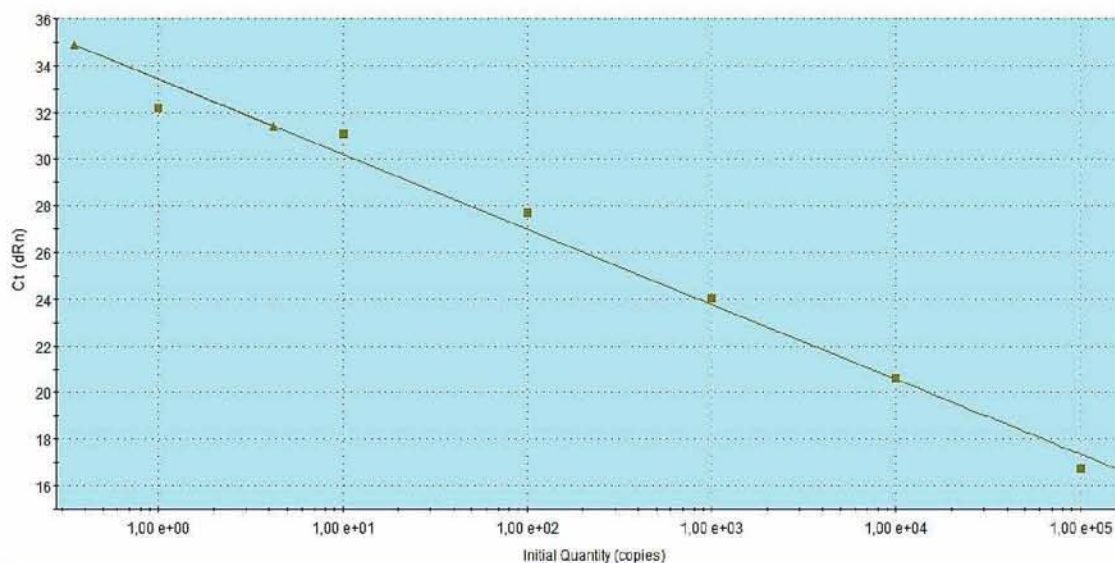


Εικόνα 3.17: Καμπύλες αποδιάταξης στην qPCR, για τις διαδοχικές αραιώσεις των HPV 33 ($T_m \sim 85,3$) και HPV 51 ($T_m \sim 80,2$) για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης, καθώς και κλινικών δειγμάτων θετικών για έναν από τους δύο τύπους, στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα υπολογίζονται τα ποσά φθορισμού που ανιχνεύθηκαν, ανά τιμή θερμοκρασίας αποδιάταξης, ενώ στον οριζόντιο άξονα διαφορετικές θερμοκρασίες (55-95 °C), στο τελικό στάδιο του προγράμματος αντίδρασης.

Στην εικόνα 3.17, επιλέχθηκαν επίσης όλες οι αντιδράσεις του πίνακα 2.16 για τον υπολογισμό της καμπύλης αποδιάταξής τους. Όλα τα κλινικά δείγματα και οι διαδοχικές αραιώσεις είναι ευθυγραμμισμένα στον τύπο HPV που στόχευαν. Επομένως, με τα πειράματα ποσοτικοποίησης υπάρχει παράλληλα και η δυνατότητα ταυτοποίησης του τύπου HPV για το κάθε κλινικό δείγμα. Με τις καμπύλες ενίσχυσης και τις καμπύλες αποδιάταξης είναι εφικτός ο υπολογισμός Ct και η ταυτοποίηση τύπου με βάση το T_m . Για την ακριβή ποσοτικοποίηση όμως των αρχικών ικών αντιγράφων σύμφωνα με το Ct και τα τελικά ποσά απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες καμπύλες των διαδοχικών αραιώσεων πάνω στις οποίες τοποθετήθηκαν τα σημεία των κλινικών δειγμάτων (Εικόνα 3.18 και 3.19).

Στην εικόνα 3.18, έχουν τοποθετηθεί δύο κλινικά δείγματα θετικά (σύμφωνα με την multiplex real-time PCR) για τον HPV 33, στην πρότυπη καμπύλη για τον αντίστοιχο τύπο, για να γίνει η ποσοτικοποίηση. Οι διαδοχικές αραιώσεις καλύπτουν το εύρος 1 έως 100.000 ικών αντιγράφων στην αρχή της αντίδρασης. Το δείγμα ΠΝΛ101, τοποθετείται με βάση το Ct στην αριστερή περιοχή της καμπύλης, δηλαδή σε χαμηλό αριθμό αρχικών αντιγράφων. Συγκεκριμένα τοποθετείται στην καμπύλη στα 4 κατά προσέγγιση ικά αντίγραφα στο κλινικό δείγμα. Το συγκεκριμένο δείγμα ήταν από εκείνα που έδωσαν την πιο χαμηλή αρχική συγκέντρωση και επομένως

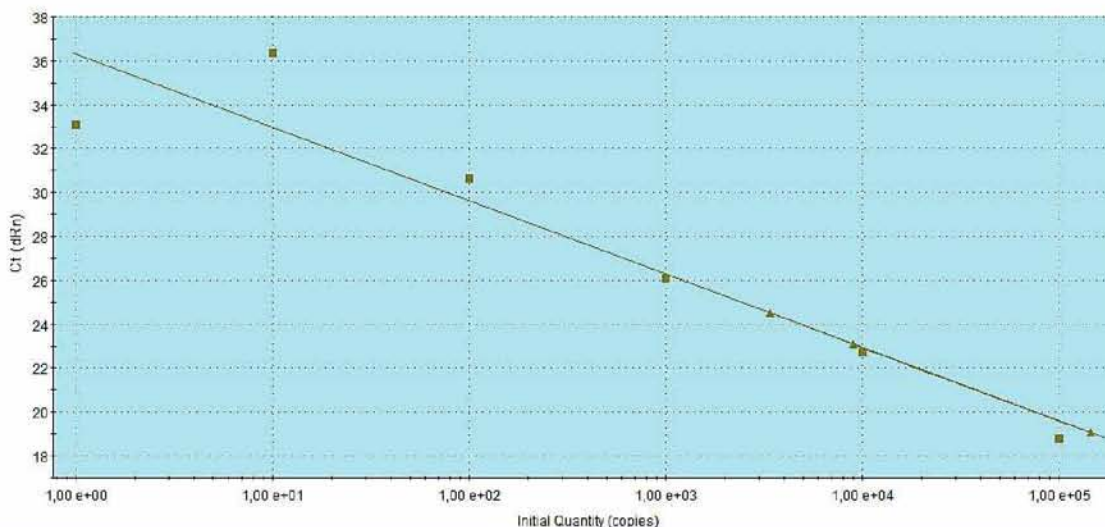
δοκίμασαν σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου στην πράξη. Το κλινικό δείγμα ΑΤΤ94, τοποθετήθηκε στο αριστερό τερματικό άκρο της πρότυπης καμπύλης με Ct κατά προσέγγιση τον κύκλο 35. Η αρχική συγκέντρωση σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη, ήταν κατώτερη του ενός αντιγράφου. Το κλινικό δείγμα είχε διαγνωσθεί από το νοσοκομείο, θετικό μόνο για τον HPV 66, όμως στη multiplex qPCR, εντοπίστηκε και ο HPV 33. Η τοποθέτησή του στην πρότυπη καμπύλη υποδεικνύει ότι κατά πάσα πιθανότητα, ήταν ψευδώς θετικό για τον τύπο 33 (ίσως κάποια επιμόλυνση), καθώς αυτή η συγκέντρωση δεν θεωρείται αξιολογήσιμη.



