



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**“Πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53 και σύνδεση των παραλλαγών των στελεχών HPV 16 στο γονίδιο E6 με υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV 16 κλινικών δειγμάτων”**

**“ p53 protein codon 72 polymorphism and association of HPV-16 E6 gene variants with high and low grade dysplasia of HPV-16 positive clinical samples”**

**Λάμπρου Κωνσταντίνος**

**Λάρισα 2017**

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)

**Μόσιαλος Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Αμούτζιας Γρηγόριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Παναγιώτη Μαρκουλάτο, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση και την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της Μοριακής Ιολογίας και Μοριακής Ογκογένεσης, καθώς και για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αλλά και καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, τον κύριο Μόσιαλο και τον κύριο Αμούτζια, που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τηλέμαχο Δημητρίου και ιδιαιτέρως τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γιώργο Μοσχονά για την πολύτιμη βοήθεια τους και καθοδήγηση καθ'όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιάννη και Μαρίνα που με στηρίζουν ηθικά και οικονομικά και στέκονται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια ώστε να μπορώ να πραγματοποιώ τους στόχους μου.

## Περίληψη

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) αποτελούν ομάδα ιών με δίκλωνο, κυκλικό DNA, άνευ εξωτερικού περιβλήματος. Προσβάλλουν το βασικό επιθήλιο του δέρματος, και του βλεννογόνου, και προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων, που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, μέχρι νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο. Ο ιός HPV16 είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Επίμονη λοίμωξη με τον ιό αυτό έχει συνδεθεί με την αυξημένη πιθανότητα ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή και αποτελεί κρίσιμο βήμα για την εξέλιξη προκαρκινικών τραχηλικών κακοηθειών σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο HPV16 κωδικοποιεί την ογκοπρωτεΐνη E6 η οποία στοχεύει και αποικοδομεί την πρωτεΐνη p53 απορυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί τελικά στην καρκινογένεση.

Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53 αποτελεί τον πιο συχνό πολυμορφισμό στην πρωτεΐνη αυτή και έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε πολλές έρευνες. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλέτα του κωδικονίου 72 μπορεί να είναι CCC (που κωδικοποιεί το αμινοξύ προλίνη) ή CGC (που κωδικοποιεί για το αμινοξύ αργινίνη). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυο πρωτεϊνικές δομές με διαφορετικές βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες. Έχει βρεθεί ότι στην περίπτωση που ο γενότυπος είναι Arg/Arg η p53 είναι πιο ευαίσθητη στην αποικοδόμηση από την E6 ογκοπρωτεΐνη του HPV σε σχέση με την περίπτωση που ο γενότυπος είναι Pro/Pro. Για το λόγο αυτό ο πολυμορφισμός αυτός μελετάται ως μοριακός δείκτης επικινδυνότητας για την δημιουργία κακοηθειών από προκαρκινικές αλλοιώσεις.

Ενδοτυπικές παραλλαγές του γονιδίου E6 των HPV-16 αποτελούν ένα πιθανό παράγοντα ρίσκου για την δημιουργία καρκίνου του τραχήλου. Η πιο συχνή μετάλλαξη στο γονίδιο E6 είναι στη θέση 350 όπου το T αντικαθίσταται με G που έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου 83 της πρωτεΐνης από λευκίνη σε βαλίνη. Πολλές μελέτες δείχνουν πως η μετάλλαξη αυτή αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε κακοήθειες παρόλο που υπάρχουν και αντικρουόμενα ευρήματα.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι η σύνδεση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53 και των παραλλαγών των στελεχών HPV-16 στο γονίδιο E6 με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες σε θετικά για HPV-16 κλινικά δείγματα.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει πως ασθενείς με γενότυπο p53 Arg/Arg παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ άτομα που έχουν μολυνθεί από την παραλλαγή του HPV16 T350G και φέρουν και το γενότυπο p53 Arg/Arg εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως το ογκογόνο δυναμικό του HPV16 αυξάνεται με την παρουσία του γενότυπου p53 Arg/Arg, συμπεραίνοντας ότι η ειδική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών E6 (L83V) - p53 (Arg-72) μπορούν να μεταβάλλουν την ευαισθησία του ατόμου ως προς την ανάπτυξη κακοήθειας του τραχήλου της μήτρας.

## Abstract

Human Papillomaviruses (HPVs) are small, non-enveloped, double stranded, circular DNA viruses. They infect cutaneous and mucosal epithelia and cause a diverse range of epithelial lesions, such as common warts, cervical neoplasia and cancer. HPV16 is responsible for approximately 50% of all cervical cancers. Persistent HPV-16 infection is associated with an increasing risk of integration of viral episomes into the host chromosome and is a crucial event for the progression of precancerous cervical malignancies to cervical cancer development. HPV16's E6 oncoprotein targets and degrades cellular p53 protein disregulating the cell cycle which ultimately leads in oncogenesis.

p53 protein codon 72 polymorphism is the most common polymorphism in the protein and it has been the subject of many studies. More specifically, the codon 72 triplet can be either CCC(coding the amino acid proline) or CGC (coding the amino acid arginine). As a result, two different forms of the protein are created with different biological and biochemical properties. The Arg form of the p53 protein is found to be more vulnerable than the Pro form to the bound and degradation by the HPV E6 oncoprotein. For that reason, this polymorphism is tested for the use as a molecular risk marker for the development of cervical cancer from precancerous lesions.

Intratype variants of the E6 gene are a possible risk marker for the development of cervical malignancies. The most common mutation in the E6 gene is the T350G which leads in an amino acid 83 substitution from leucine to valine. Many studies suggest that this mutation is a risk factor for the progression of the precancerous lesions, even though there are many controversial findings.

Therefore, the aim of this study is the association of the p53 protein codon 72 polymorphism and the E6 variants with high and low grade dysplasia of HPV-16 positive clinical samples.

In conclusion, the present study claims that patients with p53 Arg/Arg genotype present an increased risk of developing of more severe dysplasia and cervical cancer, while individuals with T350G E6 sequence variation and p53 Arg/Arg genotype are at considerable risk of developing high grade cervical intraepithelial neoplasia. These results elucidate that the oncogenic potential of the virus is increased by the presence of p53 Arg/Arg genotype concluding that the specific protein interaction E6 (L83V) - p53 (Arg-72) can alter individuals' susceptibility towards cervical disease.

# Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> .....	8
Εισαγωγή .....	8
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά .....	8
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών .....	8
1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV) .....	10
1.3.1. Δομή του καψιδίου .....	10
1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος .....	12
1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1 .....	13
1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2 .....	14
1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4 .....	14
1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5 .....	15
1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6 .....	16
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7 .....	18
1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος .....	19
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs .....	20
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση .....	20
1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος .....	21
1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος .....	22
1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση .....	22
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις .....	23
1.8. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 .....	24
1.8.1 Δομή του γονιδίου p53 .....	25
1.8.2. Δομή της πρωτεΐνης p53 .....	25
1.8.3. Λειτουργίες της p53 .....	27
1.8.4. Η p53 και κυτταρικός κύκλος .....	27
1.8.5. Η p53 και απόπτωση .....	27
1.8.6. Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της p53 .....	28
1.9. Η μετάλλαξη T350G στο γονίδιο E6 του HPV-16 .....	28
1.10. Σκοπός .....	28
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> .....	29
Υλικά και μέθοδοι .....	29
2.1. Κλινικά δείγματα .....	29
2.2.1. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep .....	35

2.2.2. Εκχύλιση DNA από μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη .....	35
2.2.3. Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων.....	36
2.3. Έλεγχος πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53 .....	37
2.3.1. Ενίσχυση με PCR.....	37
2.3.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR .....	37
2.3.3. Πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI .....	38
2.3.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης .....	38
2.3.5. Καθορισμός γενοτύπου .....	39
2.4. Ανάλυση της παραλλαγής T350G του HPV-16.....	40
2.4.1. Ενίσχυση τμήματος των γονιδίων E6/E7 .....	40
2.4.2. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης.....	41
2.4.3. Μοριακή κλωνοποίηση.....	41
2.4.4. Αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας .....	43
2.5. Στατιστική ανάλυση.....	44
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> .....	45
Αποτελέσματα .....	45
3.1. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων .....	45
3.2. Συσχέτιση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53 με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα .....	50
3.3. Συσχέτιση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53 με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας και την μετάλλαξη T350G σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα.....	52
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> .....	54
Συζήτηση .....	54
Βιβλιογραφικές αναφορές .....	56

# Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

## Εισαγωγή

### 1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Οι *Papillomaviridae* είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV) εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο και οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι. Ο ιός HPV μολύνει το τραχηλικό επιθήλιο και ανιχνεύεται τόσο σε κονδυλώματα όσο και σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Η εμπλοκή του HPV 16 στην καρκινογένεση του κατώτατου γεννητικού συστήματος, αλλά και του δέρματος, του λάρυγγα, του φάρυγγα, της ουροδόχου κύστης και των πνευμόνων ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για ένα ισχυρό ογκογόνο ιό [1].

