



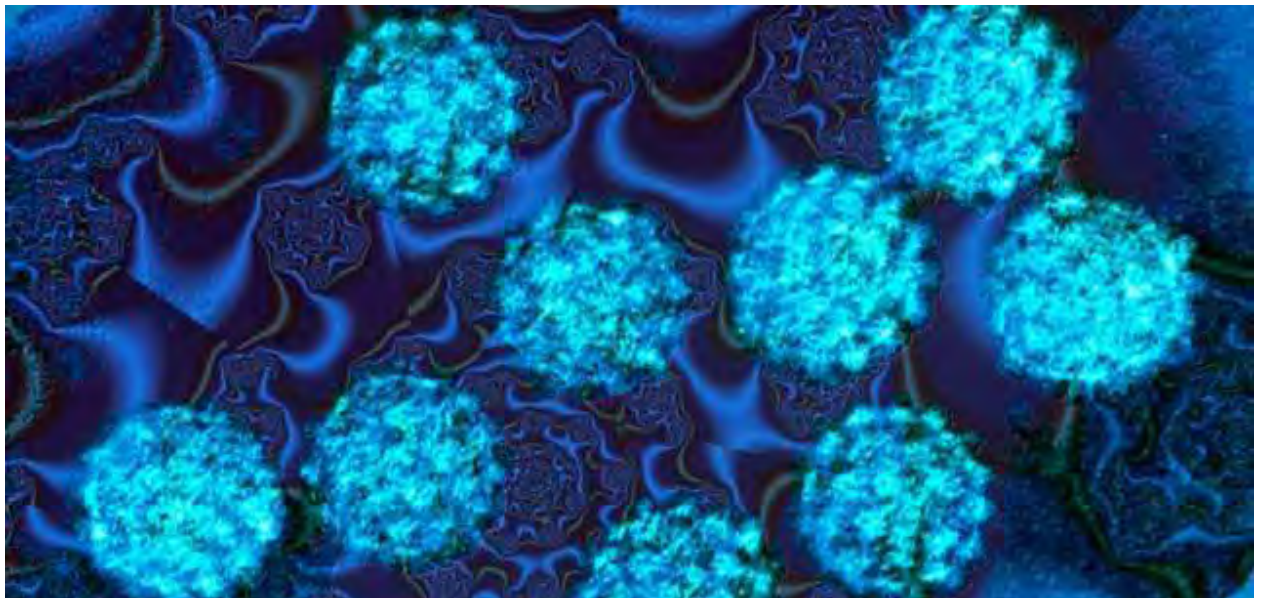
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μοριακή και Εξελικτική Ανάλυση των HPV16 E6 και E7
γονιδίων στον Ελληνικό πληθυσμό**

**Molecular and evolutionary analysis of HPV16 E6 and
E7 genes in Greek women**



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Στη μητέρα μου, Αριάδνη, που ήταν πάντα δίπλα μου..

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 1/11/2013-31/3/2014

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Τριμελής Επιτροπή:

Π. Μαρκουλάτος: Καθηγητής Εφαρμοσμένης

Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του

Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γ. Αμούτζιας: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική

του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζ. Κυριακοπούλου: Ειδικό Ερευνητικό και Διδακτικό Προσωπικό

Ημερομηνία Κατάθεσης Πτυχιακής Εργασίας:

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση και την επίβλεψη της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις ιδιαίτερες συμβουλές και την υπομονή που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια του πειραματικού και συγγραφικού μέρους της παρούσας εργασίας. Ακόμη θέλω να τον ευχαριστήσω εκ βαθέων για την όλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα και κυρίως για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, δίνοντας μου την ευκαιρία να γνωρίσω τον κόσμο της ιολογίας.

Επίσης θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους διδάκτορες Τσακογιάννη Δημήτρη και Ρούτερ Ειρήνη, στον υποψήφιο διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο καθώς και στη διδάκτορα Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύξαμε στο εργαστήριο και για την στενή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Η συμβολή τους συνετέλεσε σημαντικά στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της εργασίας, βοηθώντας στο να ξεπεραστούν οποιαδήποτε εργαστηριακά προβλήματα.

Με την ευκαιρία αυτή που μου δόθηκε γνώρισα το σωστό τρόπο λειτουργίας ενός εργαστηρίου που αξιοποιεί στο έπακρο κάθε πόρο που του δίνεται με αποτέλεσμα να διεξάγει πειράματα με συνέπεια και να εξάγει αποτελέσματα στο μέγιστο των δυνατοτήτων του. Γι' αυτό είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων που άνηκα, έστω και για λίγο, στο εργαστήριο αυτό, από το οποίο αποκόμισα πολλές γνώσεις που είμαι σίγουρη ότι θα μου φανούν πολύ χρήσιμες στο μέλλον.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
1. Η Βιολογία των Human Papillomaviruses (HPV)	7
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	7
1.2 Ταξινόμηση των ιών Papilloma.....	8
1.2.1 Alpha-papillomavirus.....	9
1.2.2 Beta-papillomavirus.....	11
1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus.....	11
2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)	12
2.1 Δομή του καψιδίου.....	12
2.2 Οργάνωση του γενόματος.....	13
2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1.....	14
2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2.....	15
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4.....	16
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5.....	17
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6.....	18
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7.....	19
3. Ο κύκλος ζωής των HPV	22
3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	22
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενόματος.....	23
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενόματος.....	25
3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	25
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	26

4. Κλινικές Εκδηλώσεις.....	27
4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.....	28
5. Εργαστηριακή διάγνωση.....	30
5.1 Paptest.....	30
5.2 HybridCapture II test.....	31
5.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσηςPCR.....	31
5.3.1 PCR με εκκινητικά μόρια MY09/MY11 και GP5+/GP6+.....	31
5.3.2. PCR σε συνδυασμό με Microarrays.....	32
5.3.3 RealtimePCR.....	32
5.3.4. NestedMultiplexPCR.....	33
6. Υλικά και μέθοδοι.....	34
6.1 Κλινικά δείγματα.....	34
6.2 Ενίσχυση E6-E7 με PCR.....	34
6.3 Κλωνοποίηση και αλληλούχιση E6-E7 γονιδίων.....	35
6.4 Φυλογενετική ανάλυση.....	35
6.5 Ανάλυση διαλογής και ανασυνδυασμού.....	36
6.6 Φυλογενετικό δέντρο.....	37
7 Αποτελέσματα.....	38
7.1 Παραλλαγές αλληλουχίας E6-E7.....	38
7.2 Προσδιορισμός HPV16 παραλλαγών.....	39
7.3. Ανάλυση διαλογής και ανασυνδυασμού.....	42
8. Συζήτηση.....	43
9. Βιβλιογραφία.....	47

Περίληψη

Οι μη Ευρωπαϊκού τύπου HPV16 έχουν συσχετιστεί με μόλυνση και ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ενώ η μετάλλαξη L83V του E6 γονιδίου έχει σχετιστεί με την εξέλιξη της τραχηλικής κακοήθειας. Η παρούσα μελέτη αναζήτησε τη μετάλλαξη L83V του HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό. Έγινε μοριακή και εξελικτική ανάλυση στα ογκογονίδια E6 και E7 του HPV16, με σκοπό να εκτιμηθεί η εξέλιξη του γονιδιώματος του HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό. Η μετάλλαξη L83V του E6 βρέθηκε κατά 78,2% σε δείγματα υψηλού κινδύνου και κατά 64,28% σε δείγματα χαμηλού κινδύνου. Επιπλέον τόσο η πρότυπη αλληλουχία όσο και ο τύπος E6 L83V ήταν επικρατείς και σε κακοήθειες υψηλού αλλά και σε χαμηλού κινδύνου. Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης των καταλοίπων των αμινοξέων στις αλληλουχίες του HPV16 του ελληνικού πληθυσμού δείχνει ότι τόσο το κωδικόνιο 83 της πρωτεΐνης E6 καθώς και το κωδικόνιο 85 της E7 πρωτεΐνης υπόκεινται σε θετική επιλογή. Καταγράφηκαν καινούργιες αλληλουχικές μεταλλάξεις στα γονίδια E6 και E7 καρκινικών δειγμάτων τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως T350G μεταλλάξεις Ευρωπαϊκού τύπου. Παρόλα αυτά δεν υπήρξε ενδοτυπικός ανασυνδυασμός μέσα στην περιοχή E6-E7. Μοριακή και αναπτυξιακή ανάλυση των γονιδιωμάτων του HPV16 από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές θα έδινε χρήσιμες πληροφορίες για την ιική εξέλιξη και ογκογένεση.

Abstract

Human papillomavirus type 16 (HPV16) non-European variants have been associated with persistent infection and cervical cancer development, while the L83V variant of the E6 gene has been correlated with the progression of cervical malignancy. The present study investigated the presence of the HPV16 L83V variant in Greek women. Molecular evolutionary analysis of the HPV16 E6 and E7 oncogenes was conducted in order to estimate the evolution of the HPV16 genome in the Greek population. The E6 L83V variant was found in 78.2 % of high- and 64.28 % of low-grade specimens. Moreover, the prototype and E6 L83V variants were both prevalent in high and low-grade malignancies in Greek women. Selective pressure analysis of the individual amino acid residues of HPV16 sequences from the Greek population indicates that codon 83 of the E6 protein, as well as codon 85 of the E7 protein, are undergoing positive selection. Novel sequence variations were recorded within the E6 and E7 genes in cervical samples, characterized as (T350G) European variants. However, no signal of intratypic recombination event was identified within the E6–E7 region. Molecular and evolutionary analyses of HPV16 genomes from distinct geographical locations might provide valuable information about viral evolution and oncogenicity

1.Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPV)

1.1.Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από τη λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν τη μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι, κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Προσβάλλουν τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη μιας σειράς βλαβών, οι οποίες εκτείνονται από τα κοινά θηλώματα μέχρι τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του πέους (zur Hausen, 1996).

Η ανακάλυψη του Papillomavirus ικανού να προκαλέσει θηλώματα έγινε το 1933 από τον Richard Shope κι από τότε έχουν ασχοληθεί πολλοί επιστήμονες αποκαλύπτοντας αρκετά στοιχεία για τη βιολογία και τη δράση αυτών των ιών.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 100 τύποι του HPV και μαζί με αυτούς που μολύνουν ζώα χωρίζονται σε 18 γένη βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της πρωτεΐνης L1 (de Villiers E.M. et al. 2004). Οι HPV μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής και μια ομάδα περίπου 35-40 τύποι μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής και μολύνουν την περιοχή των γεννητικών οργάνων. Οι HPV διαχωρίζονται σε δερματικούς και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες (Πίνακας 1.1).

Ομάδα επικινδυνότητας	Τύπος HPV
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	<ul style="list-style-type: none">• Most common: 6 and 11• 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and CP6108
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	<ul style="list-style-type: none">• 26, 53 and 66
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	<ul style="list-style-type: none">• Most common: 16, 18• 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82

Πίνακας 1.1 Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των HPV τύπων.

Οι ιοί υψηλής επικινδυνότητας (HighRisk) στην οποία ανήκουν οι HPVs που συνδέονται με την πρόκληση νεοπλασιών, μια μορφή της οποίας είναι και η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου που μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο. Το DNA των High risk HPV ανιχνεύεται σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου (>99,7%) (DoorbarJ. 2006). Η δεύτερη ομάδα είναι αυτή της ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle Risk) τα μέλη της οποίας εντοπίζονται σε δυσπλασίες. Τέλος η τρίτη ομάδα είναι αυτή της χαμηλής επικινδυνότητας (Low Risk) στην οποία οι ιοί που την αποτελούν βρίσκονται κυρίως σε κονδυλώματα και δεν φαίνεται να έχουν κάποια σχέση στην ανάπτυξη καρκίνου. Αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι γυναίκες με HR-HPV διατρέχουν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου απ' ό,τι γυναίκες με LR-HPV τύπους (Laura Sicheo et al. 2007). Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι οκαρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους ιούς Papilloma στους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου.