Εικόνα 3.18: Πρότυπη καμπύλη των αντιδράσεων qPCR των διαδοχικών αραιώσεων του HPV33 (τετράγωνα σημεία), καθώς και των κλινικών δειγμάτων ΑΤΤ94 και ΠΝΑ101 (τρίγωνα σημεία), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η μεταβλητή Ct (συδικός κύκλος), ενώ στον οριζόντιο άξονα υπολογίζεται ο αρχικός αριθμός αντιγράφων, σύμφωνα με τον Ct και την τελική απορρόφηση.

Ακολουθεί η πρότυπη καμπύλη για τον HPV 51. Στην 3.19, έχουν τοποθετηθεί στην πρότυπη καμπύλη του HPV 51, τρία κλινικά δείγματα, που είχαν διαγνωσθεί τόσο από τα αντίστοιχα νοσοκομεία, όσο και με τη multiplex qPCR, ως θετικά για τον HPV 51. Με τον ίδιο τρόπο, υπολογίστηκε η αρχική συγκέντρωση ιικών αντιγράφων στα κλινικά δείγματα. Τα δείγματα ΑΤΤ5 και ΑΤΤ101, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη, είχαν στην αρχή της αντίδρασης κατά προσέγγιση 3.400 και 9.000 ιικά αντίγραφα για τον HPV 51, αντίστοιχα. Το κλινικό δείγμα ΠΝΑ22 τοποθετήθηκε στο δεξιό τερματικό άκρο της πρότυπης καμπύλης με Ct μόλις τον 19, δηλαδή στην περιοχή με υψηλή αρχική συγκέντρωση και ταχύτερη εμφάνιση αξιολογήσιμων ποσών φθορισμού στην πορεία της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, η θέση στην οποία

τοποθετήθηκε, εμφάνιζε την τιμή των 145.000 ιικών αντιγράφων, τα οποία ήταν και τα περισσότερα στα κλινικά δείγματα που ποσοτικοποιήθηκαν.



Εικόνα 3.19: Πρότυπη καμπύλη των αντιδράσεων qPCR των διαδοχικών αραιώσεων του HPV51 (τετράγωνα σημεία), καθώς και των κλινικών δειγμάτων ATT5, ATT101 και ΠΝΛ22 (τρίγωνα σημεία), στο πρόγραμμα MxPro – Mx3005P της Stratagene qPCR. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η μεταβλητή Ct (συνδικός κύκλος), ενώ στον οριζόντιο άξονα υπολογίζεται ο αρχικός αριθμός αντιγράφων, με βάση τον Ct και την τελική απορρόφηση.

Με την ίδια λογική, ολοκληρώθηκε η ποσοτικοποίηση επιλεγμένων κλινικών δειγμάτων με σκοπό την αξιολόγηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Καλύφθηκε σημαντικό εύρος τιμών αρχικής συγκέντρωσης ιικών αντιγράφων με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις να είναι καθοδικά των 10 ιικών αντιγράφων. Επομένως, σύμφωνα με τον συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων, η μέγιστη δυνατή ευαισθησία της μεθόδου είναι τουλάχιστον 10 ικά αντίγραφα στο κλινικό δείγμα (το ελάχιστο ήταν 4 αντίγραφα). Η ευαισθησία, δηλαδή της μεθόδου, ήταν σημαντικά υψηλή.

3.2.5. Τελικά αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων

Συνολικά, καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων ελέγχθηκαν 97 κλινικά δείγματα από νοσοκομεία της Ελλάδας, για 7 τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας, με multiplex qPCR, σε 3 ομάδες μιγμάτων, καθώς και με ακόλουθη ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε πήκτωμα αγαρόζης. Επιλεγμένα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν με πρότυπες καμπύλες, για υπολογισμό της ευαισθησίας, ενώ κατά περίπτωση πραγματοποιήθηκαν και real-time PCR για αποσαφήνιση ταυτοποίησης τύπου HPV. Ακολουθούν τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης HPV, στους πίνακες (3.1, 3.2 και 3.3) ανάλογα με την ομάδα μιγμάτων-στόχων HPV, με την οποία ανιχνεύτηκαν.

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων με την ομάδα multiplex mixA (HPV 16 & 35). Πρώτη στήλη: αύξων αριθμός δειγμάτων. Δεύτερη στήλη: κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων από τα νοσοκομεία. Τρίτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα στα νοσοκομεία. Τέταρτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα με το σύνολο των πειραματικών μεθόδων στο εργαστήριο.

Α/Α δειγμάτων	Κωδικός δείγματος	Διάγνωση Νοσοκομείων	Διάγνωση Εργαστηρίου
1	ΠΙΝΔ7	16, 35	16, 35
2	ΠΙΝΔ9	16, 35	16, 35
3	2209	16	16
4	2121	16	16
5	2148	16	16
6	2216	16	16
7	2186	16	16
8	2127	16	16
9	ΠΙΝΔ8	16, 35	16, 35
10	ΠΙΝΔ5	16	16
11	ΠΙΝΔ6	16	16
12	3063	35	35
13	3334	35	35
14	ΑΤΤ85	35	35
15	1327	35	35
16	1359	16, 35	16, 35
17	ΠΙΝΔ27	35	35
18	ΠΙΝΔ29	35	35
19	ΠΙΝΔ33	35	35
20	ΠΙΝΔ39	35	35
21	ΑΤΤ8	16	16
22	ΑΤΤ9	16	16
23	ΑΤΤ10	16	16
24	ΑΤΤ12	16	16
25	ΑΤΤ13	16	16
26	ΑΤΤ16	16	16
27	ΑΤΤ17	16	16
28	ΑΤΤ18	16	16
29	ΑΤΤ24	16	16
30	ΑΤΤ25	16	16
31	ΑΤΤ26	16	16
32	ΑΤΤ3	16	16
33	ΑΤΤ11	16	16
34	ΑΤΤ5	16	16

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων με την ομάδα multiplex mixB (HPV 18 & 31). Πρώτη στήλη: αύξων αριθμός δειγμάτων. Δεύτερη στήλη: κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων από τα νοσοκομεία. Τρίτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα στα νοσοκομεία. Τέταρτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα με το σύνολο των πειραματικών μεθόδων στο εργαστήριο.