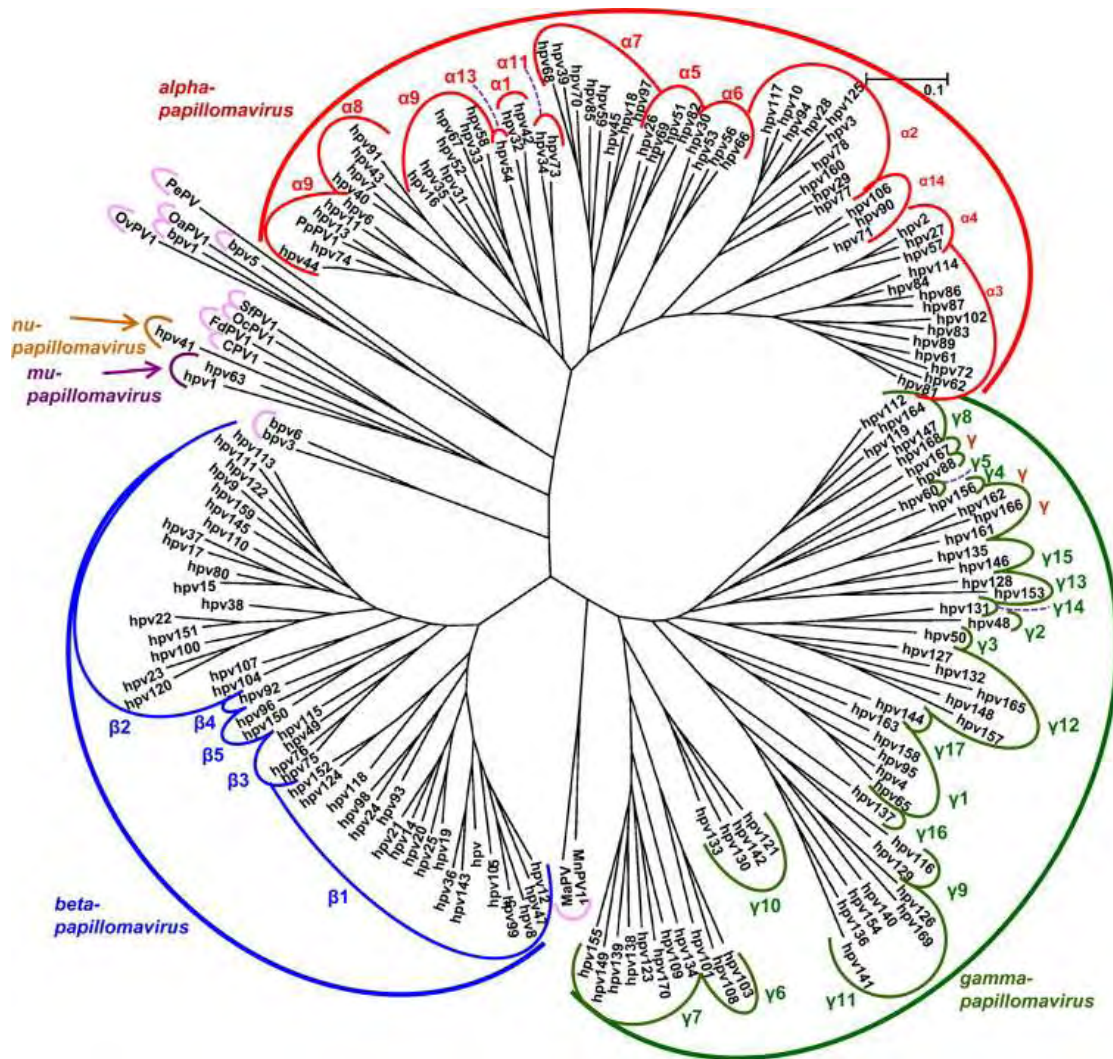
### 1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Αρχικά, οι Papilloma ιοί ταξινομήθηκαν στην οικογένεια Papovaviridae μαζί με τους Polyoma ιούς καθώς είχαν παρόμοια καψιδιακή δομή χωρίς εξωτερικό περίβλημα και παρόμοια μορφή γονιδιώματος. Μετά την αλληλούχηση και την εκτενέστερη ανάλυση των γονιδιωμάτων τους, διαπιστώθηκε πως η οργάνωση και το μέγεθος διέφεραν καθώς επίσης δεν υπήρχε καμία ομολογία (τόσο νουκλεοτιδική όσο και αμινοξική). Για το λόγο αυτό η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) προχώρησε στον διαχωρισμό της οικογένειας Papovaviridae σε δυο ξεχωριστές οικογένειες : την οικογένεια των Papillomaviridae και την οικογένεια των Polyomaviridae. [2]

Οι ιοί των θηλωμάτων χαρακτηρίζονται από κοινή δομή του γονιδιώματος και ταξινομούνται βάσει των διαφορών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης L1 (καθώς το γονίδιο L1 είναι το πιο συντηρημένο) σε τύπους, υποτύπους και παραλλαγές. Η ταξινόμηση γίνεται βάσει του γονιδιώματος και όχι βάσει οροτύπου καθώς δεν υπάρχει κάποια διαθέσιμη κυτταρική σειρά διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων έτσι ώστε να καλλιεργηθεί ο ιός. Μεταξύ των διαφόρων τύπων των Papilloma ιών η διαφορά στην αλληλουχία του L1 ORF είναι μεγαλύτερη από 10%, ενώ για τους υποτύπους και τις παραλλαγές η διαφορά είναι 2-10% και μικρότερη από 2% αντίστοιχα. [2]



Οι Papilloma ιοί χωρίζονται σε 16 γένη τα οποία έχουν ομολογία 60% στην αλληλουχία του L1 ORF και το όνομα του κάθε γένους προέρχεται από το ελληνικό αλφάβητο (από Άλφα μέχρι Πι). Οι ιοί που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο (HPVs) περιλαμβάνονται μόνο στα 5 από αυτά τα γένη και συγκεκριμένα στα Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- και Nu-Papillomavirus. [2]



Εικόνα 1.1 : Φυλογενετικό δέντρο που φαίνονται τα διάφορα γένη των Papilloma ιών. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε βάσει των αλληλουχιών του L1 ORF με το πρόγραμμα MEGA5.1 [5]

Ανάλογα με τον τροπισμό τους, οι HPVs χωρίζονται σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δεύτεροι διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk), με βάση την ογκογονικότητά τους (πίνακας 1.1). Από τους τύπους υψηλού κινδύνου, οι HPV-16,

HPV-18 και HPV-31 έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό που αγγίζει το 95%. [3,4]

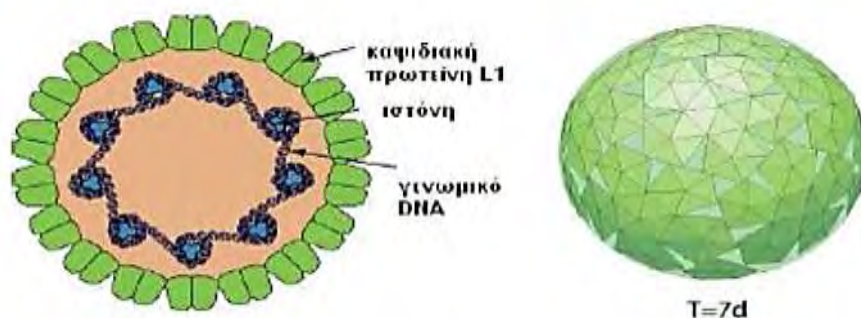
Ομάδα επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Πίνακας 1.1 : Ομάδες επικινδυνότητας των HPV

### 1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV)

#### 1.3.1. Δομή του καψιδίου

Οι HPV είναι μικροί DNA ιοί διαμέτρου 55-60nm και δεν περιβάλλονται από εξωτερικό περίβλημα. Το γονιδίωμα του ιού περικλείεται σε ένα καψίδιο το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες εκφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. Η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του ιού αποκάλυψε ότι η εξωτερική επιφάνεια των ισοματίων των HPVs αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 και σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια (Εικόνα 1.2.) [6]



Εικόνα 1.2 : Δομή του καψιδίου των HPV

Η L1 αποτελεί τη μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη, βάρους 55 kDa, και σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου. Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει τόσο στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή όσο και στην απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πρωτεΐνη συγκροτεί πενταμερή καψομερή όπου 72 πενταμερή συγκροτούν ένα ώριμο καψίδιο.[7]



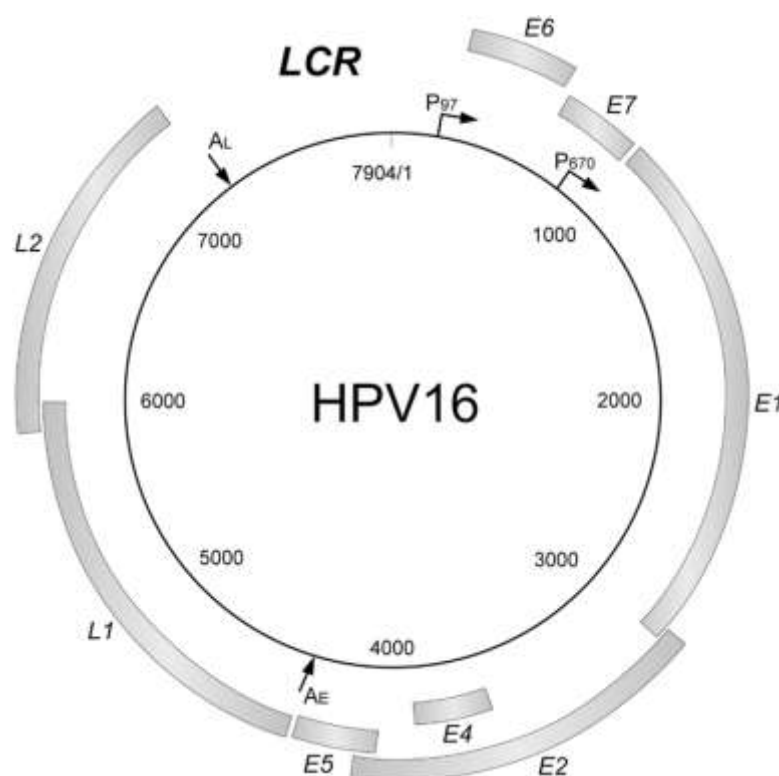
Εικόνα 1.3 : Η δομή ενός πενταμερούς καψομερούς. [8]

Η L2 αποτελεί την ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη, βάρους 55 kDa, με 12 αντίγραφα ανά ιοσωμάτιο και εκφράζεται μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η βασικότερη λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις ιικές πρωτεΐνες L1 και E2 κατά τη συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων.[9]

## 1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των HPV είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο μήκους περίπου 8kb. Το γονιδίωμα χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές:

- Την ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region)
- Την πρόωμη περιοχή E (Early)
- Την όψιμη περιοχή L (Late)



Εικόνα 1.4 : Το γονιδίωμα του HPV στην επισωμική του μορφή. [10]

Η ρυθμιστική περιοχή LCR, μήκους 850bp, δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη. Εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L1 και πριν την αρχή του γονιδίου E6. Η περιοχή αυτή περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και θέσεις πρόσδεσης σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. SP1, AP1, Oct1). [4,10]

Η πρόωμη περιοχή περιλαμβάνει 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (E1,E2,E4,E5,E6 και E7) τα οποία κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ιού και εκφράζονται στα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του ιού. [4,10]

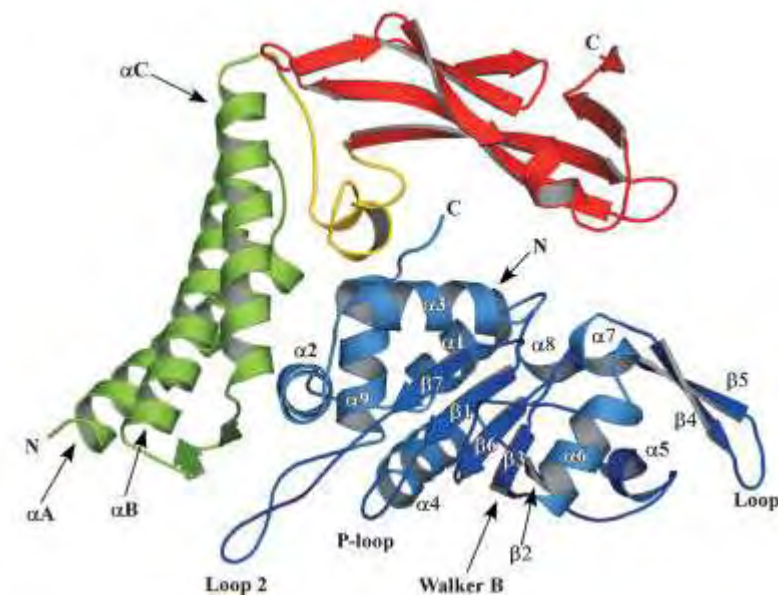
Η όψιμη περιοχή περιλαμβάνει 2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (L1 και L2) που κωδικοποιούν τις δομικές και κληρονομικές πρωτεΐνες του ιού. [4,10]

Στο γονιδίωμα του HPV υπάρχουν δύο κύριοι υποκινητές, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του. Ο υποκινητής PE (early promoter, ή αλλιώς p97), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των πρόωμων γονιδίων και ο υποκινητής PL (late promoter, ή αλλιώς p670), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων.