1.2. Ταξινόμηση των ιών Papilloma

Το φάσμα των αλλοιώσεων που προκαλούν οι HPV ιοί στο πλακώδες επιθήλιο του τραχήλου είναι μεγάλο και η αλλοίωση καθορίζεται από τον υπότυπο του ιού. Αρχικά εξαιτίας του χωρίς καψιδίου φάκελο που διαθέτουν καθώς και στο δίκλωνο κυκλικό DNAγονιδίωμα τους, είχαν συγκαταλεχθεί, μαζί με τους Polyomaviruses, στη μεγάλη οικογένεια των Papovaviridae (DanosO. et al., 1982). Αργότερα αναγνωρίστηκε ότι οι δυο ομάδες ιών είχαν διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος, τελείως διαφορετική οργάνωση γενώματος και ελάχιστες ομοιότητες στη νουκλεοτιδική ή αμινοξική τους αλληλουχία. Τώρα αναγνωρίζονται επίσημα από την παγκόσμια επιτροπή ταξινόμησης των ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV) ως δυο ξεχωριστές οικογένειες, Papillomaviridae και Polyomaviridae (de Villiers E.M. et al., 2004).

Οι μέχρι τώρα γνωστοί ανθρώπινοι και ζωικοί Papillomaviruses σχηματίζουν 16 γένη (Εικόνα 1Α), τα οποία προσδιορίζονται από τα γράμματα της Ελληνικής αλφαβήτου (BernardH.U. 2005). Πέντε από αυτά τα γένη αποτελούνται αποκλειστικά από HPV

τύπους και Papillomaviruses που ταυτοποιήθηκαν σε μερικούς πιθήκους και μαϊμούδες, ενώ όλα τα άλλα γένη περιέχουν τύπους που βρέθηκαν σε διάφορα θηλαστικά.

Τα δυο κύρια γένη HPV είναι οι Alpha και Beta Papillomaviruses, στα οποία ανήκουν περίπου το 90% των χαρακτηρισμένων HPV.

1.2.1 Alpha Papillomavirus

Οι Alpha- Papillomaviruses αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα HPV's και είναι η μόνη που περιλαμβάνει τους HPV's που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Περιλαμβάνει επίσης ιούς Papilloma που προκαλούν μόνο θηλώματα και πολύ σπάνια φαίνεται να εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου (Εικόνα 1B). Περισσότερα από 30 τύποι προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου κι ένα μέρος αυτών συσχετίζεται με αλλοιώσεις που εξελίσσονται σε καρκίνο. Τέτοιοι τύποι βέβαια είναι αυτοί που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου και ανήκουν στην πρώτη ομάδα των Alpha Papillomavirus με τον HPV16 να αποτελεί τον πιο συχνό HPV υψηλού κινδύνου στο γενικό πληθυσμό και αιτία του 50% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου.

1.2.2 Beta Papillomavirus

Το γένος Beta Papillomavirus διαιρείται σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη. Τα μέλη της οικογένειας αυτής προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος χωρίς να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί, ότι η μόλυνση από τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια κονδυλωματώδη επιδερμιδοδυσπλασία (epidermodysplasiaverruciformis, EV), μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Doorbar J. , 2006). Κυρίως τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 εμπλέκονται στο 90% αυτών των όγκων (Kremsdorf D. Et. al. , 1983).

1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV προέρχονται από τρία άλλα γένη (Gamma, Mu, Nu) και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται σε καρκίνο (Doorbar J. 2006) (Πίνακας 1.2).

Γένος	Στέλεχος
Betapapillomavirus	HPV-2,5,8,107
Gamma Papillomavirus	HPV- 101, 103
Mu Papillomavirus	HPV- 1, 63
Nu Papillomavirus	HPV- 41

Πίνακας 1.2: Σύνοψη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

2.Δομή του Human Papillomavirus (HPV)

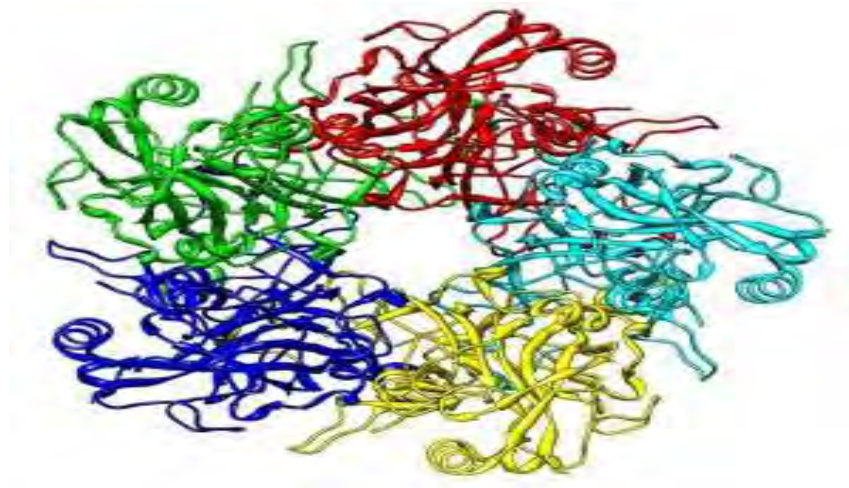
2.1 Δομή του καψιδίου

Οι ιοί Papilloma έχουν σφαιρικό κυκλικό σχήμα, είναι DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο 50-60nm (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Δομή HPV ιού

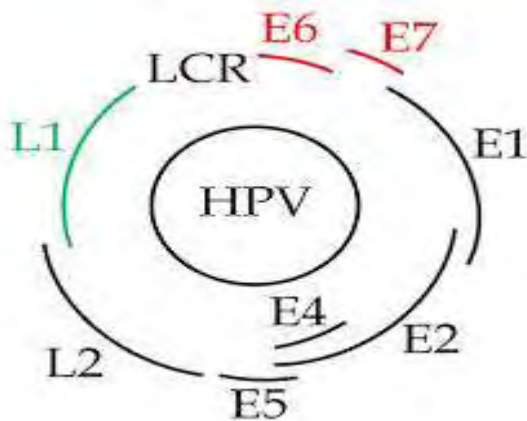
Η εξωτερική τους επιφάνεια αποτελείται από το καψίδιο, το οποίο συγκροτείται από 72 πενταμερή (καψομερίδια) της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (The Papillomaviruses, 2007). Η L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλλει στην αναγνώριση των ιικών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Luxton and Sepherd 2001, Yang R. et al., 2004). Όλα τα πενταμερή μαζί σχηματίζουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με triangulation number $T=7$. Η δεύτερη καψιδιακή πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη L2, η οποία παράγεται σε μικρότερες ποσότητες από την L1, τοποθετείται εσωτερικά του καψιδίου που σχηματίζεται από τα L1 πενταμερή (Εικόνα 3). Πιστεύεται ότι αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται στο C-τελικό της άκρο. Κύριος ρόλος της L2 είναι το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσυντιθέμενα ιικά σωματίδια σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2 (Buck C.B. et al., 2004).



Εικόνα 3. Όψη ενός L1 πενταμερούς. Απεικονίζονται οι πλευρικές προεξοχές από κάθε ένα από τα πέντε μονομερή (το κάθε ένα με διαφορετικό χρώμα) (Brooke Bishop et al 2007)

2.2 Οργάνωση του γενώματος

Το γονιδίωμα των ιών Papilloma περιλαμβάνει 6 μη δομικά ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δυο δομικά γονίδια L1 και L2 (Zhi-Ming Zheng et al 2006) (Εικόνα 4). Το γένωμα των ιών Papilloma περιέχει οκτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF's) και διαχωρίζεται σε τρεις τομείς, βάσει των λειτουργικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E= early), την όψιμη περιοχή (L=late) και τη ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6, E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos O.et.al., 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο, τις L1 και L2. Η έκφραση του γενώματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δυο βασικούς υποκινητές, τον p97 υποκινητή που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (Smotkin et. al., 1986) και τον p670 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K.et. al., 1996).



Εικόνα 4. Γένωμα HPV

Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6. Ακόμη, η LCR περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιικού DNA (Demeret et. al., 1995, Shyh-HanTan et. al., 2002).

2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος. (Ustavand Stenlund, 1991). Παρουσιάζει μια εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού (Masky et. al. 1997, Clertant P. 1984). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης, ATPάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

Η δραστηριότητα της ATPάσης τοποθετείται στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της E1 του HPV-11 συμβάλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές (Thorner L. Ketal. 1993). Αυτός ο τομέας είναι επίσης υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του ξενιστή (Masterson J.et. al., 1998).

Παρουσία ATP η E1 προσδένεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε AT προκαλώντας δομικές αλλαγές (Shawn E. Holtand Van G. Wilson, 1995). Σαν πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους. Πρώτον δρα σαν

πρωτεΐνη πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον δρα σαν ελικάση με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει την θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρά η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et.al., 1995).

Η E1 προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo S. et. al., 2003). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα E2 διμερές και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν δομική μονάδα για την συγκρότηση ενός μεγαλύτερου E1 εξαμερούς συμπλόκου, που έχει την ιδιότητα να ξετυλίγει το DNA (Sedman J. et. al., 1998). Η E2 επομένως λειτουργεί σαν παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσής της και επιπρόσθετα σαν παράγοντας που συναρμολογεί τα E1 μονομερή (Liu J. Setal 1995).

Η E1 είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (Peter W. White et. al., 2005)

2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDA, δρα σαν διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιικού DNA (Laimins et. al., 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: C-τελική περιοχή, η οποία κωδικοποιεί και σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA (Hegde et al 1992). Μια περιοχή- αρμός (hinge region), και την N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μια α-έλικα (Anston et. al., 2000). Η N-τελική και η C-τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPV, ενώ η hinge περιοχή δείχνει μεγαλύτερη ετερογένεια (Francis et. al., 2000).

Η E2 πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης επιδρά στην ρύθμιση μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et. al., 1987). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (Bouvard V. et. al. 1994). Οι περιοχές αυτές είναι εντός της περιοχής LCR του HPV-16 και ρυθμίζουν την

μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin et. al., 1986). Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο TATA Box ακριβώς ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni et. al., 1991, Tan et. al., 1992). Οι άλλες δύο θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham et. al., 1994).

Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται στις θέσεις τοποθετημένες μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Stegerand Corbach, 1997). Όταν η συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 είναι κατειλημμένες και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7 (Romanczuketal 1990, Stegerand Corbach 1997). Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 (Bechtold et. al., 2003).

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 συντίθενται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του HPV και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται μαζί με τα πέντε πρώτα αμινοξέα του E1 γονιδίου σχηματίζοντας την E1^{E4} πρωτεΐνη, καθώς απουσιάζει από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του E4 το κωδικόνιο λήξης AUG (Howley P.M 1996). Όλοι οι papilloma ιοί εκφράζουν την πρωτεΐνη E1^{E4} στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής τους.