Α/Α δειγμάτων	Κωδικός δείγματος	Διάγνωση Νοσοκομείων	Διάγνωση Εργαστηρίου
1	ΠΝΛ11	18	18
2	ΠΝΛ24	18, 31	18, 31
3	ΠΝΛ25	18	18
4	ΠΝΛ37	18, 31	18, 31
5	ΠΝΛ38	18	18
6	ΠΝΛ39	18	18
7	ΠΝΛ32	31	31
8	ΠΝΛ33	31	31
9	ΑΤΤ11	18, 31	18, 31
10	ΑΤΤ84	18	18
11	ΑΤΤ99	18	18
12	ΠΝΛ27	31	31
13	ΠΝΛ29	18, 31	18, 31
14	ΑΤΤ13	31	31
15	ΠΝΛ17	18, 31	18, 31
16	ΑΤΤ25	18	18
17	ΑΤΤ20	31	31
18	ΑΤΤ52	31	-
19	ΑΤΤ67	31	31
20	3113	18	18
21	3135	18	18
22	3168	18	18
23	3297	18	18
24	3031	18	18
25	1327	18	18
26	2186	18	18
27	ΠΝΛ23	31	31
28	ΠΝΛ24	31	31
29	ΠΝΛ26	31	31
30	ΑΤΤ3	18	18

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα ελέγχου κλινικών δειγμάτων με την ομάδα multiplex mixC (HPV 33, 51 & 66). Πρώτη στήλη: αύξων αριθμός δειγμάτων. Δεύτερη στήλη: κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων από τα νοσοκομεία. Τρίτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα στα νοσοκομεία. Τέταρτη στήλη: τύποι HPV για τους οποίους διαγνώστηκαν θετικά τα δείγματα με το σύνολο των πειραματικών μεθόδων στο εργαστήριο.

Α/Α δειγμάτων	Κωδικός δείγματος	Διάγνωση Νοσοκομείων	Διάγνωση Εργαστηρίου
1	ΠΝΑ22	51	51
2	ΠΝΑ101	33	33
3	ΑΤΤ2	51	51
4	ΑΤΤ5	51, 66	51, 66
5	ΑΤΤ16	33	33
6	ΑΤΤ21	66	66
7	ΑΤΤ41	51	51
8	ΑΤΤ53	33	33
9	ΑΤΤ64	33	33
10	ΑΤΤ66	51, 66	-
11	ΑΤΤ96	51	51
12	ΑΤΤ94	66	66
13	ΑΤΤ101	51	51
14	ΑΤΤ58	66	66
15	ΑΤΤ61	51	51
16	ΑΤΤ78	51	51
17	ΑΤΤ81	51	51
18	ΑΤΤ83	33	33
19	ΑΤΤ85	66	66
20	3025	66	66
21	3062	66	66
22	3107	33	33
23	3160	51	51
24	3171	51	51
25	3228	51	51
26	3235	66	66
27	3236	66	66
28	3246	33	33
29	3257	66	66
30	3260	33	33
31	3288	51	51
32	3289	66	66
33	ΑΤΤ68	51	51

Από το σύνολο λοιπόν των 97 κλινικών δειγμάτων, ο συνδυασμός multiplex real-time PCR και ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη, ανίχνευσε και ταυτοποίησε τους τύπους HPV στα 95. Αξίζει να σημειωθεί, πως ορισμένα δείγματα, κατά την διάρκεια διεξαγωγής των ελέγχων, δεν ήταν στην βέλτιστη δυνατή κατάσταση (χαμηλής ποιότητας δείγμα DNA ιστού), επομένως χρειάστηκε το σύνολο των μεθόδων που περιγράφηκαν για την αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων τους. Δύο από αυτά (ATT52 & ATT66) δεν έδωσαν κάποια εικόνα ούτε στις ποσοτικές PCR, ούτε στην ηλεκτροφόρηση, παρά μόνο συνεχή θόρυβο (smear) και με τις δύο μεθόδους σε αμφότερες τις περιπτώσεις.

Σύμφωνα με τους πίνακες 3.1, 3.2 & 3.3, η ευαισθησία της συνδυαστικής μεθόδου ανίχνευσης και ταυτοποίησης τύπων HPV, ανέρχεται σε ποσοστό 95/97 ή ~98%. Δεδομένου ότι ορισμένα δείγματα DNA δεν ήταν άριστης ποιότητας, η ευαισθησία της μεθόδου θα μπορούσε να αγγίζει το 100%. Όσον αφορά την εξειδίκευση, συνδυάζοντας τόσο τις multiplex real-time PCR, όσο και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, μπορεί επίσης να πλησιάσει το 100%, δεδομένου ότι θα πρέπει να περιοριστούν τυχόν λάθη σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε επιμόλυνση των αρνητικών δειγμάτων (υγιή άτομα ή αρνητικά για τον συγκεκριμένο τύπο HPV). Σε περιπτώσεις, πάντως όπου υπάρχουν αμφιβολίες, είναι δυνατή η εφαρμογή μιας επιπλέον real-time PCR για τον συγκεκριμένο τύπο HPV (όπως και πραγματοποιήθηκε σε ορισμένα δείγματα).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

Η διάγνωση και η ταυτοποίηση των τύπων HPV σε ασθενείς είναι πολύ σημαντική στην έγκαιρη αντιμετώπιση της μόλυνσης και στην θεραπεία της νόσου. Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μια συνδυαστική μέθοδος ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης τύπων HPV σε 97 κλινικά δείγματα από τρία νοσοκομεία της Ελλάδας.

Για την πρώτη φάση της μεθόδου, δημιουργήθηκαν 3 ομάδες μιγμάτων ανίχνευσης HPV σε αντιδράσεις multiplex real-time PCR για τον εντοπισμό 7 από τους πιο κοινούς τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας (συμπεριλαμβανομένων των τύπων 16 και 18), με την χρήση τυπο-ειδικών εκκινητών. Η αρχική προσπάθεια ήταν για 9 τύπους (περιεχόταν και ο 45, ο οποίος ανήκει στους 5 συχνότερους στην Ευρώπη και παγκοσμίως), όμως οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των προϊόντων qPCR δεν επέτρεψαν την διάκριση των 2 τελευταίων τύπων στην 4^η ομάδα (καθώς με τη μέθοδο SYBR Green ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τα T_m των προϊόντων), η οποία και απορρίφθηκε στα πρώτα στάδια δοκιμών συνδυασμού. Μια πιθανή λύση στο πρόβλημα θα μπορούσε να είναι η παραμετροποίηση της συσκευής qPCR στην ταχύτητα μεταβολής θερμοκρασίας και ανάγνωσης στο τελικό στάδιο απορρόφησης των αντιδράσεων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε δεν είχε αυτή την δυνατότητα και επομένως μελλοντικά η μέθοδος θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε διαφορετική συσκευή για βελτίωση και προσθήκη περισσότερων τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας.