Στην εικόνα 1.4. παρουσιάζονται οι ανωτέρω υποκινητές στις θέσεις 97 και 670. Οι περιοχές που επισημαίνονται ως AE και AL υποδηλώνουν τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης αντίστοιχα. [4,10]

### 1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 αποτελεί μια πολύ συντηρημένη περιοχή του ιικού γονιδιώματος η οποία κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 67-76 kDa (ανάλογα με τον τύπο του ιού) που απαιτείται για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια DNA ελικάση/ ATPάση και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA του ιού προσδενόμενη σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων. Το αμινοτελικό άκρο της E1 ,μήκους περίπου 200 αμινοξέων, αποτελεί μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των στελεχών του HPV. Έχει βρεθεί ότι η περιοχή στο αμινοτελικό άκρο ενισχύει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ικό DNA στην επισωμική του μορφή, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση αυτής μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Το καρβοξυτελικό της άκρο έχει δράση ελικάσης και ATPάσης και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη E2. Τέλος, η E1 προσδένεται μέσω της κεντρικής της περιοχής (DNA-binding domain) σε μια αλληλουχία στην ori η οποία περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της E1. [11,12]



Εικόνα 1.5 : Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης E1-E2. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η E1. Με πράσινο παρουσιάζεται το αμινοτελικό άκρο της E2 και με κόκκινο παρουσιάζεται η δομική περιοχή της E2. [13]

### 1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa η οποία ρυθμίζει την μεταγραφή από τον πρώιμο υποκινητή, ενώ είναι απαραίτητη και για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Αποτελείται από μια περιοχή μήκους περίπου 200 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο η οποία αποτελεί μια περιοχή trans-ενεργοποίησης που εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την E1. Στο καρβοξυτελικό της άκρο έχει μια περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό γονιδίωμα και για τον διμερισμό της E1.[14,15,16]

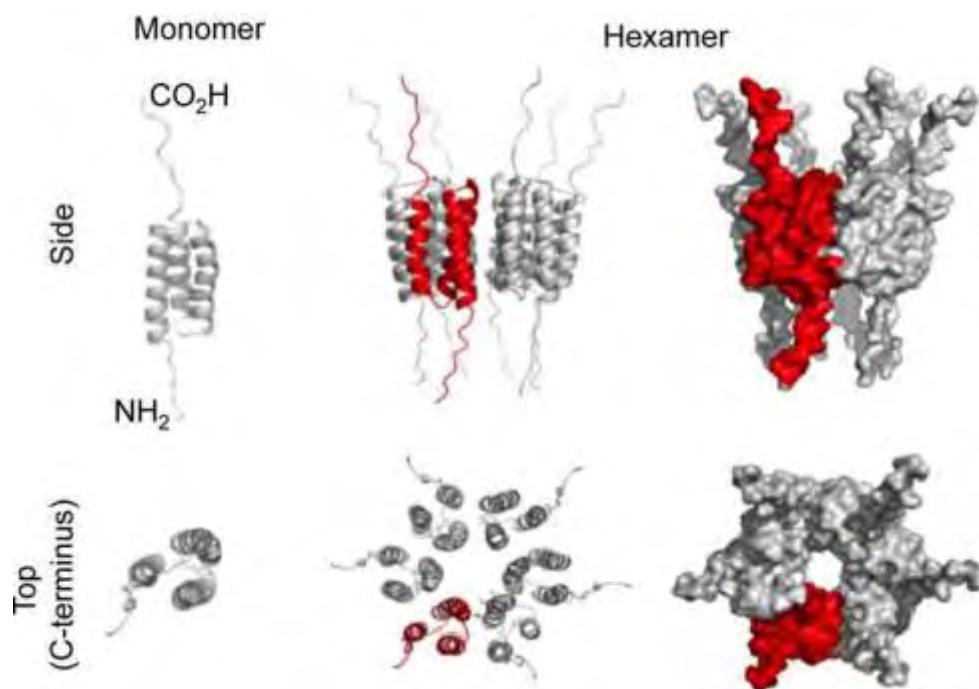
Η περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της E2 αλληλεπιδρά με την περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της E1 η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης στη θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και την δραστικότητα ελικάσης. Συνεπώς δημιουργείται το σύμπλοκο E1/E2 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής το οποίο προκαλεί αναδιάταξη του DNA, διευκολύνοντας την προσέλκυση περισσότερων μορίων E1 έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντιγραφή. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι απαραίτητος τόσο για την αντιγραφή όσο και για την μεταγραφή καθώς μετά την πρόσδεση του συμπλόκου στον πρώιμο υποκινητή προσελκύονται μεταγραφικοί παράγοντες. [14,15,16]

### 1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

Το E4 ORF εντοπίζεται εξολοκλήρου εντός του E2 ORF και εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη της οποίας τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το E1 ORF και για το λόγο αυτό αναφέρεται και ως E1<sup>E4</sup>. Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού και ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα από τις άλλες πρωτεΐνες του ιού. Η πρωτεΐνη E4 του HPV16 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: α) Στο N-τελικό άκρο, όπου συναντάται το συντηρημένο μοτίβο (LLKLL), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης. β) Σε μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. γ) Στην C-τελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης. Η καλύτερα μελετημένη λειτουργία της ιικής πρωτεΐνης E4 είναι η συμβολή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Συγκεκριμένα προάγει την κατάρρευση του κυτταροσκελετού οδηγώντας στην απελευθέρωση των νέων ισωματίων από τα μολυσμένα κύτταρα της διαφοροποιημένης στοιβάδας. [17,18,19]

#### 1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη 83 αμινοξέων η οποία εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου και σπανιότερα μπορεί να εντοπιστεί και στον πυρηνικό φάκελο. Αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο, η οποία διαπερνά την μεμβράνη τρεις φορές. Ολιγομερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα εξαμερές, σχηματίζοντας μια δομή «δαχτυλιδιού».



Εικόνα 1.6 : Μοντέλο ενός εξαμερούς καναλιού ιόντων που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη E5 in vitro. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η πλευρική όψη ενός μονομερούς της E5 με τρία διαμεμβρανικά τμήματα (κόκκινο χρώμα), ενώ στο κάτω μέρος η κάτοψη της ίδιας αναπαράστασης. [23]

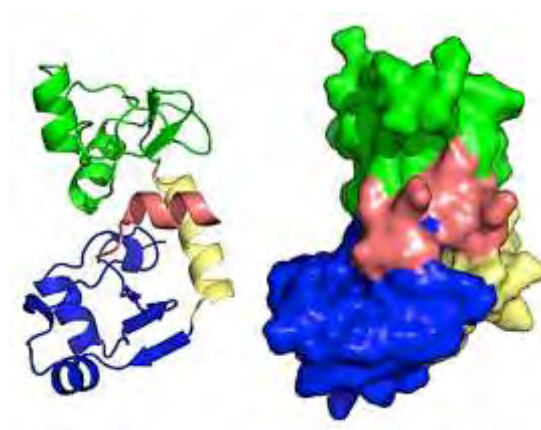
Η ιική πρωτεΐνη E5 έχει ένα ευρύ φάσμα δράσεων, περισσότερες από τις οποίες οδηγούν στον πρώιμο μετασχηματισμό των κερατινοκυττάρων, ενισχύοντας έτσι το ογκογονικό δυναμικό των HPV. Παρ'όλο που η E5 χαρακτηρίζεται από ικανότητα μετασχηματισμού των κερατινοκυττάρων, έχει πολύ ασθενέστερη δράση σε σχέση με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού E6,E7 και εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και όχι στη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, στον ιό HPV-16 έχει βρεθεί ότι η E5 δρα συνεργατικά με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) επάγοντας την μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την ικανότητα διήθησής τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η E5 μερικών PVs μπορεί να αλληλεπιδράσει με την V-ATPάση των

χυμοτοπίων οδηγώντας σε αλλαγές στην οξύνιση των ενδοσωμάτων και σε αποικοδόμηση του υποδοχέα του EGF. Τέλος, η πρωτεΐνη E5 ελαττώνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μείζοντος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I) αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του MHC I έτσι ώστε ο ιός να αποκτά την ικανότητα να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση. [20,21,22]

#### 1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 αποτελεί μία πρόιμη ιική ογκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από 151 αμινοξέα, η οποία συμβάλλει στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV ιό. Είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την διάρκεια της HPV λοίμωξης και παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, διότι εμπλέκεται σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου-ξενιστή. [24,25]

Η E6 περιέχει στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό της άκρο από μια δομική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου όπου η κάθε μια φέρει δυο μοτίβα Cys-X-X-Cys οι οποίες είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των διαφόρων στελεχών, καταδεικνύοντας ότι είναι απαραίτητες για τις λειτουργίες της πρωτεΐνης. Με την βοήθεια μιας συνδετικής αλληλουχίας με δομή α-έλικας, που τις ενώνει, δημιουργούν μία κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το συντηρημένο πεπτίδιο LXXLL. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες και δημιουργεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η αναστολή της απόπτωσης. [28]

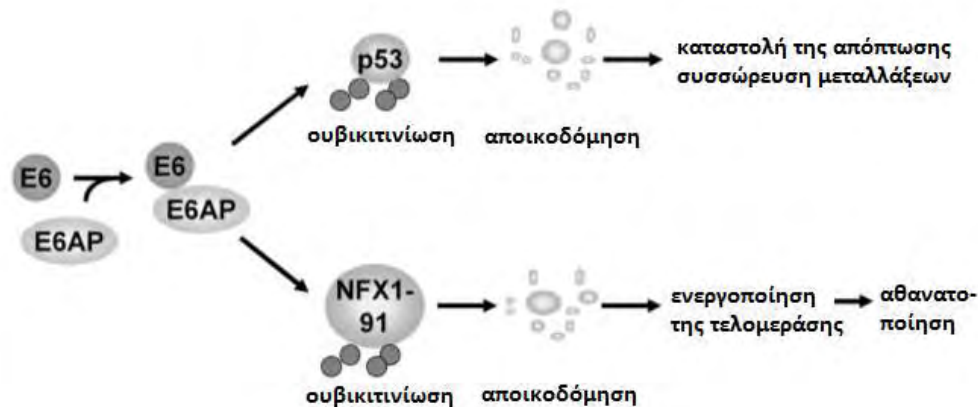


Εικόνα 1.7 : Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο φαίνεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία με κίτρινο και η συντηρημένη αλληλουχία LXXLL με ροζ χρώμα. [28]



Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός με τον οποίο η E6 συμβάλλει στην ογκογένεση είναι η αλληλεπίδρασή της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του κυττάρου p53. Πιο συγκεκριμένα, η E6 προσδένεται μέσω του πεπτιδίου LXXLL στην λιγάση της ουβικιτίνης E6AP σχηματίζοντας το σύμπλοκο E6/E6AP. Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στην p53 και την ουβικιτιλιώνει και έτσι οδηγείται στο πρωτεάσωμα 26S όπου και αποικοδομείται. Η απώλεια της λειτουργικής p53 έχει ως αποτέλεσμα να μην λειτουργούν οι διεργασίες της διόρθωσης των βλαβών του DNA και η παράκαμψη των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τελικώς οδηγούν σε γενωμική αστάθεια. Δεδομένου ότι η p53 ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου, η αποικοδόμησή της έχει σαν αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα ανωτέρω σημεία ελέγχου με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αποικοδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 των υψηλού κινδύνου HPV's. Αντίθετα, η E6 των χαμηλού κινδύνου HPV's παρόλο που μπορεί να προσδένεται στην E6AP δεν μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της p53. [28,29]

Μία ακόμα σημαντική λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης, ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού ενζύμου που διατηρεί τις τελομερικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, η ογκοπρωτεΐνη E6 μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης του παράγοντα NFX1-91, οποίος είναι αναστολέας της έκφρασης του γονιδίου hTERT, ενεργοποιεί το γονίδιο hTERT. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και συνεπώς στην αθανатоποίηση των κυττάρων. [28,29]



Εικόνα 1.8 : Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του συμπλόκου E6/E6AP που οδηγούν στην αποικοδόμηση της p53 και του παράγοντα NFX1-91 στο πρωτεάσωμα 26S.