Η E1^{E4} είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της αντιγραφής του ιικού γενώματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού (Wilson Retal 2005) ενώ άλλες

μελέτες εμπλέκουν την E1^{E2} ως ρυθμιστή της όψιμης και της πρώιμης φάσης της ζωής των HPV. Παρόλα αυτά όμως η λειτουργία της E1^{E4} μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών (Fang Letal 2006).

Η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και την C-τελική περιοχή (Roberts et. al., 1994). Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1^{E4} αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του δικτύου ινιδίων κερατίνης (Roberts et. al., 1994).

Μια ακόμη λειτουργία της E1^{E4} των HPV-11 και HPV-16 είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 (G2 arrest) σε μία ποικιλία κυτταρικών σειρών (Davy C.E. et.al., 2002).

Τέλος η E1^{E4} πρωτεΐνη του HPV-16 έχει την δυνατότητα να επάγει την απόπτωση καθώς έχει μελετηθεί η σύνδεση και αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια (Raj et. al., 1994).

2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη που η λειτουργία της δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στην συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et. al., 1993). Στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et. al., 1986). Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με τη ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών (BVP) και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et. al., 1993).

HE5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενόματος του HPV-31 έχει αποδειχθεί ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα καθώς επίσης και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrman et. al., 2003). Πιο συγκεκριμένα η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores E.R. et.al., 2000). Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et.al., 2005).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη των ιών υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας αποτελείται περίπου από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι συντηρημένο μεταξύ των HPV και αποτελεί σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού (Coleand Danos, 1987). Η E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει την δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη αυτή από μόνη της είναι δυνατόν να μετασχηματίσει NIH3T3 κύτταρα και να δημιουργήσει αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα (Bandetal 1991, Wazeretal 1995). Από μόνη της όμως η E6 δεν είναι ικανή να μετασχηματίσει κερατινοκύτταρα. Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Hawley-Nelson et.al., 1989).

Μια βασική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με την p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας καταστολέας όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης p21 (Ko L. and C. Prives, 1996). Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, όπως βλάβη στο DNA η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S.E. et.al., 2005).

Όσον αφορά την σύνδεση του μονοπατιού αυτού με τον HPV έχει διαπιστωθεί, ότι η E6 προσδένεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6 AP (Huibregtse et. al., 1991). Ο σχηματισμός αυτός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουτινίωση της p53 και την αποδόμησή της στο 26 S πρωτεάσωμα. Ακόμη η E6 μπορεί να αναστείλει την δράση της p53 έμμεσα μέσω σύνδεσης της με την p300/CBP, που είναι συνενεργοποιητής της p53 (Huibregtse et. al., 1991).

Μια δεύτερη σημαντική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσης τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας σε πειράματα με ποντίκια (Nguyenetal, 2003).

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για την δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Klingelhutzetal, 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια της δράσης της τελομεράσης επιδρά στην σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση οδηγώντας σταδιακά στην γήρανση των κυττάρων και τον θάνατο (Liu J.P.1999). Η E6 φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT μέσω συνδυαστικής δράσης μέσω c-myc και Sp1 (Kyo et. al., 2001). Αυτή η εκτεταμένη ενεργοποίηση της hTERT έχει σαν αποτέλεσμα την διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντας την κυτταρική γήρανση με άμεση συνέπεια τα κύτταρα να γίνονται αθάνατα (Artandi S.E. et. al., 2005).

2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την δημιουργία αθάνατων κυττάρων καθώς επίσης και με την ική παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μέγεθος 100 αμινοξέων και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές. Την CR1, CR2 και την CR3 (Barbosa M.S et al 1990, Dyson et al 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλει στην σύνδεση της E7 με τη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Dyson et. Al., 1992). Τέλος η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Η έκφραση μόνο

της E7 απουσία της E6 μπορεί να δημιουργήσει αθάνατα NIH 3T3 κύτταρα και σε χαμηλό ποσοστό να δημιουργήσει αθάνατα κερατινοκύτταρα (Munger et. al., 1989).

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητα της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p107 και p103 (Dyson et. al., 1989). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F με συνέπεια να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά την δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος (Berezutskaya et. al., 1997, Wang et. al., 2001). Η πρόσδεση της E7 στην Rb έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κύκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ'επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Funk J. O. et. al., 1997).

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρά με την E7 είναι η απακετυλάση των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν επιπρόσθετα να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας την λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί ότι η σύνδεση της E7 στην HDAC αναστέλλει την σύνδεση της Rb-HDAC με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η λειτουργία της. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση της E7 στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα την απορύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth M.S. et al 2004, Brehm A et al 1999).

Γονίδιο:	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμύκησης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση αντιγραφής. Υπάρχει σε δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός καταστολέας. Δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή του ιικού γενώματος.
E3	Άγνωστη λειτουργία.
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
L1	Πλεονάζουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Ελάσσων καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

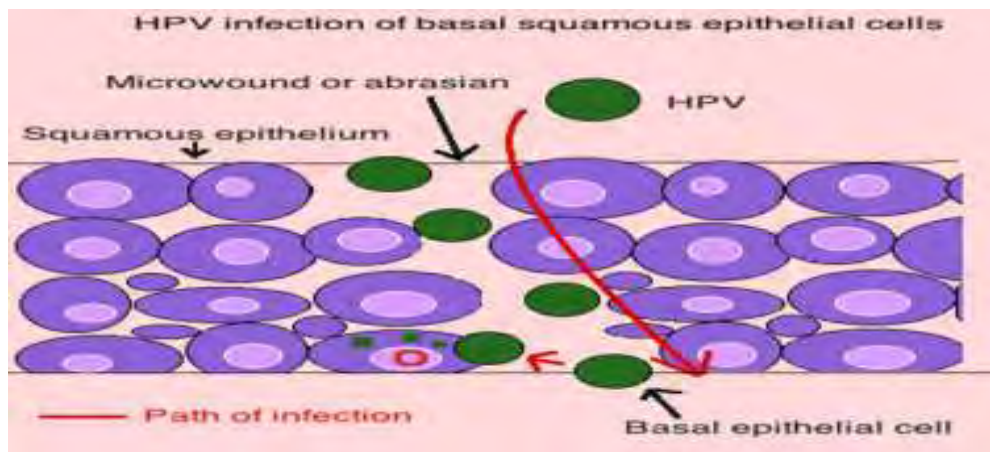
Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

3. Ο κύκλος ζωής των HPV

Γενικά οι HPVs δεν επάγουν τη λύση των κυττάρων και περαιτέρω μολύνσεις λαμβάνουν χώρα από διάχυση του ιού από τα ήδη μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα (Roden R.B. et. al., 2001). Διακρίνουμε δυο είδη κύκλου ζωής του ιού, τον παραγωγικό και τον κύκλο μετασχηματισμού. Στον παραγωγικό κύκλο, το ιικό DNA είναι σαν επίσωμα (παραγωγή ιικών σωματιδίων), ενώ στον κύκλο μετασχηματισμού το ιικό DNA ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου-ξενιστή (ποικίλες κακοήθειες). Ο κύκλος αντιγραφής του ιού είναι στενά συνδεδεμένος με τη διαφοροποίηση του επιθηλίου και την ωρίμανση των κερατινοκυττάρων (Davidson E.J. et. al., 2002, Laimins L.A. 1996). Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο φυσιολογικό κύκλο ζωής του ιού αναλύονται παρακάτω.

3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Οι HPVs μεταδίδονται από την επαφή δέρμα με δέρμα, αλλά πιο συχνά μέσω σεξουαλικής επαφής. Τόσο στη γυναίκα όσο και στον άντρα (Roman A. and Fife K.H. 1989). Η έναρξη της μόλυνσης ξεκινά με πρόσβαση του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας (Galloway D.A. et al., 2003). Οι HPVs μολύνουν τα επιθηλιακά βλαστοκύτταρα που εντοπίζονται στη βασική στιβάδα του πλακωτού επιθηλίου. Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσης του με την θεϊκή ηπαρίνη η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S. et. al., 2003) (Εικόνα 5).



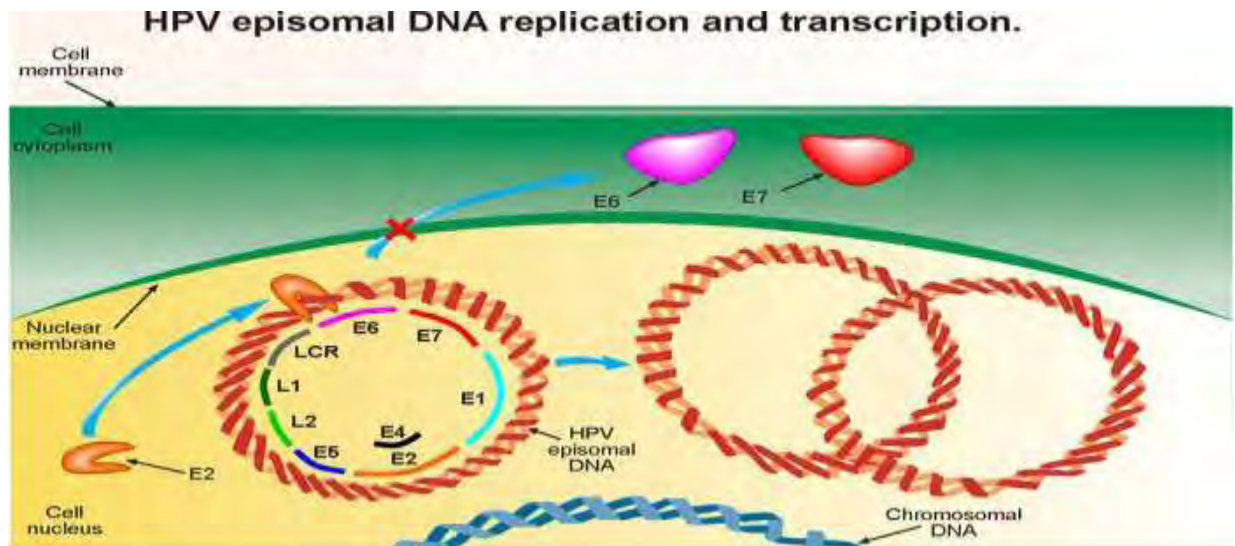
Εικόνα 5. Είσοδος HPV μέσω δέρματος μετά από τραυματισμό

Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon C.S. et. al., 2001). Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έχει προταθεί ότι οι HPV-16 και HPV-58 εισέρχονται σε κυστίδια κλαθρίνης ενώ ο HPV-31 συνδέεται με κυστίδια καβεολίνης (Bousarghin L. et.al., 2003). Έπειτα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2. (Day P.M. et. al., 2004).

3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του γονιδιώματος των HPV κατά τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την ενσωμάτωση, τη διατήρηση και την ενίσχυση (Εικόνα 6). Κατά τη διάρκεια της φάσης της ενσωμάτωσης που ακολουθεί τη μόλυνση, ένα HPV γονιδίωμα μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και ξεκινά αρκετούς γύρους αντιγραφής και φτάνει 50-100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Σε αυτό το σημείο το ιικό γονιδίωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Ακολουθώντας την ενσωμάτωση, το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, κατά τη διάρκεια της φάσης S, με τη διατήρηση ενός σταθερού αριθμού αντιγράφων για περιόδους, που περιορίζεται σε δεκάδες εξαιτίας της ρύθμισης της έκφρασης των E1 και E2 από την E2 πρωτεΐνη (Stegerand Corbach 1997, Stubenrauch et.al., 1998b).

Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffman R. et. al., 2006). Ανάλυση των επιπέδων των ιικών μεταγράφων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA υποδηλώνει ότι η E1 πρέπει να είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ενίσχυσης του ιικού γονιδιώματος (Ozbumand Meyers, 1998a).



Εικόνα 6. Αντιγραφή και μεταγραφή του HPV. Η αντιγραφή του γενετικού υλικού του HPV γίνεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων. Το E2 γονίδιο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα E2, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή των E6 και E7 ογκογονιδίων. Η μεταγραφή των E6 και E7 αυξάνεται μόνο αν εμποδιστεί η δράση του γονιδίου E2.

Μετά τη μόλυνση και έκδυση του ιού, πιστεύεται ότι ο ιός διατηρεί το γένωμά του σαν ένα, χαμηλού αριθμού αντιγράφων, υπερελικωμένο κυκλικό μόριο ή επίσωμα στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Το πρότυπο έκφρασης του ικού γενώματος, σε αυτά τα κύτταρα, δεν είναι καλά καθορισμένο, αλλά γενικά θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες E1 και E2 εκφράζονται με σκοπό να διατηρήσουν το ικό DNA σαν επίσωμα (Wilson V.G. et.al., 2002) και για να διευκολύνουν το σωστό διαχωρισμό των ικών γενωμάτων κατά τη διαίρεση των κυττάρων (You J. et.al., 2004).

Για την παραγωγή μολυσματικών ιών, οι Papilloma ιοί πρέπει να ενισχύσουν τα ικά τους γενώματα και να τα πακετάρουν σε μολυσματικά σωματίδια. Για τους ιούς του γένους Άλφα, όπως οι HPV-16, HPV-11 ή HPV-2, αυτό λαμβάνει χώρα στις ενδιάμεσες ή ανώτερες στιβάδες, όπου γίνεται και η ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή. Η ανιούσα ρύθμιση του όψιμου υποκινητή, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ικού DNA, χωρίς άμεση επίδραση στην έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για την είσοδο στην S φάση (Middleton K. et. al., 2003). Η ενίσχυση του ικού γονιδιώματος αρχίζει σε μια υποομάδα κυττάρων, στα πολλαπλασιαστικά διαμερίσματα και απαιτεί έκφραση όλων των πρώιμων ικών προϊόντων των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των E4 (Peh W.L. et.al., 2004) και E5 (Fehrmann F. et. al., 2003).

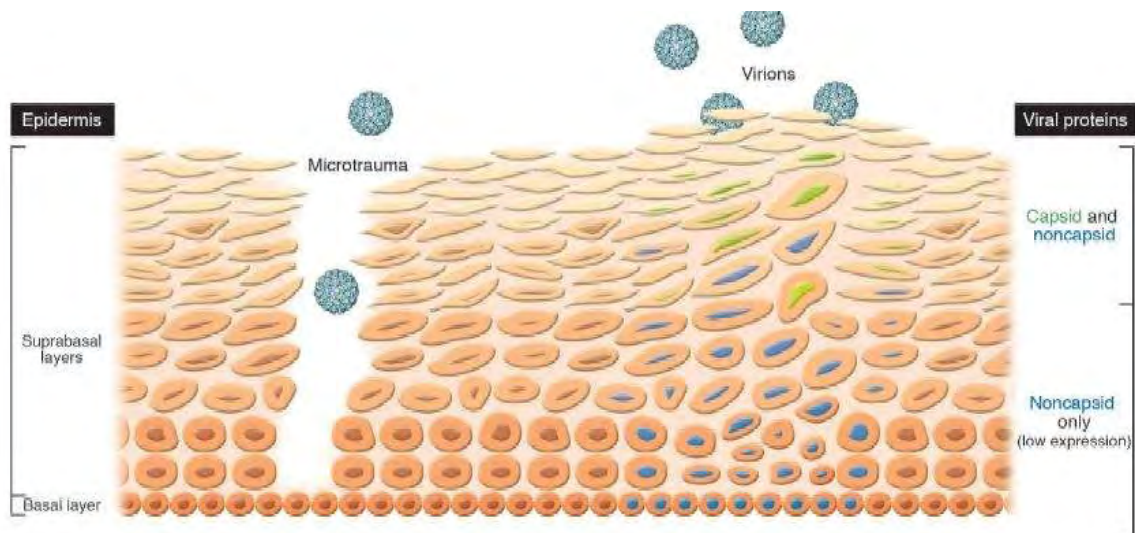
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zhi-Ming Zheng et.al., 2006).

Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1, E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1, L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670. Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (Grassmann K. et. al., 1996).

3.4.Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελικό στάδιο του παραγωγικού κύκλου ζωής του ιού Papilloma απαιτεί το «πακετάρισμα» των αντιγράφων του γενώματος σε ιικά σωματίδια. Αυτό γίνεται με τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες έχουν συσσωρευτεί από την ενίσχυση του ιικού γενώματος που προηγήθηκε, με την έκφραση του γονιδίου L2 να προηγείται του L1 (Florin L. et. al., 2002, Doorbar J. and Gallimore P. 1987). Η σύνθεση των ιικών σωματιδίων στην επιφάνεια του επιθηλίου πιστεύεται ότι απαιτεί εκτός από τις L1 και L2 και τη δράση της E2 (Day P. et.al., 1998, Zhao K. et. al., 2000). Η L2 που εντοπίζεται στην πυρήνα αλληλεπιδρά είτε άμεσα με το DNA είτε με τη βοήθεια της E2 (Fay A. et. al., 2002). Η L1 σχηματίζει καψομερή στο κυτταρόπλασμα πριν μεταφερθεί στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με την L2 για το σχηματισμό των καψιδίων (Florin L. et.al., 2002).



Εικόνα 7. Απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στα μολυσμένα κύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας.

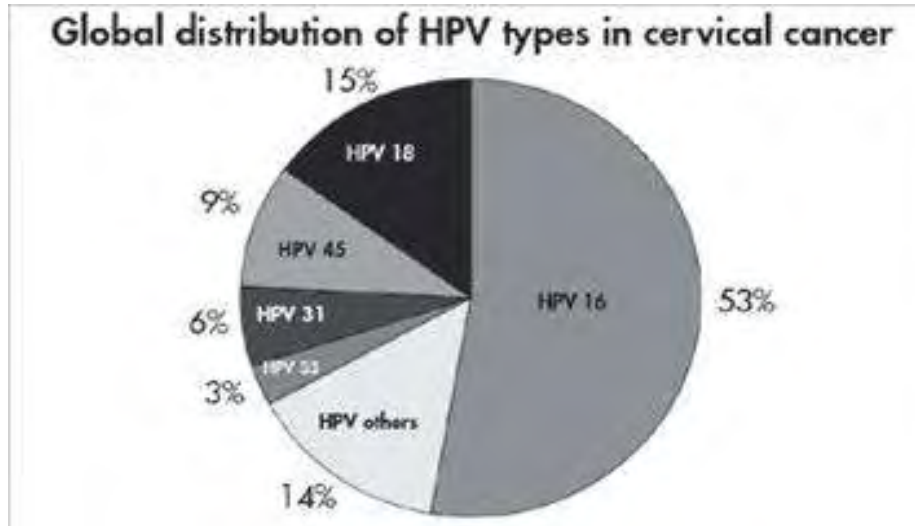
Η παρουσία της L2 σε αυτή την αλληλεπίδραση έχει αποδειχτεί ότι δεν είναι απαραίτητη αλλά χωρίς αυτή, η ικανότητα σχηματισμού των ιικών σωματιδίων μειώνεται δραματικά (Stauffer Y. et.al., 1998). Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από την επιφάνεια του κερατινοποιημένου κυττάρου, όπου πιστεύεται ότι συμμετέχει και η πρωτεΐνη E4, η οποία αποδιοργανώνει το πλέγμα κερατίνης του κυττάρου (Doorbar J. et.al., 1991, Wang Q. et.al., 2004) (Εικόνα 7).

3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A. et.al., 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A. et.al., 2003).

4.Κλινικές Εκδηλώσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ιός HPV 16 είναι ένας από τους πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενους ιούς με περίπου 630 εκατομμύρια άτομα να έχουν μολυνθεί από τον ιό παγκοσμίως ενώ 510.000 από αυτές τις περιπτώσεις θα εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου κάθε χρόνο (World Health Organization 2004). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέραν των 100 διαφορετικών τύπων HPV εκ των οποίων περίπου το ένα τρίτο μολύνει το ουρογεννητικό σύστημα και χαρακτηρίζονται είτε ως υψηλού είτε ως χαμηλού κινδύνου, ανάλογα με την εξέλιξη της αλλοίωσης που προκαλούν. Οι χαμηλού κινδύνου HPV όπως οι τύποι 6, 11, 42, 43, 44 συσχετίζονται συχνά με χαμηλού κινδύνου επιθηλιακής νεοπλασίας (intraepithelial neoplasia, CIN) και καλοήγη θηλώματα (Stone et.al., 1995). Οι υψηλού κινδύνου τύποι όπως οι 16, 18, 31, 33, 45 συσχετίζονται με προκαρκινικές δυσπλασίες και καρκίνο (Munoz et.al., 2003, Remmink et.al., 1995, Schiffman et.al., 1993). Το DNA των HPV ανιχνεύεται στο 99,7% των περιστατικών του καρκίνου του τραχήλου και ιδιαίτερα οι τύποι HPV 16 και 18 οι οποίοι ενοχοποιούνται περίπου στο 68% των περιστατικών (Walboomer et.al., 1999) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ποσοστά διαφόρων τύπων HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

4.1. Τρόπος μετάδοσης των HPV

Οι HPV μεταδίδονται κυρίως μέσω δερματικής επαφής. Τα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των ιστών που έχουν μολυνθεί και με τη σειρά τους μολύνουν άλλα κύτταρα του ίδιου οργανισμού ή κάποιου άλλου που έρχεται σε επαφή με αυτόν μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι μετάδοσης του ιού όπως και παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από αυτόν. Αυτοί οι τρόποι περιλαμβάνουν:

Τη σεξουαλική επαφή. Το 95% των ατόμων με HPV μολύνθηκε μέσω σεξουαλικής επαφής. Γυναίκες με πολλαπλούς συντρόφους έχουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης μόλυνσης από HPV.

Κατακόρυφη μετάδοση. Μετάδοση από μολυσμένη με τον ιό μητέρα στο νεογέννητο. Αυτού του είδους η μετάδοση είναι λιγότερο συνηθισμένη.

Οριζόντια μετάδοση. Αυτού του είδους η μετάδοση συμβαίνει σε περιπτώσεις παιδεραστίας.

Μετάδοση χωρίς σεξουαλική επαφή. Αυτό μπορεί να συμβεί με επαφή με ουρογεννητικά υγρά.

Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης είναι η σεξουαλική συμπεριφορά του ατόμου, π.χ. γυναίκες με πολλαπλούς συντρόφους παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης. Γυναίκες με ηλικία 15 ως 25 ετών έχουν διπλάσια πιθανότητα να μολυνθούν από HPV (American Journal of Medical Science AJMS, Lippincott Williams and Wilkins), καθώς και άτομα που είναι ανοσοκατεσταλμένα ή με αδύναμα ανοσοποιητικά συστήματα.