Για την δεύτερη φάση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων των multiplex qPCR σε πήκτωμα αγαρόζης για την διάκριση με βάση το μοριακό βάρος και όχι την διαφορά T_m . Με τον συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων διάκρισης τα αποτελέσματα είχαν μεγαλύτερη ασφάλεια ερμηνείας. Οι δύο μέθοδοι συνδύαζαν την υψηλή ευαισθησία της ποσοτικής PCR και μια αρχική ταυτοποίηση των τύπων HPV και τον ποιοτικό διαχωρισμό των τύπων με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη.

Ελέγχθηκαν 97 κλινικά δείγματα συνολικά που είχαν ήδη διαγνωσθεί ως θετικά από τα νοσοκομεία προέλευσης με την συνδυαστική μέθοδο δύο φάσεων. Στην πράξη, η συνδυαστική μέθοδος δύναται να χρησιμοποιηθεί, για εντελώς άγνωστα δείγματα, αρχίζοντας με την ομάδα mixA, στην οποία συμπεριλαμβάνεται ο πιο συχνός τύπος υψηλής επικινδυνότητας, ο HPV 16. Ακολούθως, με την ομάδα mixB, στην οποία περιέχεται ο δεύτερος πιο κοινός τύπος, ο HPV 18 και τέλος με την τρίτη ομάδα μιγμάτων HPV υψηλής επικινδυνότητας, mixC. Σε όσες περιπτώσεις τα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα για συγκεκριμένο τύπο, δύναται να προστεθεί μια τρίτη φάση, απλής real-time PCR ειδική για αυτόν τον τύπο HPV. Με αυτόν τον τρόπο, δηλαδή πετυχαίνεται σάρωση των κλινικών δειγμάτων για 7 τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας που καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων.

Όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου, είναι σημαντικά υψηλή, καθώς σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση επιλεγμένων δειγμάτων, με πρότυπες καμπύλες, υπολογίστηκαν έως και 4 ικά αντίγραφα στην έναρξη της αντίδρασης. Επομένως, η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί στην πράξη να αγγίξει και να ξεπεράσει τον αριθμό των 10 ικών αντιγράφων ανά κλινικό δείγμα.

Με την σύνοψη όλων των τελικών αποτελεσμάτων, με την παρούσα συνδυαστική μέθοδο, παρατηρήθηκε ότι 95 από τα 97 κλινικά δείγματα διαγνώστηκαν θετικά για τους ίδιους τύπους HPV που διαγνώστηκαν και στα νοσοκομεία με διαφορετικές μεθόδους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα 2 δείγματα, καθώς και ορισμένα ακόμη, είχαν σημαντικά ποσά θορύβου (smears), τόσο στην εικόνα της real-time PCR (απλή και πολύπλεξης), όσο και στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης. Η ποιότητα δηλαδή του DNA των κλινικών δειγμάτων δεν ήταν άριστη, με αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις να καταστεί δύσκολη η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των HPV, ενώ σε άλλες αδύνατη. Μια πιθανή λύση σε παρόμοιες περιπτώσεις στην πράξη, θα είναι η επανάληψη ή βελτίωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA από ιστό ή ενδεχομένως και επανάληψη απομόνωσης ιστού από τον ασθενή, καθώς τα αποτελέσματα δεν θα είναι αξιολογήσιμα. Απορρίπτοντας τα μη καλής ποιότητας κλινικά δείγματα στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η ευαισθησία στο σύνολο των υπολοίπων δειγμάτων αγγίζει το 100% και επομένως, σε επόμενο στάδιο μπορεί να δοκιμαστεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να προταθεί ως μια ταχύτερη, περισσότερο πλήρης (σάρωση δειγμάτων για πολλούς τύπους HPV χωρισμένων σε ομάδες multiplex αντιδράσεων), πιο ευαίσθητη (ελάττωση ψευδώς αρνητικών

δειγμάτων, λόγω υπεροχής της real-time PCR, έναντι της συμβατικής) και πιο αξιόπιστη (καθώς ανιχνεύει και διακρίνει τους διαφορετικούς τύπους, τόσο με την διαφορά των T_m στις qPCR, όσο και με την διαφορά μοριακού βάρους στην ηλεκτροφόρηση) μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης HPV από τις κοινές που ήδη χρησιμοποιούνται κλινικά.

Φυσικά, η μέθοδος δύναται να βελτιωθεί περαιτέρω. Με την κατασκευή νέων εκκινητών για επιπλέον τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας (π.χ. του HPV 45, ο οποίος απορρίφθηκε) με T_m που να διαφέρουν τουλάχιστον κατά 2°C από τους υπάρχοντες και προσθήκη τους στις τρεις ομάδες στόχων ή δημιουργία και μιας 4^{th} ομάδας. Η συγκεκριμένη βελτίωση θα αυξήσει το ποσοστό ανίχνευσης για περισσότερους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας.

Επιπλέον, σε διαφορετική συσκευή qPCR (π.χ. στο νεότερο μοντέλο της ίδιας εταιρίας, την Mx5000P qPCR), με παραμετροποίηση του ramp rate στην τελική αποδιάταξη της αντίδρασης, δύναται να βελτιώσει την διάκριση των διαφορετικών T_m , να ελαττώσει τα artifacts της μεθόδου (πρόσθετες κορυφές όπου δεν υπάρχουν επιπλέον προϊόντα σύμφωνα με τις ηλεκτροφορήσεις), καθώς και να περιορίσει την τελική εικόνα του φαινομένου ανταγωνισμού, για την καλύτερη εικόνα των ασθενέστερων κορυφών.

Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα δοκιμών περισσότερων χρωστικών, εκτός του SYBR Green, που λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο (π.χ. EvaGreen®) και να προτιμηθεί εκείνη που θα αποδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία, διακριτική ικανότητα και αξιοπιστία στον έλεγχο κλινικών δειγμάτων. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι φθορισμού ειδικές για αλληλουχία (φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια, π.χ. TaqMan probes, molecular beacons, scorpions etc), κάτι που μπορεί να συγκεντρώσει περισσότερους τύπους HPV σε μία ομάδα, που όμως εκτός των υπολοίπων μειονεκτημάτων που έχουν ήδη αναφερθεί, η κατασκευή ειδικών φθορίζοντων ολιγονουκλεοτιδίων, αυξάνει σημαντικά το κόστος της μεθόδου, επομένως, για τεράστιο αριθμό κλινικών δειγμάτων στην πράξη, θα είναι πολύ κοστοβόρα και ενδεχομένως δεν θα είναι εφικτή η κλινική εφαρμογή. Αντίθετα, μη ειδικές χρωστικές για την αλληλουχία, όπως το SYBR Green, είναι πολύ πιο οικονομικές και θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές

εφαρμογές, με την συνδυαστική μέθοδο που προτάθηκε, πιθανά με ορισμένες από τις βελτιώσεις που έχουν αναφερθεί.