Τέλος, η E6 μπορεί να ασκήσει αντιαποπτωτική δράση μέσω της πρόσδεσης της σε πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (BAK, BAX) τις οποίες και αποδομεί μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα 26S. [27]

#### 1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 αποτελεί την δεύτερη ιική ογκοπρωτεΐνη, η οποία συμβάλλει στην δημιουργία αθάνατων κυττάρων και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV. Κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς και παίζει κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής τους, επαναπρογραμματίζοντας τις λειτουργίες του κυττάρου ώστε να ευνοούν την αναπαραγωγή του ιού. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E6, επάγει την έναρξη της ογκογένεσης καθώς και την γενωμική αστάθεια.[30]

Η E7 είναι μια μικρή φωσφοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 98 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις συντηρημένες περιοχές (Conserved Regions,CR) CR1,CR2 και CR3. Το αμινοτελικό άκρο της περιλαμβάνει την CR1 , το καρβοξυτελικό της άκρο την CR3 και ανάμεσα τους βρίσκεται η CR2. Η CR1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb. Η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb. Η CR3 περιοχή περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες [30]

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107). Στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή η pRb προσδέεται στο μεταγραφικό παράγοντα E2F με στόχο την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην σύνθεση του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της pRb από τις κυκλονοεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση του E2F και στην πρόοδο στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η πρόσδεση της E7 στην αποφωσφορυλιωμένη pRb δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F και έτσι επιτρέπει στα κύτταρα να περάσουν στην φάση S. Εκτός από την pRb, η ογκοπρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F. Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω δράσεων της E7 είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Παρ'όλο που οι πρωτεΐνες E7 όλων των στελεχών μπορούν να προσδένονται στα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος, οι E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου προσδένονται με πολύ υψηλότερη συγγένεια στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τις E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου.[30,31,32]

Η E7 έχει επίσης την ικανότητα να προσδέεται στις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή των γονιδίων. Φυσιολογικά τα ένζυμα αυτά απομακρύνουν από τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών ακετυλομάδες με αποτέλεσμα την συμπύκνωση της χρωματινής και την καταστολή της μεταγραφής.

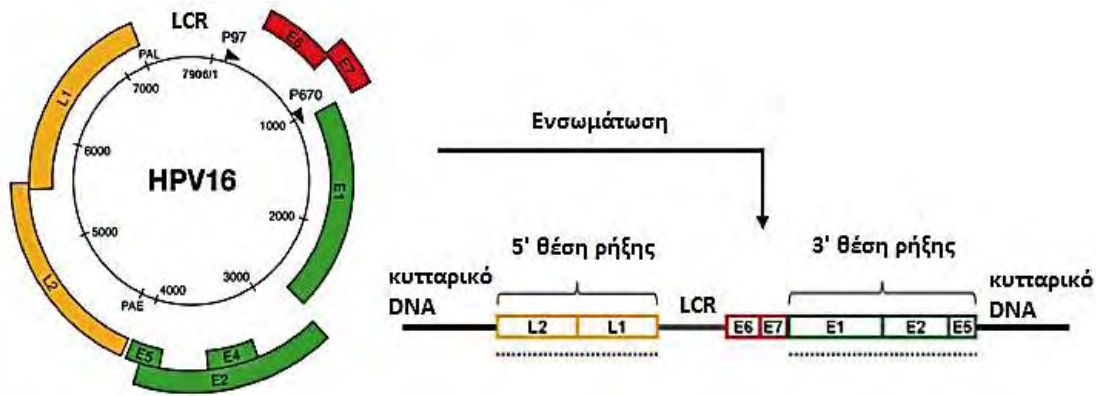
Η pRb αλληλεπιδρά με την HDAC-1 και την κατευθύνει στους υποκινητές που προσδένουν τον E2F έτσι ώστε να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Η E7 προσδένεται στην HDAC-1 μέσω της CR3 περιοχής ανεξάρτητα από την πρόσδεσή της με την pRb παρεμποδίζοντας την λειτουργία της με αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.[33]

Μια ακόμα ομάδα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά η E7 είναι οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases inhibitors, CKIs) p21 και p27. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η μετάβαση από την G1 στην φάση S ελέγχεται από τα σύμπλοκα κυκλινών- κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζονται από τους CKIs. Η E7 αναστέλλει τη δράση των p21 και p27 των οποίων κύριος στόχος είναι η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση cdk2 που αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S. Επομένως η E7 διατηρεί σε υψηλά επίπεδα την cdk2 ενώ παρατηρούνται και υψηλά επίπεδα των κυκλινών A και E. [30,34]

## 1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου-ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο 90% των μολύνσεων από υψηλού κινδύνου HPV ιό, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Ωστόσο, στο υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε γενωμική αστάθεια. [35]

Κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης του ιού, το κυκλικό HPV γονιδίωμα υφίσταται ρήξη και μετατρέπεται σε γραμμικό DNA. Τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα κατά την ενσωμάτωση. Οι συνηθέστερες θέσεις ρήξης του γονιδιώματος του ιού εντοπίζονται στα ρυθμιστικά γονίδια E1 και E2, ενώ ρήξη έχει παρατηρηθεί και στα γονίδια L1 και L2, με πολύ μικρότερη συχνότητα. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μέρους του ιικού γονιδίου E2, το προϊόν του οποίου λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης των ικών ογκογονιδίων. Η υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 συμβάλλει καθοριστικά στη συσσώρευση γενετικών λαθών, η οποία οδηγεί στον κακοήγη φαινότυπο. [36]



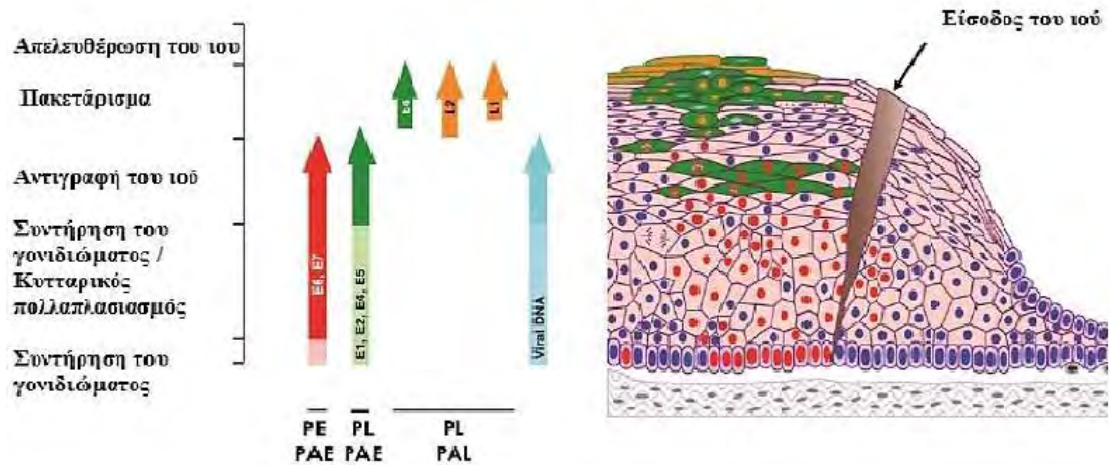
Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση της ευθυγράμμισης του γονιδιώματος του HPV-16. Οι θέσεις ρήξης του ενσωματωμένου HPV-16 DNA μπορεί να εντοπίζονται οπουδήποτε στα γονίδια L2, L1 (5' θέση ρήξης) και στα γονίδια E1, E2, E5 (3' θέση ρήξης) [36]

## 1.6. Κύκλος ζωής των HPVs

### 1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων μολύνουν το πολύστιβο επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου. Η μόλυνση ξεκινάει όταν ο ιός εισβάλλει στο επιθήλιο μέσω μικροτραυματισμών και μολύνει τα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Ο κύκλος ζωής των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Μετά την είσοδο του ιού στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί ο κύκλος ζωής του, εκφράζοντας διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται. [10,37]

Αν και η φύση του υποδοχέα της μόλυνσης με HPV δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί, οι περισσότερες μελέτες προτείνουν ότι ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω σύνδεσής του με την θειική ηπαρίνη (HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη. Δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο καψίδιο οδηγούν στη μεταφορά του ιού σε έναν δευτερεύοντα υποδοχέα των κερατινοκυττάρων, ο οποίος απαιτείται για την διείσδυση του ιού και τη μεταφορά του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα. Το σύμπλοκο L2 πρωτεΐνης-DNA ελέγχει την σωστή είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα.[38]



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων του HPV-16. Τα πρώτα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου υποκινητή PE ή p97 (κόκκινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και την ενίσχυση του ιικού DNA, καθώς και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα όψιμα ιικά γονίδια L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του όψιμου υποκινητή PL ή p670 (πράσινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη δημιουργία του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιού. [10]

### 1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, οι HPV περνούν από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματος τους. Μία αρχική φάση αντιγραφής πραγματοποιείται αμέσως μετά την είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και ακολουθείται από τη διατήρηση του ιικού επισώματος σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων που αντιστοιχούν σε περίπου 200 ανά κύτταρο. Απαραίτητες για την αντιγραφή αυτή είναι οι δύο πρώιμες πρωτεΐνες του HPV, η E1 και E2. Ένα διμερές της E1 συνδέεται σε συνεργασία με ένα διμερές της E2 στο ιικό DNA στη θέση έναρξης της αντιγραφής (ori). Τότε η E2 αποδεσμεύεται και η E1 ξετυλίγει το DNA ανοίγοντας το δρόμο για τις πρωτεΐνες αντιγραφής του κυττάρου. Η επόμενη φάση της αντιγραφής συμβαίνει παράλληλα με την αντιγραφή του γονιδιώματος των κερατινοκυττάρων, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Δημιουργούνται έτσι δύο αντίγραφα του ιικού επισώματος, από τα οποία μεταβιβάζεται ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό το ιικό γονιδίωμα σταθεροποιείται στο επιθήλιο. Η τρίτη και τελευταία φάση αντιγραφής στον κύκλο ζωής του HPV πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια. [39,40]