Συμπτώματα	Στέλεχος
Θηλώματα του πέλματος (μυρμηγκιές)	HPV-1,2,4,63
Μωσαικά θηλώματα	HPV-2,27,57
Επιδερμικές αλλοιώσεις (Μη θηλωματικές)	HPV-37,38
Αναπνευστική παπιλλομάτωση	HPV- 6,11
Καρκίνος των πνευμόνων	HPV- 6,11,16,18
Κονδυλώματα στον λάρυγγα	HPV-6,11,30
Καρκίνος στον λάρυγγα	HPV-16,18
Κονδυλώματα στην κοιλότητα της γνάθου	HPV-16,18
Στοματική επιθηλιακή υπερπλασία	HPV-13,32
Καρκίνος στο στόμα	HPV-16,18
Στοματική λευκοπλακία	HPV-16,18
Καρκίνος στον οισοφάγο	HPV-16,18
Γιγάντια κονδυλώματα (Buschke-Lowensteintumor)	HPV-6,11
Κοινά θηλώματα	HPV-1,2,4,26,27,29,41,57,65

Πίνακας 3. Συμπτώματα από μόλυνση με τα διάφορα είδη HPV

5.Εργαστηριακή διάγνωση

Οι HPV δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες και οι ορολογικές μέθοδοι έχουν περιορισμένη ακρίβεια (Dillner J. 1999). Καθώς η μόλυνση με HPV ακολουθείται από μια χυμική ανοσολογική απάντηση ενάντια στη μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη, με τα αντισώματα να παραμένουν ανιχνεύσιμα για πολλά χρόνια, ορολογικά δεν μπορούμε να διακρίνουμε τις παρούσες με τις παλαιότερες μολύνσεις. Συνεπώς, η ακριβής διάγνωση για μόλυνση με HPV στηρίζεται στην ανίχνευση του ιικού νουκλεϊκού οξέος. Ωστόσο, η πρώτη εξέταση γίνεται κυτταρολογικά με μικροσκοπική ανίχνευση των ανώμαλων επιθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, για την εξέταση μόλυνσης του τραχήλου ακολουθείται ακόμα και σήμερα το τεστ Παπανικολάου (Pap test).

5.1.Pap test

Το Pap test (τεστ Παπανικολάου) είναι ένα τραχηλικό τεστ που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό κυτταρικών ανωμαλιών και την ύπαρξη των ιών Papilloma σε επιθηλιακά κύτταρα που παρατηρούνται μικροσκοπικά για τυχόν αλλοιώσεις.

Οι αρχικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση των HPV ήταν η υβριδοποίηση ανιχνευτών, όπως αυτή του Dot Blot και Southern Blot. Αυτές οι μέθοδοι ήταν χρονοβόρες, είχαν χαμηλή ευαισθησία και απαιτούσαν πολύ DNA στα κλινικά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι αντικαταστάθηκαν από άλλες που βασίζονται στην ενίσχυση του DNA και επιτρέπουν την ανίχνευση πολύ χαμηλού αριθμού αντιγράφων του ιικού DNA στα κλινικά δείγματα. Δυο τέτοιες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για διάγνωση περιλαμβάνουν την PCR και το Hybrid Capture II (HCII) (Suzanne M. et.al., 2006).

5.2.Hybrid Capture II test

Το Hybrid Capture II σύστημα είναι μια μη-ραδιενεργή μέθοδος ενίσχυσης σήματος, βασισμένη στον υβριδισμό σημασμένων DNA ανιχνευτών (probes) με το DNA του HPV στόχου. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα εύρος DNA ανιχνευτών, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες από 13 υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) και 5 χαμηλού κινδύνου (6, 11, 42, 43, 44) τύπους HPV.

Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των τύπων HPV με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση HPV λοίμωξης από ότι το Pap test και το HybridCapture- II test. (Clavel et.al., 2001, Cuzick et.al., 1999, Schiffman et.al., 2000).

5.3.Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR

5.3.1 PCR με εκκινητικά μόρια MY09/MY11 και GP5+/GP6+.

Η PCR είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των HPV μολύνσεων. Υπάρχουν διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων DNA για την ανίχνευση των HPV. Ωστόσο οι PCR που χρησιμοποιούν εκκινητές που ενισχύουν την συντηρημένη περιοχή L1 του ιού χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικές μελέτες. Τέτοια συστήματα ενίσχυσης για την ανίχνευση των HPV είναι η PCR με συνδυασμό εκκινητών MY09/MY11 (MY-PCR) και η PCR με GP5+/GP6+. Το δύο αυτά συστήματα έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία αλλά διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης σε κάποιους τύπους HPV. Το MY09/MY11 είναι ένα μείγμα 25 εκκινητών ικανών να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα τύπων HPV. Τα προϊόντα της MY-PCR έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη και να υποβληθούν σε υβριδισμό με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές ειδικούς για τους διάφορους τύπους HPV. Τέλος οι μεμβράνες εμφανίζονται με

αυτοραδιογραφία. Γενικά το σύστημα MY09/MY11 φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστο για τον εντοπισμό πολλαπλών μολύνσεων (Weimin Quetal, 1997).

5.3.2. PCR σε συνδυασμό με Microarrays.

Ακόμη ένας τρόπος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV με μεγάλη ακρίβεια είναι αυτός του συνδυασμού της απλής PCR με τη μέθοδο των Microarrays. Τα microarrays είναι μια νέα μέθοδος που χρησιμοποιεί τον υβριδισμό των σημασμένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια πλάκα η οποία διαβάζεται από ένα scanner. Η μέθοδος που κάνει χρήση της PCR και των microarrays ονομάζεται PCR/APEX. Η PCR/APEX χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου με την ενίσχυση του E7 γονιδίου του ιού. Το E7 είναι αρκετά συντηρημένο σε κάποια σημεία του γονιδίου αλλά και αρκετά ποικιλόμορφο σε κάποια άλλα ώστε να επιτρέπει την ταυτοποίηση. Στην μέθοδο της PCR/APEX αρχικά πραγματοποιείται μια multiplex PCR με διαφορετικούς primers για κάθε τύπο HPV. Στην συνέχεια τα προϊόντα μετά από ειδική επεξεργασία τοποθετούνται σε microarray chip με αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα τμήμα του γονιδίου E7 για να λάβει χώρα ο υβριδισμός. Μετά τον υβριδισμό το chip ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τυχόν μη υβριδοποιημένα νουκλεοτίδια και σαρώνεται για να εντοπιστούν οι θέσεις υβριδισμού που φθορίζουν δίνοντας έτσι σήμα που επεξεργάζεται από κατάλληλο λογισμικό. Το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να αναδειχθούν οι συμπληρωματικές αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τον τύπο του HPV (Gheit T. et.al., 2006).

5.3.3 Real time PCR

Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους PCR, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV, χρησιμοποιείται επίσης η 'real time PCR'. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια της μεθόδου είναι σχεδιασμένα, έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6-E7 των HPV υψηλής επικινδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους

ογκογόνους τύπους των HPV και παραμένουν άθικτα και στην επισωματική μορφή και στην ενσωματωμένη τους μορφή στο γένωμα του ξενιστή. Εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

5.3.4. Nested Multiplex PCR.

Μια σημαντική μέθοδο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV είναι η Nested Multiplex PCR, η οποία εφαρμόζεται και στο εργαστήριο μας. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου. Από την διαδικασία δημιουργείται ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων των γονιδίων E6 και E7, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετά διαθέσιμο υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με Nested Multiplex PCR. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται εν συνεχεία τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού . Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές συνήθως χρησιμοποιούνται σε μείγματα (cocktails). Εντός των μειγμάτων οι τύπο-ειδικοί εκκινητές οργανώνονται μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους (Sotlar K. et.al., 2004).

6. Υλικά και μέθοδοι

6.1 Κλινικά δείγματα

Συνολικά 53 δείγματα θετικά στον ιό HPV16 ελήφθησαν από: κολπικά επιχρίσματα (7 δείγματα, A3, A4, A6, A13, A31, PNL7 και PNL16) και τη διαδικασία του ThinPrep (46 δείγματα). Συγκεκριμένα, 23 δείγματα διαγνώστηκαν ως ενδοεπιθηλιακά νεοπλάσματα υψηλής επικινδυνότητας (CIN II και III), 28 ως χαμηλής επικινδυνότητας ενδοεπιθηλιακά κολπικά νεοπλάσματα, ενώ δυο κολπικά δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως κολπικοί καρκίνοι. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από ασθενείς που πραγματοποιούσαν το ετήσιο τέστ Pap, ενώ τα επιχρίσματα από ασθενείς με μη φυσιολογικό ιστορικό επιχρισμάτων. Το εύρος των ηλικιών των ασθενών ήταν 25-60 χρονών.

Το DNA από τα δείγματα ThinPrep εκχυλίστηκε με τη βοήθεια του χαοτροπικού παράγοντα θειοκυανική γουανιδίνη (GuSCN), ενώ από τα κολπικά επιχρίσματα με τη μέθοδο που περιγράφει ο Puramen και οι συνεργάτες (1996). Η ποιότητα του εκχυλισμένου DNA αξιολογήθηκε με ενίσχυση με PCR ενός τμήματος μεγέθους 498 ζευγών βάσεων του ανθρώπινου γονιδίου της β-ακτίνης.

6.2 Ενίσχυση E6-E7 με PCR

Τα κολπικά δείγματα υποβλήθηκαν σε ενίσχυση με PCR για τα γονίδια E6-E7 του HPV16 με εκκινητές τους : **HPV-16 41 59-AGCGACCCAGAAAGTTACCA-39/HPV-16 757 59-ATGGGGCACACAATTCCTAG-39**

Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Η αρίθμηση των θέσεων των νουκλεοτιδίων βασίστηκε στην αλληλουχία του πρότυπου στελέχους του HPV16. Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ενισχύσει το E6 και το E7 γονίδιο του HPV16. Ο πρόσθιος εκκινητής υβριδίζεται 20 ζεύγη βάσεων καθοδικά του σημείου έναρξης μεταγραφής του E6 γονιδίου του HPV16, ενώ ο αντίστροφος εκκινητής υβριδίζεται 10 ζεύγη βάσεων ανοδικά από το 3' άκρο του E7 γονιδίου.

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Το μείγμα της PCR περιείχε 50 pmol από κάθε εκκινητή, 5x Green Go Taq Flexi buffer (Promega), 2 mM MgCl₂, 1

mMdnTPs και 1.25 U thermostable DNA Polymerase (GoTaq, Promega). Οι συνθήκες των κύκλων της PCR ήταν οι ακόλουθες: 40 κύκλοι των 40s στους 95°C, 50s στους 55°C και 1min στους 72°C. Ο πρώτος κύκλος διεκπεραιώθηκε μετά από ένα βήμα μετουσίωσης για 2 λεπτά στους 95°C και ο τελευταίος κύκλος ακολουθήθηκε από ένα βήμα επιμήκυνσης για 5 λεπτά στους 72°C.

6.3 Κλωνοποίηση και αλληλούχιση E6-E7 γονιδίων

Τα αντίγραφα μεγέθους 715 ζευγών βάσεων των E6-E7 γονιδίων του HPV16 συνδέθηκαν με ένα pGEMT-easy φορέα (Promega) και κλωνοποιήθηκαν μέσα σε δεκτικά κύτταρα Escherichia Coli DH5a. Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA καθαρίστηκε με τη βοήθεια του Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel GmbH) και τα πλασμίδια υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen (Amsterdam, NL). Για να διαπιστωθούν νουκλεοτιδικές παραλλαγές, έγιναν δυο διαφορετικές δοκιμές με PCR για κάθε ένα κολπικό δείγμα και τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε κλωνοποίηση. Απομονώθηκαν τρεις κλώνοι από κάθε προϊόν PCR.