Η ακριβής, έγκαιρη, αξιόπιστη και πλήρης εικόνα της κατάστασης των ασθενών, είναι ένα απαραίτητο όπλο για την διάγνωση, την πρόγνωση, την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για τα βέλτιστα δυνατά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της νόσου από τα πρώιμα ακόμη στάδια και τελικά την υγεία των ασθενών.

5. Βιβλιογραφία

- 1) A. Antson, J. Burns, O. Moroz, D. Scott, C. Sanders, I. Bronstein, G. Dodson, K. Wilson, N. Maitland, **“Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein”**, Nature, Vol. 403, 805-809, 2000
- 2) L. Arroyo, V. Smelov, D. Bzhalava, C. Eklund, E. Hultin, J. Dillner, **“Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping”**, Journal of Clinical Virology, Vol. 58, 437-442, 2013
- 3) A. Auster, L. Joshua-Tor, **“The DNA-binding Domain of Human Papillomavirus Type 18 E1 - crystal structure, dimerization, and DNA binding”**, The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 279, No. 5, 3733-3742, 2004
- 4) D. Bartholomew, R. Luff, N. Quigley, M. Curtis, M. Olson, **“Analytical performance of Cervista® HPV 16/18 genotyping test for cervical cytology samples”**, Journal of Clinical Virology, Vol. 51, 38-43, 2011
- 5) W. Bernard, **“Disorders in Cell Circuitry During Multistage Carcinogenesis: The Role of Homeostasis”**, Carcinogenesis, Vol. 21, No. 5, 857-864, 2000
- 6) H. Bernard, R. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, E. de Villiers, **“Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments”**, Virology, Vol. 401, 70-79, 2010
- 7) L. Bogaert, **“Cervical preneoplasia biomarkers: a conundrum for the community based gynecologic surgical pathologist”**, Journal of Gynecological Oncology, Vol. 25, No 1, 3-5, 2014
- 8) G. Boulet, C. Horvath, S. Berghmans, J. Bogers, **“Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker”**, Cancer Epidemiology Biomarkers Previews, Vol. 17, Issue 4, 810-817, 2008
- 9) H. Brody, **“Nature Outlook: Human Papillomavirus”**, Nature, Vol. 488, S1, 2012
- 10) C. Buck, P. Day, B. Trus, **“The papillomavirus major capsid protein L1”**, Virology, Vol. 445, 169-174, 2013
- 11) C. Buck, B. Trus, **“The Papillomavirus Virion: A Machine Built to Hide Molecular Achilles’ Heels”**, Advanced Exp. Medical Biology, Vol. 726, 403-422, 2012
- 12) R. Burk, A. Harari, Z. Chen, **“Human papillomavirus genome variants”**, Virology, Vol. 445, 232-243, 2013
- 13) K. Butz, T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner, F. Hoppe-Seyler, **“siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells”**, Oncogene, Vol. 22, 5938-5945, 2003
- 14) J. Carter, V. Saunders, **“Virology: Principles & Applications”**, Wiley, Chapter 22 **“Viruses and cancer”**, 287-288, 2007
- 15) D. Case, D. Pearlman, J. Caldwell, T. Cheatham, J. Wang, W. Ross, C. Simmerling, T. Darden, K. Merz, R. Stanton, A. Cheng, J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, H. Gohlke, R. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G. Seibel, U. Singh, P. Weiner, P. Kollman, **“AMBER 7”**, University of California, San Francisco, 2002

- 16) L. Chang, X. He, G. Yu, Y. Wu, **“Effectiveness of HPV 16 Viral Load and the E2/E6 Ratio for the Prediction of Cervical Cancer Risk Among Chinese Women”**, Journal of Medical Virology, Vol. 85, 646-654, 2013
- 17) A. Chen, D. Heideman, D. Boon, Z. Chen, R. Burk, H. De Vuyst, T. Gheit, P. Snijders, M. Tommasino, S. Franceschi, G. Clifford, **“Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer”**, Virology, Vol. 448, 356-362, 2014
- 18) E. Chen, P. Howley, A. Levinson, P. Seeburg, **“The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome”**, Nature, Vol. 299, 523-534, 1982
- 19) S. Collins, C. Constandinou-Williams, K. Wen, L. Young, S. Roberts, P. Murray, C. Woodman, **“Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study”**, Cancer Research, Vol. 69, No. 9, 3828-3832, 2009
- 20) M. Conway, C. Meyers, **“Replication and Assembly of Human Papillomaviruses”**, Journal of Dental Research, Vol. 88, Issue 4, 307-317, 2009
- 21) J. Crow, **“HPV: The Global Burden”**, Nature, Vol. 488, S2-S3, 2012
- 22) O. Danos, M. Katinka, M. Yaniv, **“Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae”**, EMBO Journal, Vol. 1, Issue 2, 231-236, 1982
- 23) D. Davies, V. Pahomov, A. Veselkov, **“NMR determination of the conformational and drug binding properties of the DNA heptamer d(GpCpGpApApGpC) in aqueous solution”**, Nucleic Acids Research, Vol. 25, Issue 22, 4523-4531, 1997
- 24) A. de Freitas, A. Gurgel, B. Chagas, E. Coimbra, C. do Amaral, **“Susceptibility to cervical cancer: An overview”**, Gynecologic Oncology, Vol. 126, 304-311, 2012
- 25) A. del Vecchio, H. Romanczuk, P. Howley, C. Baker, **“Transient replication of human papillomavirus DNAs”**, Journal of Virology, Vol. 66, Issue 10, 5949-5958, 1992
- 26) E. de Villiers, **“Cross-roads in the classification of papillomaviruses”**, Virology, Vol. 445, 2-10, 2013
- 27) E. de Villiers, C. Fauquet, T. Broker, H. Bernard, H. zur Hausen, **“Classification of papillomaviruses”**, Virology, Vol. 324, Issue 1, 17-27, 2004
- 28) Digene Corporation, **“Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test – SSED”**, FDA, 2003
- 29) D. DiMaio, J. Liao, **“Human Papillomaviruses and Cervical Cancer”**, Advances in Virus Research, Vol. 66, 125-158, 2006
- 30) D. DiMaio, L. Petti, **“The E5 proteins”**, Virology, Vol. 445, 99-114, 2013
- 31) J. Doorbar, **“Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer”**, Clinical Science, Vol. 110, 525-541, 2006
- 32) J. Doorbar, **“The E4 protein: structure, function and patterns of expression”**, Virology, Vol. 445, 80-98, 2013
- 33) M. Eisenstein, **“Know your enemy”**, Nature, Vol. 471, S8-S9, 2011
- 34) M. Eisenstein, **“Prevention comes of age”**, Nature, Vol. 488, S11-S13, 2012
- 35) N. Egawa, T. Nakahara, S. Ohno, M. Narisawa-Saito, T. Yugawa, M. Fujita, K. Yamato, Y. Natori, T. Kiyono, **“The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome”**, Journal of Virology, Vol. 86, No. 6, 3276-3283, 2012