### 1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, τόσο η αντιγραφή του ιικού DNA, όσο και η μεταγραφή των γονιδίων των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Οι HPVs έχουν δύο κύριους υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους, τον πρώιμο και το όψιμο υποκινητή. Στον HPV-16 οι δύο αυτοί υποκινητές είναι ο p97 και ο p670. Οι υποκινητές αυτοί ελέγχονται αυστηρά από τη ρυθμιστική περιοχή LCR, στην οποία συνδέονται τόσο κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όσο και ο ιικός ενεργοποιητής/καταστολέας E2. [4,10]

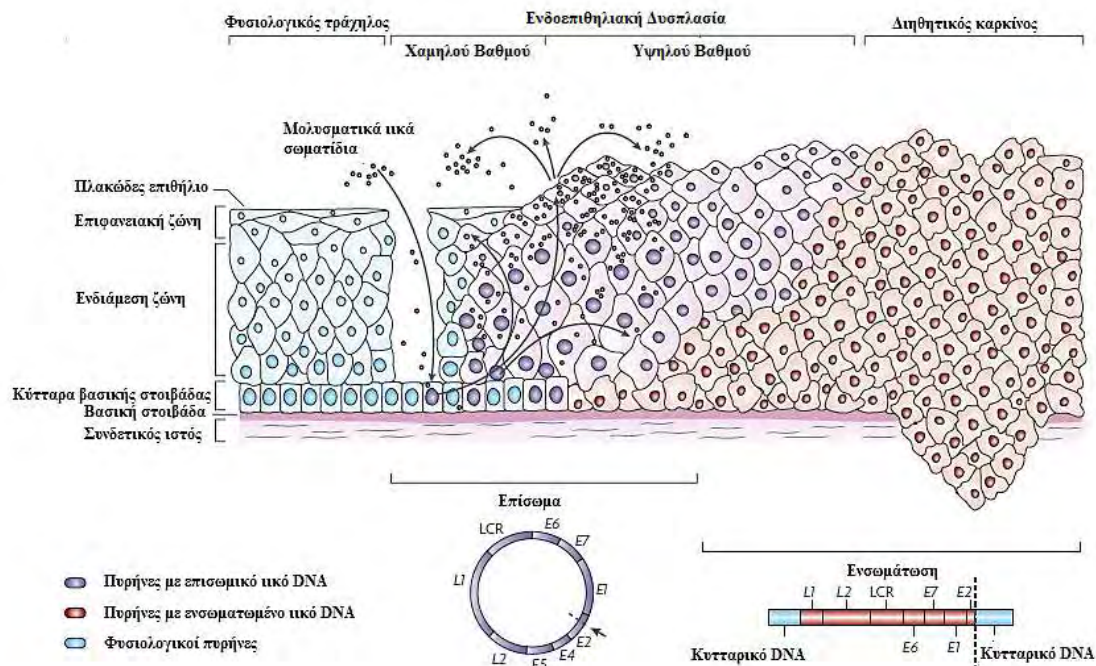
Ο πρώιμος υποκινητής p97 βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των έξι πρώιμων γονιδίων του ιού (E1, E2, E4, E5, E6, E7) στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Από την άλλη, ο όψιμος υποκινητής p670 είναι τοποθετημένος εντός του E7 ORF και ενεργοποιείται στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων επάγει την έκφραση των γονιδίων E1 και E2, επιτρέποντας την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος. Επιπλέον, ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων του ιού L1 και L2, η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των ιοσωματίων. [4,10]

### 1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση

Το τελικό στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού περιλαμβάνει την συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα. Αρχικά παράγεται η ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2, ακολουθεί η έξοδος του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και μετά παράγεται η μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E1<sup>E4</sup>, χωρίς να προκαλεί λύση των κερατινοκυττάρων.

## 1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων παρουσιάζουν τροπισμό που εξαρτάται από τον τύπο τους για τα επιθήλια του δέρματος και του βλεννογόνου. Προκαλούν ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο ,μέχρι νεοπλασίες καλοήθους και κακοήθους φύσεως του τραχήλου της μήτρας. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου προκαλούν λοιμώξεις χαμηλού κινδύνου στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθη θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλειφτούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου, σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι όπως προαναφέρθηκε ο HPV-16 , αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Οι υψηλής επικινδυνότητας HPV ιοί που συναντώνται στον γενικό πληθυσμό συνήθως προκαλούν στοματοφαρυγγικές αλλοιώσεις ή τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις [10]. Οι τραχηλικές αλλοιώσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες μετά το Test pap σύμφωνα με το σύστημα Bethesda ,την πιο σύγχρονη ταξινόμηση που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ιστοπαθολόγοι σήμερα : χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) [43]



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV. [82]

## 1.8. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

Η πρωτεΐνη p53 είναι προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως ογκοπρωτεΐνη 53 (Tumor Protein 53, TP53), καθώς και ως πρωτεΐνη 53 που σχετίζεται με τη μετατροπή των κυττάρων (Transformation-Related Protein 53, TRP53).

Στα φυσιολογικά κύτταρα η p53 ανευρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Αν και δεν είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη του κυττάρου, παίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του όγκου. [44]

Η p53 βρίσκεται στο σταυροδρόμι των μονοπατιών απάντησης του κυττάρου στο στρες, τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των δυνητικά καρκινικών κυττάρων. Η p53 ενεργοποιείται από πολλούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως μετά από βλάβη στο DNA, φθορά στα τελομέρη, ενεργοποίηση ογκογονιδίου, υποξία και απώλεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, καθώς και σήματα επιβίωσης. Τα σήματα αυτά του στρες μπορεί να μετέχουν σε μία αναπτυσσόμενη κακοήθεια, σε διάφορα στάδια κατά την ογκογένεση, από την έναρξη της καρκινογένεσης έως τη διήθηση και τη μετάσταση του όγκου. Φαίνεται λοιπόν ότι η p53 παίζει σημαντικό ρόλο στη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του κυττάρου σε διάφορα σημεία κατά την καρκινογένεση, γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί η απώλεια της λειτουργίας της έχει τόσο σημαντική επίπτωση στην ανάπτυξη όγκου. [45]

Μεταλλάξεις του γονιδίου της πρωτεΐνης p53 έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητάς της να ρυθμίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, με συνέπεια την προαγωγή της καρκινογένεσης. Σωματικές μεταλλάξεις του p53 ανευρίσκονται περίπου στο 50% των καρκίνων στον άνθρωπο, όπως στον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του ήπατος, του προστάτη, της ουροδόχου κύστεως και του δέρματος. Οι καρκίνοι αυτοί γίνονται πιο επιθετικοί, δίνουν μεταστάσεις συχνότερα, και συχνά έχουν χειρότερη πρόγνωση.

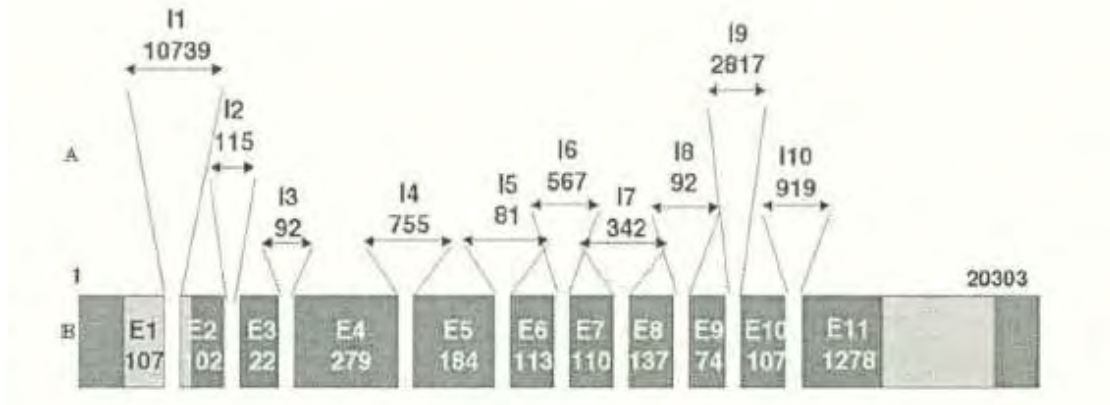
Η ενεργοποίηση της p53 επάγει ποικίλες απαντήσεις στα κύτταρα, όπως διαφοροποίηση, γήρανση, επιδιόρθωση του DNA και αναστολή της αγγειογένεσης. Καλύτερα όμως κατανοητή είναι η ικανότητά της να επάγει διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στη συνέχεια τον κυτταρικό θάνατο, μέσω της απόπτωσης. [46]

Αυτές οι δύο απαντήσεις επιτρέπουν στην p53 να αναστείλει την ανάπτυξη των κυττάρων κάτω από στρες: α) μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου, το οποίο μπορεί να είναι μη αναστρέψιμο ή παροδικό, ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση του DNA και η επανάκτηση της φυσιολογικής κατάστασης του κυττάρου προ της φάσεως έναρξης της αντιγραφής, ή και β) μέσω της μόνιμης απομάκρυνσης των κυττάρων αυτών από τον οργανισμό, με τη διαδικασία της απόπτωσης. Και οι δύο αυτές απαντήσεις παρεμποδίζουν την αντιγραφή των κυττάρων που έχουν υποστεί ογκογόνες μεταβολές, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξη του όγκου. [45]



### 1.8.1 Δομή του γονιδίου p53

Το γονίδιο p53 εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 17p13.1. Πρόκειται για διακεκομμένο γονίδιο. Αποτελείται από έντεκα εξόνια, με συνολική έκταση 20 kb. Κωδικοποιεί ένα mRNA μήκους 2.8kb. Το γονίδιο ανήκει σε μία οικογένεια γονιδίων που έχουν διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό εξελικτικά. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει άλλα δύο μέλη, το p63 και το p73. [47,48]



Εικόνα 1.12: Α) τα ιντρόνια 1-10 του γονιδίου p53 και το μέγεθός τους.