Για να αναγνωριστούν νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και αντικαταστάσεις αμινοξέων στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των E6 και E7 έγιναν πολλαπλές ευθυγραμμίσεις αλληλουχίας με τον αλγόριθμο Muscle μέσω του προγράμματος Megav.5 ((Edgar, 2004; Tamura et al., 2007). Η ευθυγράμμιση έγινε μεταξύ των κλωνοποιημένων αλληλουχιών E6-E7 και των αλληλουχιών αναφοράς του γονιδιώματος του HPV16, που είναι διαθέσιμο στην HPV16 Sequence Database (Los Alamos National Laboratory).

6.4 Φυλογενετική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί ενδοτυπικοί πολυμορφισμοί αλληλουχίας μέσα στα γονίδια E6 και E7 για να κατηγοριοποιηθούν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες στις αντίστοιχες HPV16 παραλλαγές. Για να εξεταστεί η φυλογενετική ομαδοποίηση των κλωνοποιημένων αλληλουχιών των E6 και E7 του HPV16, έγινε πολλαπλή αλληλουχική αντιστοίχιση μεταξύ των κλωνοποιημένων αλληλουχιών των E6 και E7, της αλληλουχίας αναφοράς του HPV16 που είναι διαθέσιμη στην HPV16 Sequence Database, και των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών των παραλλαγών του HPV16,

που είναι διαθέσιμες στην GenBank Sequence Database με αριθμό καταχώρησης για την Ευρωπαϊκή παραλλαγή AF536179 (European-German type), AY686580, AY686581, AF125673 και FJ006723 (North American), για την Ανατολική Ασιατική παραλλαγή AF534061, για την Αφρικανική παραλλαγή τύπου IAF472508 και AF536180, για την Αφρικανική παραλλαγή τύπου II AF472509 και για την Ασιατική Αμερικάνικη παραλλαγή, AF402678. Η αλληλουχική αντιστοίχιση έγινε με τον αλγόριθμο Muscle του προγράμματος Megav.5 (Tamura et al., 2007).

6.5 Ανάλυση διαλογής και ανασυνδυασμού

Μέθοδοι μέγιστης πιθανότητας (Maximum Likelihood) και εμπειρικής Bayesian (EB) (empirical Bayesian) εφαρμόστηκαν με σκοπό να διαπιστωθεί η επιλεκτική πίεση που ασκείται πάνω στα γονίδια E6 και E7. Στην ανάλυση μέγιστης πιθανότητας εφαρμόστηκε το μοντέλο fixed effects likelihood (FEL) στον Data monkey server (Kosakovsky Pond&Frost, 2005; Suzuki&Gojobori, 1999) με σκοπό να διαπιστωθεί η επιλεκτική πίεση. Η μέθοδος FEL εκτιμά με εύρος μεταξύ dN (μη συνώνυμες αλλαγές ανά μη συνώνυμη πλευρά) και dS (συνώνυμες αλλαγές ανά συνώνυμη πλευρά) σε κάθε πλευρά. Η μέθοδος FEL θέτει ένα κωδικόνιο σαν θετική επιλογή στο 0.05 P-value cut-off (Carvajal-Rodriguez, 2008). Η εφαρμογή της ανάλυσης EB έγινε μέσω του προγράμματος Selection 2.4 (Stern et.al., 2007), χρησιμοποιώντας το μέγιστο επίπεδο ακριβείας. Επιπροσθέτως στην ανάλυση Bayesian εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι Markov chain Monte Carlo μέσω του προγράμματος BEASTv.1.6.2 ((Drummond&Rambaut, 2007). Η ανάλυση Bayesian αποτελούνταν από τέσσερις αλυσίδες με τυχαία εναρκτήρια δέντρα. Η σύγκλιση αξιολογήθηκε με αποτελεσματικές τιμές μεγέθους δείγματος, μετά από burning 1×10^6 βημάτων. Το μέσο εύρος μετάλλαξης στην πρώτη, δεύτερη και τρίτη θέση του κωδικονίου στα αναγνωστικά πλαίσια των E6 και E7 εκτιμήθηκε μέσω του Tracerv.1.5 μέσα στο λογισμικό του BEAST. Τα μοντέλα general time reversible (GTR) και Gamma substitution επιλέχθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο του Akaike information από το online λογισμικό της FindModel (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος single recombination breakpoint (SBP) στον server

Datamonkey (Kosakovsky Pond et.al., 2006), για να προσδιοριστεί τυχόν σήμα ανασυνδυασμού.

6.6 Φυλογενετικό δέντρο

Δημιουργήθηκε ένα δέντρο μέγιστης πιθανότητας από τη στοίχιση της αλληλουχίας αναφοράς του HPV16 E6, τις κλωνοποιημένες E6 αλληλουχίες της παρούσας μελέτης (Πίνακες 7.1 και 7.2) και τις HPV16 E6 αλληλουχίες που παρουσιάστηκαν στη μελέτη Carvajal-Rodriguez (2008) (Εικόνα 7.1). Έτσι ήταν δυνατό να εκτιμηθεί το πως ταξινομούνται οι αλληλουχίες της παρούσας μελέτης όσον αφορά τα κωδικόνια 10, 14 και 83. Πριν τη φυλογενετική εκτίμηση, το online λογισμικό FindModel χρησιμοποιήθηκε για να εντοπίσει το καλύτερο εξελικτικό μοντέλο που αναφέρεται παραπάνω. Για το φυλογενετικό δέντρο του E6 χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο GTRplus Gamma nucleotide substitution. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαθέσιμες στην GenBank με τους ακόλουθους αριθμούς καταχώρησης: για την Ευρωπαϊκή παραλλαγή AF125673, AY686583, AY686580, AY686584 και AF536179 (European-German type), για την Ανατολική Ασιατική παραλλαγή AF534061, για την Αφρικανική τύπου I παραλλαγή AF472508 και AF536180, για την Αφρικανική τύπου II παραλλαγή AF472509 και για την Ασιατική Αμερικάνικη παραλλαγή AF402678, AY686579 και AY686582.

7. Αποτελέσματα

7.1 Παραλλαγές αλληλουχίας E6-E7

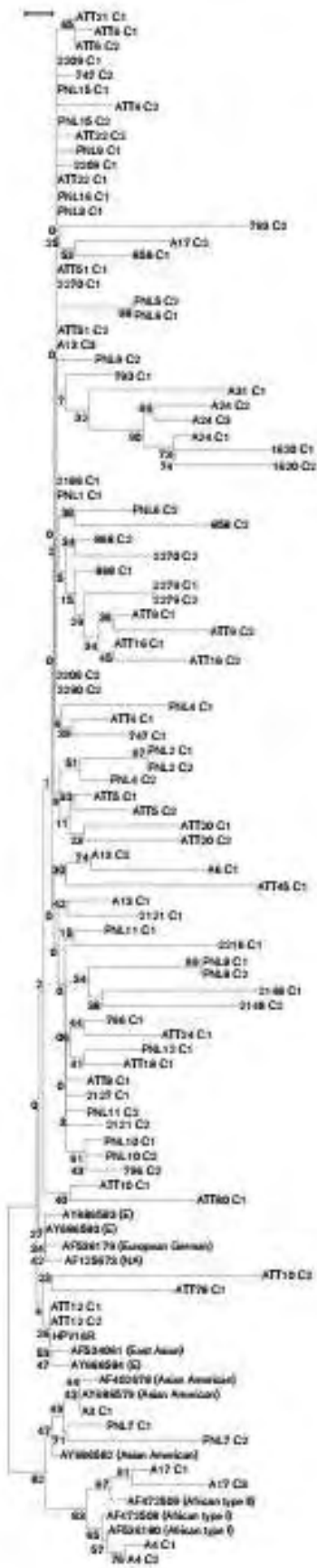
Η αλληλουχική ανάλυση του HPV16 E6 γονιδίου έδειξε ότι η ιική περιοχή είναι πολυμορφική. Το πιο συχνά παρατηρούμενο νουκλεοτίδιο αλλάζει το T350G που προκαλεί την υποκατάσταση του αμινοξέος L83V. Σε περιπτώσεις υψηλού κινδύνου η νουκλεοτιδική παραλλαγή T350G ανιχνεύθηκε στο 69.6% των κολπικών δειγμάτων, ενώ σε δυσπλασίες χαμηλού κινδύνου, ο πολυμορφισμός T350G ανιχνεύθηκε στο 64.3% των κολπικών δειγμάτων (Πίνακες 7.1 και 7.2). Επιπλέον οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές A184G, G201A, G219A, A280T, T302A, A336G, G514A, C523T και C539T εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 7.1). Οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές στις θέσεις 184, 201, 219, 302, 336, 514, 539 περιελάμβαναν τις αμινοξικές υποκαταστάσεις I27M, C33Y, R39Q, L67I, H78R, M137I και R146C, αντίστοιχα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν μέσα στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του E6, δυο σιωπηλές μεταλλάξεις (A280T, C523T).

Οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές A184G, G201A, G219A, C523T και C539T εντοπίστηκαν σε δείγματα υψηλού και χαμηλού κινδύνου (Πίνακας 7.1). Επίσης, η σιωπηλή νουκλεοτιδική μετάλλαξη A280T εντοπίστηκε σε κλωνοποιημένες αλληλουχίες, οι οποίες προήλθαν από τα υψηλού κινδύνου κολπικά δείγματα ATT5 και ATT20, καθώς και στο χαμηλού κινδύνου δείγμα PNL2, ενώ οι νουκλεοτιδικές αλλαγές T302A, A336G και G514A εντοπίστηκαν μόνο σε χαμηλού κινδύνου ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (Πίνακας 7.1). Οι πρόσφατα εντοπισμένες νουκλεοτιδικές παραλλαγές εντοπίστηκαν σε στελέχη του HPV16 που περιέχουν την T350G νουκλεοτιδική παραλλαγή. Παρόλα αυτά η G219A παραλλαγή εντοπίστηκε τόσο στην Ευρωπαϊκή παραλλαγή, όσο και στην Αφρικανικού τύπου II. Πιο συγκεκριμένα, η G219A βρέθηκε στο χαμηλού κινδύνου δείγμα 2279 και στο υψηλού κινδύνου δείγμα ATT9 τα οποία χαρακτηρίζονται ως Ευρωπαϊκές παραλλαγές. Επιπλέον η G219A ανιχνεύτηκε σε δυο κλωνοποιημένες αλληλουχίες που προήλθαν από το χαμηλού κινδύνου δείγμα A17 (A17 C1, A17 C2), που χαρακτηρίζονται ως Αφρικανικού τύπου II (Πίνακες 7.1 και 7.2).

Η αλληλουχική ανάλυση του HPV16 E7 γονιδίου αποκάλυψε ότι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης φαίνεται να είναι πιο συντηρημένο μεταξύ των διακριτών HPV16 παραλλαγών. Παρόλα αυτά αναγνωρίστηκαν 7 νουκλεοτιδικές αλλαγές για πρώτη φορά σε αυτήν εδώ τη μελέτη. Οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές C565T, T596A, G685A, G813A, G814A, G815A και C818T εντοπίστηκαν σε κολπικά δείγματα που περιείχαν τη νουκλεοτιδική παραλλαγή T350G. Αυτές οι παραλλαγές επάγουν τις αμινοξικές παραλλαγές H2Y, M12K, A42T, M84I, G85S, G85D και T86I, αντίστοιχα. Οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές T596A, G685A, G814A, G815A και C818T εντοπίστηκαν τόσο σε υψηλού, όσο και σε χαμηλού κινδύνου κολπικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (Πίνακας 7.1). Σε αντίθεση οι νουκλεοτιδικές αλλαγές C565T, G813A καταγράφηκαν μόνο σε χαμηλού κινδύνου περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, η C565T εντοπίστηκε στα χαμηλού κινδύνου A24 και 1620, ενώ η G813A εντοπίστηκε σε δυο κλωνοποιημένες αλληλουχίες που προήρθαν από τα κολπικά δείγματα A24 (A24 C2, A24 C3) και το χαμηλού κινδύνου δείγμα 858 (Πίνακας 7.1).