- 36) C. Eklund, O. Forslund, K. Wallin, T. Zhou, J. Dillner, **"The 2010 Global Proficiency Study of Human Papillomavirus Genotyping in Vaccinology"**, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 50, No 7, 2289-2298, 2012
- 37) C. Eklund, T. Zhou, J. Dillner, **"Global Proficiency Study of Human Papillomavirus Genotyping"**, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 48, No. 11, 4147-4155, 2010
- 38) J. Ekström, L. Mühr, D. Bzhalava, A. Söderlund-Strand, E. Hultin, P. Nordin, B. Stenquist, J. Paoli, O. Forslund, J. Dillner, **"Diversity of human papillomaviruses in skin lesions"**, Virology, Vol. 447, 300-311, 2013
- 39) T. Gale, **"The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments, 3rd Edition"**, 2010
- 40) N. Ganguly, **"Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value"**, Cell Oncology, Vol. 35, 67-76, 2012
- 41) N. Ganguly, S. Parihar, **"Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis"**, Journal of Bioscience, Vol. 34, 113-123, 2009
- 42) Gen-Probe Incorporated, **"APTIMA HPV Assay - SSED"**, FDA, 2011
- 43) R. Ghittoni, R. Accardi, U. Hasan, T. Gheit, B. Sylla, M. Tommasino, **"The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses"**, Virus Genes, Vol. 40, 1-13, 2010
- 44) V. Govan, **"Strategies for Human Papillomavirus Therapeutic Vaccines and Other Therapies Based on the E6 and E7 Oncogenes"**, Annuals of New York Academy of Sciences, Vol. 1056, 328-343, 2005
- 45) F. Graham, A. van der Eb, **"A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA"**, Virology, Vol. 52, Issue 2, 456-467, 1973
- 46) A. Granoff, R. Webster, **"Encyclopedia of Virology"**, Elsevier, 2nd edition, G. Orth, Chapter **"Papillomaviruses-Human"**, 1105-1114, W. Phelps, G. Bream, A. McBride, Chapter **"Papillomaviruses-Animal"**, 1121-1130, 1999
- 47) L. Haaheim, J. Pattison, R. Whitley, **"A Practical Guide to Clinical Virology"**, Wiley, 2nd edition, T. Traavik, Chapter 38 **"Human Papillomavirus (HPV)"**, 251-256, 2002
- 48) N. Hamid, C. Brown, K. Gaston, **"The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins"**, Cellular and Molecular Life Sciences, Vol. 66, 1700-1717, 2009
- 49) A. Handisurya, C. Schellenbacher, R. Kirnbauer, **"Diseases caused by human papillomaviruses (HPV)"**, Journal of the German Society of Dermatology, Vol. 7, 453-466, 2009
- 50) A. Hebner, L. Laimins, **"Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity"**, Reviews of Medical Virology, Vol. 16, 83-97, 2006
- 51) Johannsen, P. Lambert, **"Epigenetics of human papillomaviruses"**, Virology, Vol. 445, 205-212, 2013
- 52) M. Kahn, R. Kolter, C. Thomas, D. Figurski, R. Meyer, E. Remaut, D. R. Helinski, **"Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F, R6K, and RK2"**, Methods in Enzymology, Vol. 68, 268-280, 1979
- 53) S. Kanodia, L. Fahey, W. Kast, **"Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response"**, Current Cancer Drug Targets, Vol. 7, 79-89, 2007

- 54) M. Kim, H. Kim, S. Kim, J. Oh, J. Han, J. Lim, Y. Juhn, Y. Song, **“Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment”**, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 80, 1930-1935, 2010
- 55) L. King, E. Dornan, M. Donaldson, I. Morgan, **“Human papillomavirus 16 E2 stability and transcriptional activation is enhanced by E1 via a direct protein–protein interaction”**, *Virology*, Vol. 414, 26-33, 2011
- 56) B. Kocjan, A. Steyer, M. Sagadin, L. Hosnjak, M. Poljak, **“Novel human papillomavirus type 174 from a cutaneous squamous cell carcinoma”**, *Genome Announcements*, Vol. 1, Issue 4, 1-2, 2013
- 57) N. Korzeniewski, N. Spardy, A. Duensing, S. Duensing, **“Genomic Instability and Cancer: Lessons Learned from Human Papillomaviruses”**, *Cancer Lett.* Vol. 305, Issue 2, 113-122, 2011
- 58) L. Koutsky L, **“Epidemiology of genital human papillomavirus infection”**, *American Journal of Medicine*, Vol. 102, Issue 5a, 3-8, 1997
- 59) Kukimoto, T. Maehama, T. Sekizuka, Y. Ogasawara, K. Kondo, R. Kusumoto-Matsuo, S. Mori, Y. Ishii, T. Takeuchi, T. Yamaji, F. Takeuchi, K. Hanada, M. Kuroda, **“Genetic Variation of Human Papillomavirus Type 16 in Individual Clinical Specimens Revealed by Deep Sequencing”**, *PLOS ONE*, Vol. 8, Issue 11, 1-14, 2013
- 60) S. Kumar, L. Jena, S. Daf, K. Mohod, P. Goyal, A. Varma, **“hpvPDB: An Online Proteome Reserve for Human Papillomavirus”**, *Genomics & Informatics*, Vol. 11, Issue 4, 289-291, 2013
- 61) M. Lechner, T. Fenton, J. West, G. Wilson, A. Feber, S. Henderson, C. Thirlwell, H. Dibra, A. Jay, L. Butcher, A. Chakravarthy, F. Gratrix, N. Patel, F. Vaz, P. O’Flynn, N. Kalavrezos, A. Teschendorff, C. Boshoff, S. Beck, **“Identification and functional validation of HPV – mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma”**, *Genome Medicine*, Vol. 5, Issue 15, 1-16, 2013
- 62) M. Lechner, G. Frampton, T. Fenton, A. Feber, G. Palmer, A. Jay, N. Pillay, M. Forster, M. Cronin, D. Lipson, V. Miller, T. Brennan, S. Henderson, F. Vaz, P. O’ Flynn, N. Kalavrezos, R. Yelensky, S. Beck, P. Stephens, C. Boshoff, **“Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors”**, *Genome Medicine*, Vol. 5, Issue 49, 1-12, 2013
- 63) D. Lee, H. Sohn, G. Kalpana, J. Choe, **“Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA”**, *Nature*, Vol. 399, 487-491, 1999
- 64) S. Lee, V. Vigliotti, J. Vigliotti, S. Pappu, **“Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis”**, *BMC Clinical Pathology*, Vol. 9, No. 3, 1-10, 2009
- 65) W. Li, W. Wang, M. Si, L. Han, Q. Gao, A. Luo, Y. Li, Y. Lu, S. Wang, D. Ma, **“The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma”**, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Vol. 134, 1355-1361, 2008
- 66) M. Lizano, J. Berumen, A. Garcia-Carranca, **“HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants”**, *Archives of Medical Research*, Vol. 40, 428-434, 2009
- 67) D. Luesley, S. Leeson, **“Colposcopy and Programme Management: Guidelines for the NHS Cervical Screening Programme”**, *NHSCSP Publications*, 2010