Β) το εξόνια 1-11 του γονιδίου p53 και το μέγεθός τους. [83]

### 1.8.2. Δομή της πρωτεΐνης p53

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, μία φωσφοπρωτεΐνη 53 kDa, η οποία βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων. Πρόκειται για ένα τετραμερές πολυπεπίτιδιο που αποτελείται από 393 αμινοξέα. Βάσει πολλαπλών αναλύσεων της δομής της p53, η πρωτεΐνη αυτή χωρίζεται στις εξής τέσσερις περιοχές, με διαφορετικές για την κάθε μία λειτουργίες. [49]

α) Αμινοτελικό άκρο (*N-terminus*) (aa 1-50)

- Λειτουργία ενεργοποίησης (transactivation): αλληλεπίδραση των aa 1-42 με τις υπομονάδες των μεταγραφικών παραγόντων TFDI1 και TFIID
- Αυτορρυθμιστικός βρόγχος (autoregulatory loop): δέσμευση με την πρωτεΐνη MDM2, η οποία αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του p53 [50,51]

β) Περιοχή πλούσια σε προλίνη (aa 63-97)

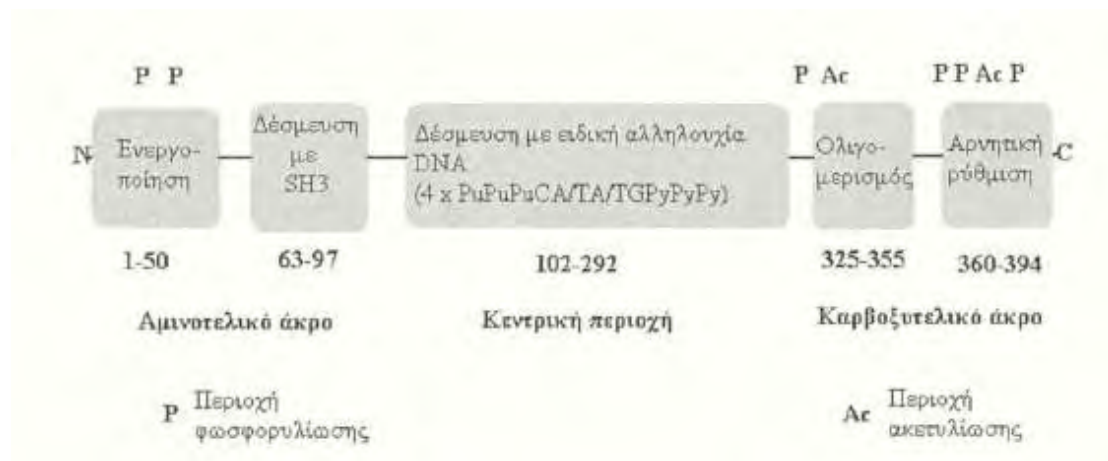
Είναι σημαντική για την ογκοκατασταλτική δράση του p53. Περιέχει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας PXXP και ευθύνεται για την απόπτωση. [52]

γ) Κεντρική περιοχή (*core domain*) (aa 102-292)

Περιοχή δέσμευσης με ειδική αλληλουχία του DNA. Η αλληλουχία αυτή συνήθως (96%) αποτελείται από τρεις τουλάχιστον επαναλήψεις της αλληλουχίας RRRCWWGYYY. [53] Για τη δέσμευση απαιτείται η κεντρική περιοχή και το καρβοξυτελικό άκρο, ανάλογα με τη δομή του DNA. Συγκεκριμένα, όταν το DNA παρουσιάζει κύρτωση, το καρβοξυτελικό άκρο διεγείρει την κεντρική περιοχή, ενώ όταν το DNA είναι γραμμικό, τότε το καρβοξυτελικό άκρο αυτοαναστέλλεται. [54] Αποτελείται από δύο β-πτυχωτά φύλλα, τα οποία γεφυρώνονται από μια ομάδα από βρόχους και έλικες. Οι βρόχοι αυτοί (δάκτυλοι) παραμένουν σταθερά στη θέση τους, μέσω της δέσμευσης κατάλοιπων αμινοξέων τους με ένα άτομο ψευδαργύρου (δομή δακτύλων ψευδαργύρου), το οποίο σταθεροποιεί όλη τη δομή. [55]

δ) Καρβοξυτελικό άκρο (*C-terminus*):

- Τρία σήματα πυρηνικής εντόπισης (aa 305-322): ευθύνονται για την είσοδο και τη γρήγορη συγκέντρωση της p53 στον χώρο του πυρήνα
- Περιοχή τετραμερισμού (aa 325-355): τα αμινοξέα αυτά λειτουργούν ως σήματα εξόδου από τον πυρήνα, ανεξάρτητα, αλλά και σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη MDM2 [56]
- Περιοχή αρνητικής ρύθμισης (aa 360-394): Τα 30 ακραία αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του DNA μέσω τροποποιήσεων, όπως είναι η φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση. Επίσης δεσμεύουν μονόκλωνο DNA. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητο για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. [57]



Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών της πρωτεΐνης p53 [84]

### 1.8.3. Λειτουργίες της p53

Οι δραστηριότητες της p53 είναι οι ακόλουθες:

- Μεταγραφή
- Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου: λειτουργία αντιπολλαπλασιασμού
- Απόπτωση
- Αναστολή αγγειογένεσης
- Ανάπτυξη
- Διαφοροποίηση
- Διαχωρισμός χρωμοσωμάτων
- Κυτταρική γήρανση
- Επιδιόρθωση DNA, όπως επιδιόρθωση εκτομής βάσεων (σταθερότητα γονιδιώματος) [46,58,59,60,61,62]

Οι παραπάνω λειτουργίες της p53 επιτελούνται μέσω της δράσης της ως:

- παράγοντας ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων
- παράγοντας καταστολής της μεταγραφής των γονιδίων- στόχων
- μέσω άμεσης δέσμευσης με άλλες πρωτεΐνες και απόκτησης λειτουργικής διαμόρφωσης. [63]

### 1.8.4. Η p53 και κυτταρικός κύκλος

Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί συχνά σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε σημεία ελέγχου, καθοριστική για την καταστολή της μεγέθυνσης των γενετικών μεταβολών, οι οποίες διαφορετικά θα προκαλούσαν καρκίνο. Η αδρανοποίηση της αγρίου τύπου p53: α) οδηγεί σε απώλεια του σημείου ελέγχου G1/S, η οποία επάγεται από βλάβη στο DNA, β) δεν προκαλεί διακοπή στη φάση G2, και γ) εμφανίζεται ανευπλοειδία και πολυπλοειδία (σημείο ελέγχου M/G1). [64]

### 1.8.5. Η p53 και απόπτωση

Η p53 μετέχει τόσο στις εξωγενείς, όσο και στις ενδογενείς διαδικασίες της απόπτωσης. Προκαλεί απόπτωση δια μέσου της εκπόλωσης των μιτοχονδρίων και της ευαισθητοποίησης των κυττάρων έναντι επαγωγέων της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η p53 αυξάνει την έκφραση των κυτταρικών υποδοχέων θανάτου και διεγείρει την πορεία της απόπτωσης, αυξάνοντας την έκφραση του αποπτωτικού παράγοντα - ενεργοποιητή της πρωτεάσης 1 (APAF-1). [65]

Η p53 μπορεί επίσης να προάγει την απόπτωση δια μέσου μεταγραφικών ανεξάρτητων μηχανισμών. Όπως προαναφέρθηκε, τα μιτοχόνδρια παίζουν κεντρικό ρόλο στην απόπτωση δια μέσου της απελευθέρωσης των προ- αποπτωτικών παραγόντων, όπως του κυτοχρώματος c, του SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases), του AIF (Apoptosis Inducing Factor) και της ενδονουκλεάσης G. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 βρίσκονται ή μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια.

Τόσο τα αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-XL), όσο και τα προ- αποπτωτικά μέλη αυτής (Bax, Bak, Bid, NOXA, PUMA), ενσωματώνουν ποικίλα σήματα κυτταρικού θανάτου και ρυθμίζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Η ενεργοποιημένη p53 είναι δυνατό, άμεσα ή έμμεσα, να τροποποιεί την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, καθώς και άλλων πρωτεϊνών, που ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, γεγονός που σημαίνει ότι μπορούν να τροποποιούν την απελευθέρωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. [65]

### **1.8.6. Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της p53**

Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53 αποτελεί τον πιο συχνό πολυμορφισμό στην πρωτεΐνη αυτή και έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε πολλές έρευνες. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλέτα του κωδικονίου 72 μπορεί να είναι CCC (που κωδικοποιεί το αμινοξύ προλίνη) ή CGC (που κωδικοποιεί για το αμινοξύ αργινίνη). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυο πρωτεϊνικές δομές με διαφορετικές βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες. Έχει βρεθεί ότι στην περίπτωση που ο γενότυπος είναι Arg/Arg η p53 είναι πιο ευαίσθητη στην αποικοδόμηση από την E6 ογκοπρωτεΐνη του HPV σε σχέση με την περίπτωση που ο γενότυπος είναι Pro/Pro. [66]

Για το λόγο αυτό ο πολυμορφισμός αυτός μελετάται ως μοριακός δείκτης επικινδυνότητας για την δημιουργία κακοηθειών από προκαρκινικές αλλοιώσεις.

## **1.9. Η μετάλλαξη T350G στο γονίδιο E6 του HPV-16**

Ενδοτυπικές παραλλαγές του γονιδίου E6 των HPV-16 αποτελούν ένα πιθανό παράγοντα ρίσκου για την δημιουργία καρκίνου του τραχήλου. Η πιο συχνή μετάλλαξη στο γονίδιο E6 είναι στη θέση 350 όπου το T αντικαθίσταται με G που έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου 83 της πρωτεΐνης από λευκίνη σε βαλίνη. Πολλές μελέτες δείχνουν πως η μετάλλαξη αυτή αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε κακοήθειες παρόλο που υπάρχουν και αντικρουόμενα ευρήματα. [67,68,69,70]

### **1.10. Σκοπός**

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι η σύνδεση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53 και των παραλλαγών των στελεχών HPV-16 στο γονίδιο E6 με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες σε θετικά για HPV-16 κλινικά δείγματα.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 124 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό (13 αρνητικά για HPV-16 και 111 θετικά για HPV-16). Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2010-2015 από το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αθηνών «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ», το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας και από ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep και σε μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη.

Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες:

- 13 δείγματα αρνητικά για HPV-16 (πίνακας 2.1)
- 53 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 2.2)
- 48 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 2.3)
- 10 καρκινικά δείγματα (πίνακας 2.4)

Τα θετικά για HPV-16 δείγματα χωρίστηκαν στις παραπάνω ομάδες έπειτα από κυτταρολογική ανάλυση.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC 16	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 17	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 18	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 19	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 20	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 1	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 2	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 3	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 4	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 7	αρνητικό για HPV-	ThinPrep	Νοσοκομείο

	16		ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 10	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 2.1 Δεκατρία κλινικά δείγματα αρνητικά για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC 41	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 26	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 31	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 39	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 36	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 38	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 28	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 29	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 30	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 32	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3515	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3570	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3571	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3603	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3677	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3841	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3611	Χαμηλού βαθμού	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ

	δυσπλασία		ΣΑΒΒΑΣ
AG 3807	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3670	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
747	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
868	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
Δ30	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ34	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
ATT 1	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT2	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 6	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT8	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 10	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 12	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 13	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 26	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 45	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 46	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 51	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 67	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 90	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 98	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 105	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
793	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
858	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
1620	Χαμηλού βαθμού	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ

	δυσπλασία		ΣΑΒΒΑΣ
2121	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
2127	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
2148	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
2186	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
A17	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
A24	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 3	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.2 Πενηντατρία κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC 45	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 51	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 60	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 52	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 53	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 55	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 54	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 57	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 44	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 46	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 47	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 56	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 43	Υψηλού βαθμού	ThinPrep	Νοσοκομείο



	δυσπλασία		ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 50	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 42	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3674	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3676	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3592	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3539	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3623	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
Δ2	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ3	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
ΠΙΝΑ 1	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 9	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 11	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 12	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΙΝΑ 13	Υψηλού βαθμού	ThinPrep	Πανεπιστημιακό

	δυσπλασία		νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΑΤΤ 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ9	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 20	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 80	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
Α3	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
Α6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
Α13	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
Α31	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.3 Σαρανταοκτώ κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Δ59	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ60	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ61	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ62	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ63	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο

Δ64	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ65	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
Δ66	καρκίνος	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
ΠΝΛ 7	καρκίνος	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 16	καρκίνος	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.4 Δέκα κλινικά δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

### 2.2.1. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN).

Σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml τοποθετήθηκαν 10μl γλυκογόνου(100mg/ml), 300μl Lysis Buffer GuSCN (σύσταση: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM ditiotritol, 25mM sodium citrate) και 100μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), τα σωληνάρια αναδεύτηκαν ισχυρά και πραγματοποιήθηκε επώαση στους -20°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000gcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% (-20°C). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 14.000 gcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού ελεύθερου DNAσων και RNAσων . (41)

Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Η επιβεβαίωση της ακεραιότητας του εκχυλισμένου DNA και ο έλεγχος της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε με μια Multiplex-PCR παράλληλα με την ταυτοποίηση των δειγμάτων., όπως περιγράφεται παρακάτω.