7.2 Προσδιορισμός HPV16 παραλλαγών

Συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλλαγές στα γονίδια E6 και E7 έχουν συσχετιστεί με τις 5 μεγαλύτερες φυλογενετικές ομάδες: Ευρωπαϊκή E-G350 (T350G), E-C109G (T109C, T350G), E-G131G (A131G, T350G), Ανατολική Ασιατική (T178G, A647G), Αφρικανικού τύπου I (G132C, C143G, G145T, T286A, A289G, C335T, T789C, T795G), Αφρικανικού τύπου II (T109C, G132T, C143G, G145T, T286A, A289G, C335T, G403G, A647G, T789C, T795G) και Ασιατική Αμερικάνικη (G145T, T286A, A289G, C335T, T350G, A532G, T732C, T789C, T795G) (Wu et.al., 2006; Swan et.al., 2005; Wheeler et.al., 1997; Yamada et.al., 1995, 1997). Σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική ανάλυση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των E6 και E7, η πρότυπη αλληλουχία του HPV16 ανιχνεύτηκε σε δέκα δείγματα χαμηλού κινδύνου (2121, 2127, 2148, 2216, 796, ATT8, ATT10, ATT12, ATT18, ATT45) και σε έξι δείγματα υψηλού κινδύνου (PNL8, PNL10, PNL11, PNL12, ATT20, ATT24) (Πίνακες 7.1 και 7.2).



Εικόνα 7.1. Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανότητας από τη στοίχιση της πρότυπης αλληλουχίας του Ε6 γονιδίου του HPV16 , τις κλωνοποιημένες αλληλουχίες του Ε6 που προήλθαν από την παρούσα μελέτη καθώς και αλληλουχίες των κωδικονίων 10, 14 και 83. Φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις θετικής εξέλιξης έδειξαν ότι το κατάλοιπο 83 (L83V), υπέστη θετική επιλογή στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό.

Επιπλέον, αλληλουχίες Ευρωπαϊκού τύπου καταγράφηκαν σε 18 δείγματα χαμηλού και σε 15 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας . Αλληλουχίες Ασιατικού Αμερικάνικου τύπου βρέθηκαν στο κοιλικό δείγμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας Α3 και στο καρκινικό δείγμα PNL7, ενώ αλληλουχία Αφρικανικού τύπου Ι βρέθηκε στο κοιλικό δείγμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας Α4. Το καρκινικό δείγμα PNL16 χαρακτηρίστηκε Ευρωπαϊκού τύπου. Επιπλέον, δυο διαφορετικοί τύποι HPV16 βρέθηκαν στο δείγμα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας Α17. Συγκεκριμένα, μια κλωνοποιημένη αλληλουχία του δείγματος Α17 (Α17 C2) χαρακτηρίστηκε Ευρωπαϊκού τύπου, ενώ δυο άλλες κλωνοποιημένες αλληλουχίες, Α17 C1 και Α17 C3, βρέθηκε ότι ήταν Αφρικανικού τύπου ΙΙ. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα παρουσίας τόσο Αφρικανικού τύπου ΙΙ όσο και Ευρωπαϊκού στο δείγμα Α17, εξαιτίας της αλληλούχισης δύο μόνο προϊόντων PCR.

7.3. Ανάλυση διαλογής και ανασυνδυασμού

Αναλύσεις μοριακής εξέλιξης για το γονίδιο E6 αποκάλυψαν ότι τα σχετικά ποσοστά υποκατάστασης για τα τρία κωδικόνια ήταν CP1=0.826, CP2=1.015, CP3=1.159, ενώ μια αντίστοιχη ανάλυση για το E7 εκτιμήθηκε στα CP1=0.728, CP2=1.2 και CP3=1.07. Μόνο με τη μέθοδο EB (Stern et.al., 2007) εντοπίστηκε το κωδικόνιο σαν θέση θετικής επιλογής. Επιπλέον στο γονίδιο E7 ανιχνεύτηκε και με τη μέθοδο EB και με τη ML το κωδικόνιο 85 ως θέση θετικής επιλογής, αλλά μόνο με την EB ήταν το εύρημα στατιστικά σημαντικό. Το φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανότητας (Εικόνα7.1) για τις αλληλουχίες της παρούσας μελέτης και για τα κωδικόνια 10, 14 και 83 (βασισμένη σε προγενέστερη εργασία των Carvajal-Rodriguez, 2008) αποκάλυψε μια επαρκή κατηγοριοποίηση του γονιδιώματος του HPV16 στο αντίστοιχο φυλογενετικό κλαδί. Επιπλέον το πρόγραμμα SBP (KosakovskyPondetal., 2006) αποκάλυψε ότι δεν υπήρχε ανασυνδυασμός στην πολλαπλή αλληλουχική στοίχιση μεταξύ των κλωνοποιημένων αλληλουχιών E6 και E7, την αλληλουχία αναφοράς του HPV16 και των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών για κάθε παραλλαγή του HPV16.

8. Συζήτηση

Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να κατανοήσουμε τη γονιδιακή εξέλιξη του γονιδιώματος του HPV16, μέσω της μελέτης της γονιδιακής ποικιλομορφίας και εξέλιξης των ογκογονιδίων E6 και E7. Σύμφωνα με την αλληλουχική ανάλυση, ανιχνεύτηκαν συγκεκριμένοι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και χρησιμοποιήθηκαν για να ερευνηθεί η ενδοτυπική ετερογένεια του HPV16 γονιδιώματος στον ελληνικό πληθυσμό. Η πιο συχνά απαντούμενη παραλλαγή του HPV16 ήταν η Ευρωπαϊκή (T350G), η οποία ακολουθεί το πρότυπο στέλεχος του HPV16 (Πίνακες 1 και 2) (Zuna et.al., 2009; Andersson et.al., 2000). Συγκεκριμένα η Ευρωπαϊκή παραλλαγή (T350G) βρέθηκε στο 65.2% των περιπτώσεων υψηλού βαθμού δυσπλασίας και στο 64.2% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, ενώ το πρότυπο στέλεχος (350T) ανιχνεύτηκε στο 26.1% των δειγμάτων υψηλού και στο 35.7% των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (Πίνακες 1 και 2). Η νουκλεοτιδική μετάλλαξη T350G αντιστοιχεί στην αμινοξική υποκατάσταση L83V, η οποία είναι μια από τις μεταλλάξεις που υπόκεινται σε θετική επιλογή (Chen et.al., 2005; DeFilippis et.al., 2002; Carvajal-Rodriguez, 2008). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η μετάλλαξη L83V του HPV16 E6 κυριαρχεί σε τύπους υψηλού κινδύνου και σχετίζεται με την εξέλιξη της κολπικής κακοήθειας (Grodzki et.al., 2006; Andersson et.al., 2000; Yamada et.al., 1997). Στην παρούσα μελέτη, η μετάλλαξη L83V του E6 ανιχνεύτηκε στο 69.5% των περιπτώσεων υψηλού βαθμού δυσπλασίας και στο 64.28% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας. Επιπλέον, η μετάλλαξη L83V βρέθηκε σε δυο περιπτώσεις κολπικού καρκίνου (PNL7 και PNL16). Η διαφορά μεταξύ των κακοηθειών υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το πρότυπο στέλεχος και η E6 μετάλλαξη L83V επικρατούν σε χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειες στις Ελληνίδες.

Προηγούμενες μελέτες πρότειναν ότι συγκεκριμένες ενδοτυπικές παραλλαγές πιθανόν να επηρέαζαν την εξέλιξη προ-καρκινικών τύπων, σε καρκίνο. Συγκεκριμένα, προτάθηκε ότι υπάρχει μια ισχυρή σχέση μεταξύ της Ασιατικής Αμερικάνικης παραλλαγής με την ανάπτυξη του κολπικού καρκίνου (Sanchez et.al., 2011; Tornesello et.al., 2011; Quint et.al., 2010; Junes-Gill et.al., 2008). Σύμφωνα με

αλληλουχικές αναλύσεις των κλωνοποιημένων αλληλουχιών E6-E7 και των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών για κάθε παραλλαγή του HPV16, μη Ευρωπαϊκές παραλλαγές βρέθηκαν μόνο σε τέσσερα δείγματα (PNL7, A3, A4, A17). Η Ασιατική Αμερικάνικη παραλλαγή εντοπίστηκε στο δείγμα PNL7, διαγνώστηκε σαν επιθετικός καρκίνος και στο δείγμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας A3 (Πίνακας 7.1). Παρόλα αυτά δυο E6-E7 κλωνοποιημένες αλληλουχίες που προήλθαν από το χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δείγμα A17, χαρακτηρίστηκαν Αφρικανικού τύπου II, ενώ μια κλωνοποιημένη E6-E7 αλληλουχία που προήλθε από το χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δείγμα A17, χαρακτηρίστηκε ως Ευρωπαϊκού τύπου (Πίνακες 7.1 και 7.2). Αυτή ήταν η μοναδική μικτή μόλυνση που καταγράφηκε στην παρούσα μελέτη, αν και ένα εναλλακτικό γεγονός δεν μπορεί να αποκλειστεί εξαιτίας της αλληλούχισης δυο μόνο προϊόντων PCR. Επιπλέον, το κολπικό δείγμα A4 χαρακτηρίστηκε Αφρικανικού τύπου I. Λαμβάνοντας υπόψη μας αυτά τα δεδομένα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μη-Ευρωπαϊκού τύπου παραλλαγές κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό και εντοπίζονται σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου κακοήθειες.

Αλληλουχική ανάλυση του E6 γονιδίου αποκάλυψε σημαντική αλληλουχική ετερογένεια, ομαδοποιώντας τις παραλλαγές του HPV16 σε διακριτά φυλογενετικά κλαδιά (Pande et.al., 2008; Swan et.al., 2005; Wheeler et.al., 1997; Yamada et.al., 1995, 1997). Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκαν εννιά νέες νουκλεοτιδικές παραλλαγές (A184G, G201A, G219A, A280T, T302A, A336G, G514A, C523T και C539T). Συγκεκριμένα, οι νουκλεοτιδικές παραλλαγές A184G, G201A, G219A, T302A και A336G προκαλούν τις αμινοξικές μεταλλάξεις I27M, C33Y, R39Q, L67I και H78R, αντίστοιχα. Αυτές οι αμινοξικές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στην αμινο-τελική περιοχή της E6 ογκοπρωτεΐνης (Ghittoni et.al., 2010; Boulet et.al., 2007). Επιπλέον, οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις G514A και C539T προκαλούν τις αμινοξικές υποκαταστάσεις M137I και R146C, αντίστοιχα. Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην καρβοξυτελική περιοχή της E6 πρωτεΐνης στο δακτύλιο Zn^{2+} (Ghittoni et.al., 2010; Boulet et.al., 2007). Επιπλέον, η νουκλεοτιδική παραλλαγή A280T και C523T δεν προκάλεσαν αμινοξικές υποκαταστάσεις μέσα στην E6 πρωτεΐνη. Η νουκλεοτιδική παραλλαγή A280T εντοπίστηκε τόσο σε υψηλού, όσο και σε χαμηλού βαθμού δυσπλασίας κολπικά δείγματα (Πίνακας 7.1).