- 68) G. Maglennon, J. Doorbar, **"The Biology of Papillomavirus Latency"**, The Open Virology Journal, Vol. 6 (Suppl. 2), 190-197, 2012
- 69) P. Magnusson, P. Sparen, U. Gyllensten, **"Genetic link to cervical tumors"**, Nature, Vol. 400, 29-30, 1999
- 70) A. McBride, **"The Papillomavirus E2 proteins"**, Virology, Vol. 445, 57-79, 2013
- 71) P. McIntyre, **"Finding the viral link: the story of Harald zur Hausen"**, Cancer World, Masterpiece, 32-37, 2005
- 72) N. McKenzie, E. Kobetz, J. Hnatyszyn, L. Twiggs, J. Lucci III, **"Women with HIV are more commonly infected with non-16 and -18 high-risk HPV types"**, Gynecologic Oncology, Vol. 116, 572-577, 2010
- 73) M. McLaughlin-Drubin, J. Meyers, K. Munger, **"Cancer Associated Human Papillomaviruses"**, Current Opinion in Virology, Vol. 2, No 4, 459-466, 2012
- 74) C. Moody, L. Laimins, **"Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation"**, Nature Reviews Cancer, Vol. 10, 550-560, 2010
- 75) S. Mori, R. Kusumoto-Matsuo, Y. Ishii, T. Takeuchi, I. Kukimoto, **"Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1 helicases"**, Virology Journal, Vol. 11, Issue 11, 1-12, 2014
- 76) B. Morris, **"Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region"**, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vol. 43, Issue 11, 1171-1177, 2005
- 77) K. Mullis, **"Process for amplifying nucleic acid sequences"**, USPTO, Pat. No. 4.683.202, July 1987
- 78) K. Mullis, H. Ehrlich, N. Arnheim, G. Horn, R. Saiki, S. Scharf, **"Process for amplifying, detecting and/or cloning nucleic acid sequences"**, USPTO, Pat. No. 4.683.195, July 1987
- 79) Murakami, T. Fujii, K. Dan, M. Saito, A. Ohno, T. Iwata, D. Aoki, **"Methylation of human papillomavirus-52 and -58 is a candidate biomarker in cervical neoplasia"**, Journal of Clinical Virology, Vol. 58, 149-154, 2013
- 80) M. Narisawa-Saito, T. Kiyono, **"Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins"**, Cancer Science, vol. 98, No. 10, 1505-1511, 2007
- 81) I. Nindl, B. Lotz, R. Kühne-Heid, U. Endisch, A. Schneider, **"Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay"**, Journal of Clinical Pathology, Vol. 52, Issue 1, 17-22, 1999
- 82) Nobel Lectures, **"Physiology or Medicine 1942-1962"**, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964
- 83) A. Ojesina, L. Lichtenstein, S. Freeman, C. Pedomallu, I. Imaz-Rosshandler, T. Pugh, A. Cherniack, L. Ambrogio, K. Cibulskis, B. Bertelsen, S. Romero-Cordoba, V. Trevino, K. Vazquez-Santillan, A. Guadarrama, A. Wright, M. Rosenberg, F. Duke, B. Kaplan, R. Wang, E. Nickerson, H. Walline, M. Lawrence, C. Stewart, S. Carter, A. McKenna, I. Rodriguez-Sanchez, M. Espinosa-Castilla, K. Woie, L. Bjorge, E. Wik, M. Halle, E. Hoivik, C. Krakstad, N. Gabino, G. Gomez-Macias, L. Valdez-Chapa, M. Garza-Rodriguez, G. Maytorena, J. Vazquez, C. Rodea, A. Cravioto, M. Cortes, H. Greulich, C. Crum, D. Neuberg, A. Hidalgo-Miranda, C. Escareno, L. Akslén, T. Carey, O. Vintermyr, S.

- Gabriel, H. Barrera-Saldana, J. Melendez-Zajgla, G. Getz, H. Salvesen, M. Meyerson, **"Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas"**, Nature, 2013
- 84) J. Palefsky, **"Biology of HPV in HIV Infection"**, Advanced Dental Research, Vol. 19, 99-105, 2006
- 85) C. Pang, F. Thierry, **"Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets"**, Microbial Pathogenesis, Vol. 58, Issue 55, 55-65, 2012
- 86) M. Pett, N. Coleman, **"Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis"**, Journal of Pathology, Vol. 212, 356-367, 2007
- 87) D. Pittayakhajonwut, P. Angeletti, **"Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes"**, Virology Journal, Vol. 7, Issue 123, 1-9, 2010
- 88) M. Poljak, A. Ostrbenk, **"The Abbott RealTime High Risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older: a review of validation studies"**, Acta Dermatovenereologica, Vol. 22, 43-47, 2013
- 89) D. Posada, K. Crandall, **"MODELTEST: testing the model of DNA substitution"**, Bioinformatics, Vol. 14, Issue 9, 817-818, 1998
- 90) Promega, **"pGEM® - T Easy Vector Systems – Technical Manual"**
- 91) D. Reha, M. Kabela, F. Ryjaek, J. Sponer, J. E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai, P. Hobza, **"Intercalators. 1. Nature of Stacking Interactions between Intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine, and 4',6-Diaminide-2-phenylindole) and DNA Base Pairs. Ab Initio Quantum Chemical, Density Functional Theory, and Empirical Potential Study"**, Journal of American Chemical Society, Vol. 124, Issue 13, 3366–3376, 2002
- 92) C. Roberts, R. Swoyer, J. Bryan, F. Taddeo, **"Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with the Linear Array HPV Genotyping PCR Assay and Influence of DNA Extraction Method on HPV Detection"**, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 49, No. 5, 1899-1906, 2011
- 93) Roche Molecular Systems, **"cobas HPV Test - SSED"**, FDA, 2011
- 94) P. Russell, **"iGenetics"**, Pearson - Benjamin Cummings, Vol. 2, Chapter 16, 709-714, 2006
- 95) D. Saslow, P. Castle, J. Cox, D. Davey, M. Einstein, D. Ferris, S. Goldie, D. Harper, W. Kinney, A. Moscicki, K. Noller, C. Wheeler, T. Ades, K. Andrews, M. Doroshenk, K. Kahn, C. Schmidt, O. Shafey, R. Smith, E. Partridge, F. Garcia, **"American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors"**, A Cancer Journal for Clinicians, Vol. 57, 7-28, 2007
- 96) J. Schiller, P. Day, R. Kines, **"Current understanding of the mechanism of HPV infection"**, Gynecologic Oncology, Vol. 118, S12-S17, 2010
- 97) M. Schmitz, C. Driesch, L. Jansen, I. Runnebaum, M. Durst, **"Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer"**, PLOS ONE, Vol. 7, Issue 6, 1-10, 2012
- 98) S. Schwartz, **"Papillomavirus transcripts and post-transcriptional regulation"**, Virology, Vol. 445, 187-196, 2013
- 99) M. Scudellari, **"Sex, Cancer and A Virus"**, Nature, Vol. 503, 330-332, 2013
- 100) F. Selbie, R. Robinson, R. Shope, **"Shope Papilloma Virus: Reversion of Adaptation to Domestic Rabbit by Passage through Cottontail"**, British Journal of Cancer, Vol. 2, Issue 4, 375-380, 1948