### 2.2.2. Εκχύλιση DNA από μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη

Με τη χρήση νυστεριού απομακρύνθηκαν τομές τραχηλικού ιστού, διαμέτρου 5-10 μm, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία απομάκρυνσης της παραφίνης κατά την οποία προστέθηκαν 400μl ξυλόλης σε κάθε σωλήνα και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13.000 gcf για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400μl αιθανόλης (100%). Ακολούθησε άλλη μια ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000 gcf για 5 min στους 4 °C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ξυλόλης. Το ίζημα επώαστηκε στους 50 °C για μισή ώρα έτσι ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.

Τέλος, η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### 2.2.3. Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων

Ο έλεγχος της εκχύλισης του DNA καθώς και η ταυτοποίηση των HPV-16 θετικών δειγμάτων έγινε με μία MultiplexPCR(42). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μόνο το PrimerMix I(επειδή περιέχει το ζεύγος εκκινητών για τον HPV-16) καθώς και το ζεύγος εκκινητών για την β-ακτίνη που χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της PCR.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν PCR
<b>β-ακτίνη</b>	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	498 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	
<b>HPV-16</b>	HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291 bp
	HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
<b>HPV-45</b>	HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233 bp
	HPV45 L1R	CCACGACCAATTTCCATACC	
<b>HPV-66</b>	HPV66 L1F	CGCCGTAACGTATTCCCTA	168 bp
	HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Το PrimerMix I περιείχε 25 pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών και 10 pmol του ζεύγους β-ακτίνης. Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε το μείγμα των εκκινητών, 5X KAPA2G Buffer A (KAPA, Boston, Massachusetts, USA) το οποίο περιείχε 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM dNTPs και 0.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA2GFast DNA polymerase, KAPA, Boston, Massachusetts, USA).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 1 min. Για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 58 °C για 50 sec, επέκταση στους 72 °C για 10 sec. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 1 min.

Η ταυτοποίηση των θετικών για HPV-16 δειγμάτων έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2%.

## 2.3. Έλεγχος πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53

Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της p53 ελέγχθηκε με τη μέθοδο PCR-RFLP.

### 2.3.1. Ενίσχυση με PCR

Με την μέθοδο της PCR ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου p53 μήκους 309 bp το οποίο περιέχει το κωδικόνιο 72. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl τα οποία περιείχαν το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 25pmol, 1 mM dNTPs, 2,5U θερμοανθεκτικής Paq DNA πολυμεράσης και 1X Paq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl<sub>2</sub>.

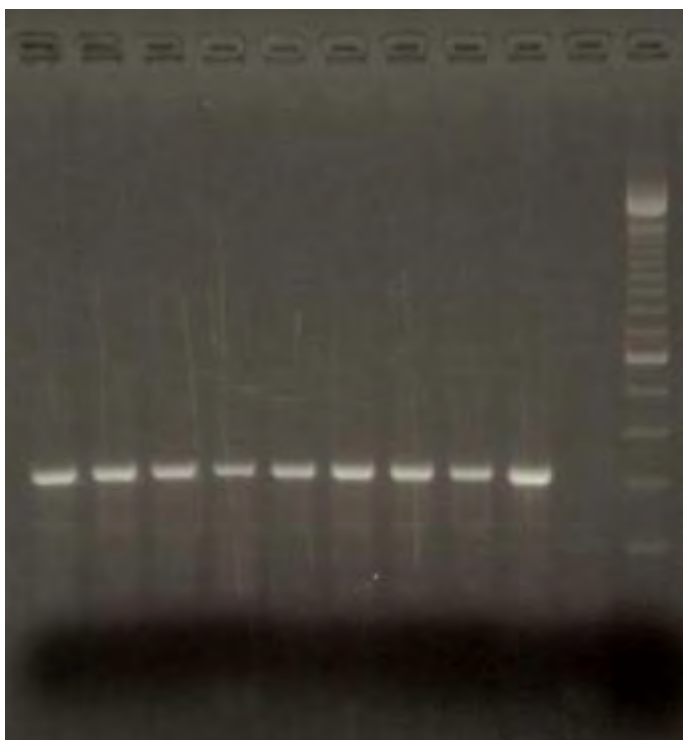
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
p53 F	TTC ACC CAT CTA CAG TCC
p53 R	CTC AGG GCA ACT GAC CGT

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min. Για 50 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 20sec, υβριδοποίηση στους 52 °C για 20 sec, επέκταση στους 72 °C για 30 sec. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 min.

### 2.3.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από την αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο με σκοπό τη δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν σε «πηγαδάκια» 10 μl από κάθε προϊόν της αντίδρασης PCR αφού πρώτα αναμίχθηκαν με 2-3 μl χρωστικής ουσίας. Στη συνέχεια, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 130 V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Το “ύψος” σε ζεύγη βάσεων των τμημάτων εξακριβώθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen UK).

309bp →



Εικόνα 2.1: Ενδεικτική φωτογραφία με το αποτέλεσμα της PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 309 bp

### **2.3.3. Πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI**

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI(New England Biolabs, Ipswich, MA). Συγκεκριμένα, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl τα οποία περιείχαν 10U του ενζύμου , 1μg DNA , 1X NEBuffer και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με ddH<sub>2</sub>O. Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε στους 60 °C για 1 ώρα και στο πέρας της επώασης προστέθηκαν 5μl Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση.

### **2.3.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης**

Τα αποτελέσματα της πέψης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αгарόζης συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο με σκοπό τη δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν σε «πηγαδάκια» 8-10 μl από κάθε προϊόν της πέψης αφού πρώτα αναμείχθηκαν με 5 μl loading buffer. Στη συνέχεια, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 130 V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αгарόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

### 2.3.5. Καθορισμός γενοτύπου

Ο καθορισμός του γενοτύπου έγινε βάσει του αποτελέσματος της πέψης. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο Pro δεν κόβεται κατά την αντίδραση οπότε φαίνεται σαν ολόκληρο το προϊόν της PCR, μήκους 309 bp, ενώ το αλληλόμορφο Arg κόβεται κατά την αντίδραση σε δύο τμήματα, μήκους 175 και 134 bp αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, ο γενότυπος Pro/Pro παρουσιάζεται σαν μια ζώνη 309 bp, ο γενότυπος Arg/Arg παρουσιάζεται σαν δυο ζώνες 175 και 134 bp και τέλος ο γενότυπος Arg/Pro παρουσιάζεται σαν τρεις ζώνες 309, 175 και 134 bp.



Εικόνα 2.2: Ενδεικτική φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης όπου φαίνονται τα τρία διαφορετικά πρότυπα πέψης που αντιπροσωπεύουν τους τρεις διαφορετικούς γενότυπους. Συγκεκριμένα, από τα αριστερά προς τα δεξιά : ο γενότυπος Arg/Pro, ο γενότυπος Pro/Pro, ο γενότυπος Arg/Arg και τέλος Ladder 100 bp.

## 2.4. Ανάλυση της παραλλαγής T350G του HPV-16

### 2.4.1. Ενίσχυση τμήματος των γονιδίων E6/E7

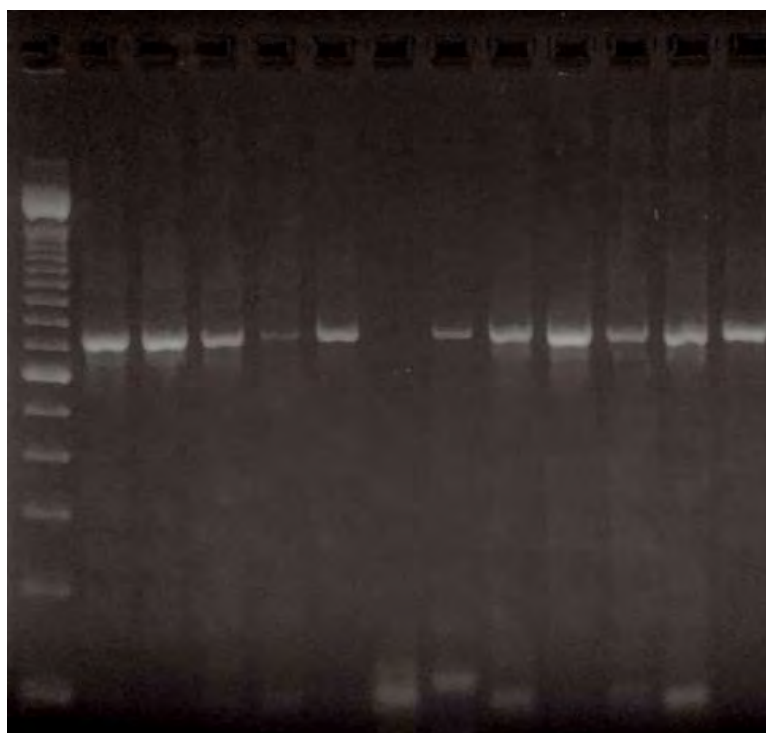
Με την μέθοδο της PCR ενισχύθηκε τμήμα των γονιδίων E6/E7 μήκους 715 bp το οποίο περιέχει τη θέση 350 του γονιδίου E6. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl τα οποία περιείχαν το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 50pmol, 1 mM dNTPs, 2U θερμοανθεκτικής Paq DNA πολυμεράσης και 1X Paq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl<sub>2</sub>.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
HPV-16 41(forward)	AGC CAC CCA GAA AGT TAC CA
HPV-16 757 (reverse)	ATG GGG CAC ACA ATT CCT AG

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min. Για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 40sec, υβριδοποίηση στους 55 °C για 50 sec, επέκταση στους 72 °C για 1 min. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 min.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

715bp →



Εικόνα 2.3: Ενδεικτική φωτογραφία του αποτελέσματος της PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 715 bp καθώς και όλα τα παραπροϊόντα της αντίδρασης.