Προγενέστερες μελέτες πρότειναν ότι το E7 γονίδιο είναι περισσότερο συντηρημένο από το E6 (de Boer et.al., 2004; Wu et.al., 2006; Pande et.al., 2008). Παρόλα αυτά εντοπίστηκαν επτά νέες νουκλεοτιδικές παραλλαγές μέσα στο E7 γονίδιο, σε δείγματα που ομαδοποιούνταν στο ίδιο φυλογενετικό κλαδί με την Ευρωπαϊκού τύπου παραλλαγή (T350G). Οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις C565T, T596A, G685A, G813A, G814A, G815A και C818T προκαλούν τις αμινοξικές υποκαταστάσεις H2Y, M12K, A42T, M84I, G85S, G85D και T86I, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, οι αμινοξικές υποκαταστάσεις H2Y και M12K εντοπίζονται στην περιοχή CR1 της E7 ογκοπρωτεΐνης (Munger et.al., 2004). Επιπλέον, οι αμινοξικές μεταλλάξεις M84I, G85S, G85D και T86I εντοπίστηκαν στην καρβοξυτελική περιοχή της E7 πρωτεΐνης, στο δακτύλιο Zn²⁺ (Ghittoni et.al., 2010) (Πίνακας 7.1). Οι νέες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές υποκαταστάσεις των E6 και E7 ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων που εντοπίστηκαν σε Ευρωπαϊκού τύπου δείγματα απαιτούν περαιτέρω έρευνα, ώστε να διαπιστωθούν οι λειτουργικές τους επιπτώσεις.

Παρόλα αυτά η ικανότητα της E6 ογκοπρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με διακριτές παραλλαγές p53 μπορεί να επάγει ισχυρή επιλεκτική πίεση στο γονίδιο E6 (De Filippis et.al., 2002). Συγκεκριμένα, τα κωδικόνια 10, 14 και 83 του γονιδίου E6 υπόκεινται σε θετική επιλογή και η υποκατάσταση του αμινοξέος L83V σχετίζεται με την ανάπτυξη του κολπικού καρκίνου (Chen et.al., 2005; De Filippis et.al., 2002; Carvajal-Rodriguez, 2008; Lee et.al., 2008). Στην παρούσα μελέτη, θετική επιλογή βρέθηκε στο κωδικόνιο 83 του γονιδίου E6. Παρόλα αυτά, δε βρέθηκε θετική επιλογή στα κωδικόνια 10 και 14 με τις μεθόδους ML και EB. Βασισμένοι στην ανάλυση θετικής επιλογής και στο φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανότητας (Εικόνα 7.1), υποθέτουμε ότι το κωδικόνιο 83, που εμπλέκεται στην εξέλιξη του κολπικού καρκίνου, έχει υποστεί θετική επιλογή στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Παρόλα αυτά, νουκλεοτιδικές και φυλογενετικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το κωδικόνιο 10 διαχωρίζει την Αφρικανικού τύπου I παραλλαγή από εκείνη του Αφρικανικού τύπου II, ενώ το κωδικόνιο 14 ξεχωρίζει την Αφρικανικού τύπου II παραλλαγή από τις μη Αφρικανικές (Carvajal-Rodriguez, 2008). Απουσία θετικής επιλογής στα κωδικόνια 10 και 14 πιθανόν να προκαλείται από κυριαρχία της Ευρωπαϊκής παραλλαγής του HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό (Εικόνα 7.1).

Είχε προταθεί ότι θετική επιλογή ασκείται στο κωδικόνιο 29 της E7 πρωτεΐνης (Sun et.al., 2012). Στην παρούσα ανάλυση βρέθηκε μέσω EB ανάλυσης, ότι μόνο το

κωδικόνιο 85 υπόκειται σε θετική επιλογή. Το κωδικόνιο 85 βρίσκεται στην καρβοξυτελική περιοχή της E7 πρωτεΐνης. Αυτή η πρωτεϊνική περιοχή σχετίζεται με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την pRb και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, ενώ μπορεί να δρα σαν περιοχή διμερισμού (Munger et.al., 2004). Αμινοξική υποκατάσταση στο κωδικόνιο 85 ανιχνεύτηκε μόνο σε δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί Ευρωπαϊκού τύπου. Ο ρόλος της θετικής επιλογής στο κωδικόνιο 85 πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω ώστε να γίνουν σαφείς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της E7 πρωτεΐνης και των κυτταρικών στόχων-ξενιστών.

Εν κατακλείδι, τα E6 και E7 γονίδια του HPV16 είναι πολυμορφικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την ενδοτυπική ετερογένεια και εξέλιξη. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη μελέτη που περιγράφει τις νουκλεοτιδικές παραλλαγές καθώς και την εξελικτική πίεση που ασκείται στα γονίδια E6 και E7 του HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό. Μοριακή και εξελικτική ανάλυση του γονιδιώματος του HPV16 σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες ίσως μας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την ιική παθογένεια και τη γονιδιακή εξέλιξη των HPVs 16.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersson, S., Alemi, M., Rylander, E., Strand, A., Larsson, B., Sallstrom, J. & Wilander, E. (2000).

Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer* 83, 307–310.

Angulo, M. & Carvajal-Rodriguez, A. (2007).

Evidence of recombination within human alpha-papillomavirus. *Virology* 401, 33.

Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E. & Dunn, S. T. (2006).

Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J. Cancer* 118, 1071–1076.

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers, E. M. (2010).

Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79.

Boulet, G., Horvath, C., VandenBroeck, D., Sahebali, S. & Bogers, J. (2007).

Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J. Biochem Cell Biol* 39, 2006–2011.

Carvajal-Rodriguez, A. (2008).

Detecting recombination and diversifying selection in human alpha-papillomavirus. *Infect Genet Evol* 8, 689–692.

Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E. & Cleator, G. M. (1995).

New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol Methods* 5325–36.

Chan, S. Y., Bernard, H. U., Ratterree, M., Birkebak, T. A., Faras, A. J. & Ostrow, R. S. (1997).

Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in rhesus monkeys. *J. Virol* 71, 4938–4943.

Chen, Z., Terai, M., Fu, L., Herrero, R., DeSalle, R. & Burk, R. D. (2005).

Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 79, 7014–7023.

Chen, Z., DeSalle, R., Schiffman, M., Herrero, R. & Burk, R. D. (2009).

Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol* 83, 1443–1455.

Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M., Clifford, G. M. & IARC HPV Variant Study Group (2012).

Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86, 6855–6861.

de Boer, M. A., Peters, L. A., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S., Kolkman-Uljee, S. & Fleuren, G. J. (2004).

Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *GynecolOncol* 94, 488–494.

deSanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L. E. & other authors (2010).

Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11, 1048–1056.

DeFilippis, V. R., Ayala, F. J. & Villarreal, L. P. (2002).

Evidence of diversifying selection in human papillomavirus type 16 E6 but not E7 oncogenes. *J. MolEvol* 55, 491–499.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST:

Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMCEvol Bio* 17, 214.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE:

multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797.

Eriksson, A., Herron, J. R., Yamada, T. & Wheeler, C. M. (1999).

Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* 80, 595–600.

Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B. & Tommasino, M. (2010).

The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1–13.

Grodzki, M., Besson, G., Clavel, C., Arslan, A., Franceschi, S., Birembaut, P., Tommasino, M. & Zehbe, I. (2006).

Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 820–822.

Halpern, A. L. (2000).

Comparison of papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a papillomavirus vaccine. *J Clin Virol* 19, 43–56.

Junes-Gill, K., Sicheo, L., Maciag, P. C., Mello, W., Noronha, V. & Villa, L. L. (2008).

Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol* 80, 1639–1645.

Kosakovsky Pond, S. L. & Frost, S. D. (2005).

Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21, 2531–2533.

Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H. & Frost, S. D. (2006).

Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol* 23, 1891–1901.

Lee, K., Magalhaes, I., Clavel, C., Briolat, J., Birembaut, P., Tommasino, M. & Zehbe, I. (2008).

Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res* 131, 106–110.

Li, W., Wang, W., Si, M., Han, L., Gao, Q., Luo, A., Li, Y., Lu, Y., Wang, S. & Ma, D. (2008).

The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134, 1355–1361.

Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J. F. & Clifford, G. M. (2011).

Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 128, 927–935.

Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. & Huh, K. (2004).

Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78, 11451–11460.

Munoz, N. (2000).

Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19, 1–5.

Pande, S., Jain, N., Prusty, B. K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S. & Das, B. C. (2008).

Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol* 146, 1060–1066.

Puranen, M., Saarikoski, S., Syrjanen, K. & Syrjanen, S. (1996).

Polymerase chain reaction amplification of human papillomavirus DNA from archival, Papanicolaou-stained cervical smears. *Acta Cytol* 40, 391–395.

Quint, K. D., de Koning, M. N., van Doorn, L. J., Quint, W. G. & Pirog, E. C. (2010).

HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 117, 297–301.

Sanchez, G. I., Kleter, B., Gheit, T., van Doorn, L. J., de Koning, M. N., de Sanjose, S., Alemany, L., Bosch, X. F., Tommasino, M. & other authors (2011).

Clinical evaluation of polymerase chain reaction reverse hybridization assay for detection and identification of human papillomavirus type 16 variants. *J Clin Virol* 51, 165–169.

Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K. & other authors (2010).

A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 70, 3159–3169.

Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K. & other authors (2004).

Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42, 3176–3184.

Stern, A., Doron-Faigenboim, A., Erez, E., Martz, E., Bacharach, E. & Pupko, T. (2007). Selecton 2007:

Advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Res*35(Web Server issue), W506–W511.

Sun, M., Gao, L., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, X., Pan, Y., Ning, T., Cai, H., Yang, H. & other authors (2012).

Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human papillomavirus type 16 in central China. *PLoS ONE*7, e36577.

Suzuki, Y. & Gojobori, T. (1999).

A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol Biol Evol*16, 1315–1328.

Swan, D. C., Rajeevan, M., Tortolero-Luna, G., Follen, M., Tucker, R. A. & Unger, E. R. (2005).

Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol*96, 695–700.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).MEGA4:

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*24, 1596–1599.

Tornesello, M. L., Losito, S., Benincasa, G., Fulciniti, F., Botti, G., Greggi, S., Buonaguro, L. & Buonaguro, F. M. (2011).

Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*121, 32–42.

Tsakogiannis, D., Ruether, I. G., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Skordas, V., Gartzonika, C., Levidiotou-Stefanou, S. & Markoulatos, P. (2012).

Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece. *Arch Virol* 157, 1729–1739.

Wheeler, C. M., Yamada, T., Hildesheim, A. & Jenison, S. A. (1997).

Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 35, 11–19.

Wu, Y., Chen, Y., Li, L., Yu, G., He, Y. & Zhang, Y. (2006).

Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol* 87, 1181–1188.

Yamada, T., Wheeler, C. M., Halpern, A. L., Stewart, A. C., Hildesheim, A. & Jenison, S. A. (1995).

Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 69, 7743–7753.

Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X. & Wheeler, C. M. (1997).

Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71, 2463–2472.

Zuna, R. E., Moore, W. E., Shanesmith, R. P., Dunn, S. T., Wang, S. S., Schiffman, M., Blakey, G. L. & Teel, T. (2009).

Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer* 125, 2609–2613.

zurHausen, H. (1996).

Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55–F78.