- 101) K. Settle, M. Posner, L. Schumaker, M. Tan, M. Suntharalingam, O. Goloubeva, S. Strome, R. Haddad, S. Patel, E. Cambell, N. Sarlis, J. Lorch, K. Cullen, **“HPV’s unexpected effect”**, *Nature*, Vol. 460, 668, 2009
- 102) J. Shen-Gunther, J. Rebeles, **“Genotyping human papillomaviruses: Development and evaluation of a comprehensive DNA microarray”**, *Cyneologic Oncology*, Vol. 128, 433-441, 2013
- 103) R. Shope, E. Hurst, **“Infectious Papillomatosis of Rabbits”**, *Journal of exp. Medicine*, Vol. 58, Issue 5, 375-380, 1933
- 104) J. Smith, L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer, G. Clifford, **“Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update”**, *International Journal of Cancer*, Vol. 121, 621-632, 2007
- 105) T. Souhoa, B. Bennania, **“Oncogenic human papillomavirus genotyping by multiplex PCR and fragment analysis”**, *Journal of Virological Methods*, Vol. 196, 45-49, 2014
- 106) P. Souza, L. Sichero, P. Maciag, **“HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer”**, *Future Oncology*, Vol. 5, Issue 3, 359-370, 2009
- 107) A. Storey, M. Thomas, A. Kalita, C. Harwood, D. Gardiol, F. Mantovani, J. Breuer, I. Leigh, G. Matlashewski, L. Banks, **“Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer”**, *Nature*, Vol. 393, 229-234, 1998
- 108) Stratagene, **“Methods and Application Guide – Introduction to qPCR”**
- 109) A. Tinelli, G. Leo, D. Dell’ Edera, F. Storelli, M. Galante, M. Guido, G. Hudelist, A. Malvasi, **“Molecular Methods for a Correct Diagnosis of Multiple HPV Infections and Clinical Implications for Vaccine”**, *International Journal of Cancer*, Vol. 21, 545-550, 2011
- 110) F. Thierry, **“Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma”**, *Virology*, Vol. 384, 375-379, 2009
- 111) Third Wave Technologies, **“Cervista HPV HR and Genfind DNA Extraction Kit - SSED”**, FDA, 2009
- 112) Third Wave Technologies, **“Cervista HPV 16/18 - SSED”**, FDA, 2009
- 113) M. Tornesello, L. Buonaguro, P. Giorgi-Rossi, F. Buonaguro, **“Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer”**, *BioMed Research International*, Vol. 2013, 1-10, 2013
- 114) M. Ustav, A. Steniund, **“Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames”**, *The EMBO Journal*, Vol. 10, No. 2, 449-457, 1991
- 115) K. Van Doorslaer, H. Bernard, Z. Chen, E. de Villiers, H. zur Hausen, R. Burk, **“Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature”**, *Trends in Microbiology*, Vol. 19, Issue 2, 49-50, 2011
- 116) A. Venuti, F. Paolini, L. Nasir, A. Corteggio, S. Roperto, M. Campo, G. Borzacchiello, **“Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions”**, *Molecular Cancer*, Vol. 10, Issue 140, 1-18, 2010
- 117) J. Wang, R. Roden, **“L2, the minor capsid protein of papillomavirus”**, *Virology*, Vol. 445, 175-186, 2013

- 118) J. D. Watson, J. A. Witkowski, R. M. Myers, A. A. Caudy, **“Ανασυνδυασμένο DNA”**, 3rd edition, Ακαδημαϊκές εκδόσεις (ελληνική έκδοση), Κεφάλαιο 4, 99-141, 2007
- 119) C. Weyn, S. Boulenouar, V. Mathys, J. Vanhoolandt, A. Bernis, V. Fontaine, **“Detection of human papillomavirus types 45 and 51 by type-specific polymerase chain reaction”**, Journal of Virological Methods, Vol. 146, 405-408, 2007
- 120) Wilson, M. Lechner, A. Köferle, H. Caren, L. Butcher, A. Feber, T. Fenton, A. Jay, C. Boshoff, S. Beck, **“Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma”**, Epigenetics, Vol. 8, Issue 9, 953-961, 2013
- 121) D. Windisch, S. Hoffmann, S. Afonin, S. Vollmer, S. Benamira, B. Langer, J. Bürck, C. Muhle-Goll, A. Ulrich, **“Structural Role of the Conserved Cysteines in the Dimerization of the Viral Transmembrane Oncoprotein E5”**, Biophysical Journal, Vol. 99, Issue 6, 1764-1772, 2010
- 122) Yang, **“Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis”**, Chinese Journal of Cancer, Vol. 32, Issue 1, 42-48, 2013
- 123) T. Yugawa, T. Kiyono, **“Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins”**, Reviews of Medical Virology, Vol. 19, 97-113, 2009
- 124) Z. Zheng, C. Baker, **“Papillomavirus Genome Structure, Expression and Post-Transcriptional Regulation”**, Front Bioscience, Vol. 11, 2286-2302, 2006
- 125) A. Zuckerman, J. Banatvala, J. Pattison, P. Griffiths, B. Schoub, **“Principles & Practice of Clinical Virology”**, Wiley, 5th edition, D. McCance, Chapter 22 **“Papillomaviruses”**, 661-674, 2004
- 126) Ι. Παπαπαναγιώτου, Β. Κυριαζοπούλου, **“Ιατρική μικροβιολογία & ιολογία”**, University Studio Press, Β' έκδοση, Κεφάλαιο 34 «Ογκογόνοι ιοί», 2004

Διαδικτυακοί Ιστότοποι

<http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/modmol/>

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/Pap-HPV-testing>

<http://www.cancerworld.org/CancerWorld/getStaticModFile.aspx?id=717>

<http://www.cdc.gov/hpv/cancer.html>

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/lederberg-bio.html

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/hausen-bio.html

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>