#### 2.4.2. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

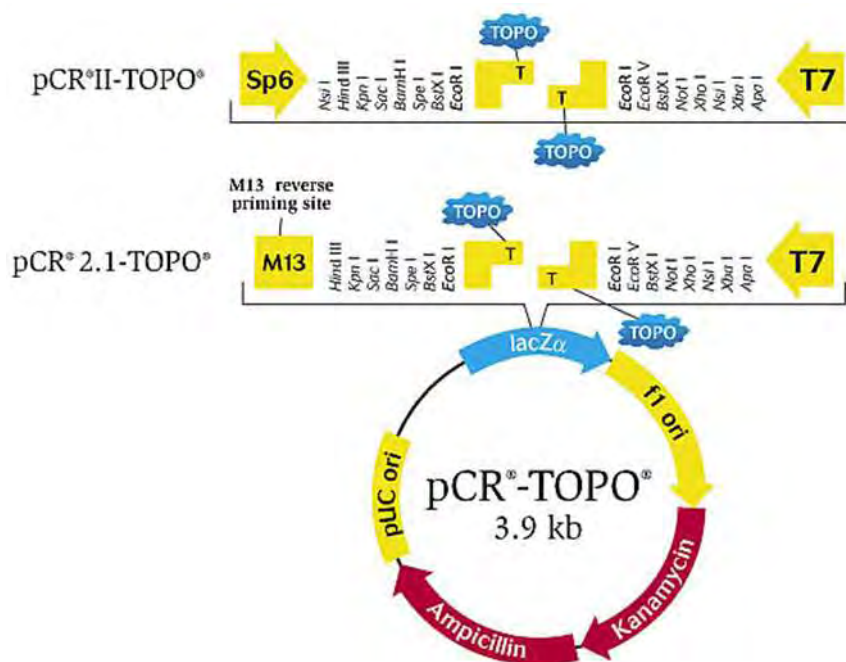
Αφού εκτεθεί το πήκτωμα αγαρόζης σε ακτινοβολία UV, ακολουθεί η απομόνωση των προϊόντων της PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα προϊόντα του καθαρισμού υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση.

#### 2.4.3. Μοριακή κλωνοποίηση

Πριν την αλληλούχιση τμημάτων DNA είναι απαραίτητο να μην υπάρχουν μείγματα, τα οποία δυσχεραίνουν τη διαδικασία της αλληλούχισης και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: α) η προσθήκη άκρων A στα τμήματα DNA β) η αντίδραση της τοποισομεράσης, γ) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων δ) Colony PCR (προαιρετικό στάδιο) ε) δημιουργία υγρών καλλιιεργειών στ) η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων ζ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

α) Προσθήκη άκρων A : Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της τοποισομεράσης πρέπει να προηγηθεί αυτό το βήμα. Συγκεκριμένα, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl τα οποία περιέχουν 7 μl καθαρισμένου DNA, 5U KAPA Taq Pol , 1X KAPA Taq Buffer, 0,2 mM dATPs και ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από ddH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 72 °C για 30 min.

β) Αντίδραση τοποισομεράσης : Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) (Εικόνα 2.1), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl pCR 2.1-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH<sub>2</sub>O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR που πλέον φέρει άκρα A. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) και των θέσεων κοπής του ενζύμου EcoRI.

γ) Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων : Η διαδικασία του μετασηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε ολόκληρη την ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η προσθήκη 800μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1 h. Έπειτα επιστρώνουμε 300μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Αφού προστεθούν 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA), ακολουθεί ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37 °C.

δ) Colony PCR : Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα επιπλέον βήμα ελέγχου του ανασυνδυασμού των πλασμιδιακών φορέων. Με την Colony PCR μπορούμε γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια να επιβεβαιώσουμε την ένθεση. Συγκεκριμένα, επιλέγουμε 2-3 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και δημιουργούμε ελαιώρημα σε 15 μl ddH<sub>2</sub>O για την κάθε αποικία. Έπειτα μεταφέρουμε 3 μl του ελαιωρήματος σε πλαστικούς σωλήνες και πραγματοποιείται λύση των βακτηρίων με θέρμανση στους 95 °C για 15 min. Στη συνέχεια κάνουμε spin down τους πλαστικούς σωλήνες και τους τοποθετούμε στον πάγο για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθεται το MasterMix και πραγματοποιείται PCR. Το MasterMix περιέχει το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 25pmol, 1 mM dNTPs, 2,5U θερμοανθεκτικής Paq DNA πολυμεράσης και 1X Paq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl<sub>2</sub>.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min. Για 30 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 55 °C για 30 sec, επέκταση στους 72 °C για 30 sec.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε το μοναδικό προϊόν στο μέγεθος του ενθέματος (715bp).

ε) Δημιουργία υγρών καλλιεργειών: Αφού επιβεβαιωθεί ο ανασυνδυασμός των πλασμιδιακών φορέων μεταφέρουμε 3 μl από το κάθε εναιώρημα σε 2ml LB Broth με 1μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται ολονύχτια στους 37 °C στις 210 στροφές/min.

στ) Απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων : Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

ζ) Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI : Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Shiga, Japan) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε την ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος.

#### **2.4.4. Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας**

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen (Amsterdam, the Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος κάθε χρωματογραφήματος για την ποιότητά του και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως προς την ειδικότητά τους αρχικά μέσω επεξεργασίας τους με το πρόγραμμα GeneRunner και έπειτα μέσω ομοπαράθεσης με το πρόγραμμα MEGA με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του HPV-16 (HPV16R), η οποία είναι

διαθέσιμη στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων Los Alamos National Laboratory. Με την ομοπαράθεση ελέγχθηκε και η μετάλλαξη στη θέση 350 του γονιδίου E6.

## 2.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο  $X^2$  (Chi-square test) με διόρθωση του Yates (Yates' correction) σε 2 x 2 πίνακα συνάφειας (Contingency table) που δημιουργείται με βάση τις παρατηρούμενες τιμές και τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism v. 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA), το οποίο είναι διαθέσιμο και διατίθεται στον ακόλουθο σύνδεσμο <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>. Η διόρθωση Yates χρησιμοποιήθηκε με στόχο να αυξηθεί το παρατηρούμενο επίπεδο σημαντικότητας. Επιπλέον, η τιμή κριτηρίου P θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική σε τιμές μικρότερες του 0.05. Η τιμή κριτηρίου P καθορίζει το παρατηρούμενο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας που υπολογίστηκε με τη μέθοδο  $X^2$

Οι συχνότητες των απολοτύπων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Shesis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>). Τέλος, ο προσδιορισμός του λόγου των σχετικών πιθανοτήτων (OR, Odds ratio) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEDCALC το οποίο είναι διαθέσιμο στον ακόλουθο σύνδεσμο ([https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)). Ως λόγος σχετικών πιθανοτήτων ορίζεται η σχετική πιθανότητα έκθεσης σε Ασθενείς προς σχετική πιθανότητα έκθεσης σε Μάρτυρες. Όσον αφορά την εν λόγω εργασία ο λόγος OR αναφέρεται στην πιθανότητα να αναπτύξει ο ασθενής τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία όταν φέρει συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντός της p53 σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα Ελληνίδων γυναικών. Σε τιμές  $OR > 1$  επικρατεί βλαπτική επίδραση του παράγοντα, σε τιμές  $OR = 1$ , δεν υπάρχει επίδραση του παράγοντα, ενώ τιμές  $OR < 1$  αποτελούν ένδειξη προστατευτικής επίδρασης του παράγοντα.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα

#### 3.1. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Πολυμορφισμός Arg72Pro	Μετάλλαξη T350G
LBC 16	Αρνητικό για HPV-16	Pro/Pro	
LBC 17	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 18	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Pro	
LBC 19	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 20	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 1	Αρνητικό για HPV-16	Pro/Pro	
LBC 2	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 3	Αρνητικό για HPV-16	Pro/Pro	
LBC 4	Αρνητικό για HPV-16	Pro/Pro	
LBC 7	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 10	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 14	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Pro	
LBC 15	Αρνητικό για HPV-16	Arg/Arg	
LBC 41	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 26	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 31	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 39	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
LBC 36	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
LBC 38	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
LBC 28	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 29	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G

LBC 30	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
LBC 32	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3515	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3570	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3571	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3603	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3677	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3841	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3611	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
AG 3807	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
AG 3670	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
747	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
868	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
Δ30	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
Δ34	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ATT 1	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ATT2	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ATT 6	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	G
ATT8	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
ATT 10	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
ATT 12	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
ATT 13	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
ATT 14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ATT 15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
ATT 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
ATT 26	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ATT 45	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	T

ATT 46	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
ATT 51	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
ATT 67	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
ATT 90	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	
ATT 98	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
ATT 105	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
793	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
858	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
1620	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	G
2121	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
2127	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
2148	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
2186	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
A17	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	T
A24	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
ΠΙΝΑ 3	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
LBC 45	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
LBC 51	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 60	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
LBC 52	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
LBC 53	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 55	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 54	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 57	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
LBC 44	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
LBC 46	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
LBC 47	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 56	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T

LBC 43	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
LBC 50	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
LBC 42	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
AG 3674	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3676	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3592	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
AG 3539	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
AG 3623	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
Δ2	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
Δ3	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
Δ15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
Δ16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	
ΠΙΝΑ 1	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
ΠΙΝΑ 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
ΠΙΝΑ 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
ΠΙΝΑ 6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	G
ΠΙΝΑ 9	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
ΠΙΝΑ 10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
ΠΙΝΑ 11	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
ΠΙΝΑ 12	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	T
ΠΙΝΑ 13	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ΠΙΝΑ 14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	
ΠΙΝΑ 15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
ATT 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	G
ATT 5	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G



ATT9	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
ATT 16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Pro	G
ATT 20	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Pro/Pro	T
ATT 80	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
A3	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
A6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
A13	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
A31	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Arg/Arg	G
Δ59	Καρκίνος	Arg/Arg	
Δ60	Καρκίνος	Arg/Arg	
Δ61	Καρκίνος	Arg/Pro	
Δ62	Καρκίνος	Arg/Pro	
Δ63	Καρκίνος	Arg/Pro	
Δ64	Καρκίνος	Arg/Pro	
Δ65	Καρκίνος	Arg/Arg	
Δ66	Καρκίνος	Arg/Arg	
ΠΙΝΑ 7	Καρκίνος	Arg/Arg	G
ΠΙΝΑ 16	Καρκίνος	Arg/Arg	G

Πίνακας 3.1: Στον πίνακα αυτό φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μελέτης. Για κάθε δείγμα παρουσιάζεται η κωδικοποίησή του, η κλινική εικόνα, ο γενότυπος της p53 και τέλος η μετάλλαξη T350G. Με μαύρο χρώμα παρουσιάζονται τα αρνητικά για HPV-16 δείγματα, με μπλε χρώμα τα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, με κόκκινο χρώμα τα υψηλού βαθμού δυσπλασίας και με πράσινο τα καρκινικά δείγματα.

### 3.2. Συσχέτιση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53 με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα

Cervical lesion	Samples (n)	Arg/Arg [n (%)]	Arg/Pro[n (%)]	Pro/Pro[n (%)]	OR Arg/Arg vs other	P-Value
Low grade	53	18 (34)	23 (43.4)	12 (22.6)	1	
High grade	48	30 (62.5)	15 (31.25)	3 (6.25)	3.24 (1.43-7.32)	0.0041
Cervical Cancer	10	6 (60)	4 (40)	0 (0)	2.9 (0.72-11.67)	0.12

Πίνακας 3.2 : Στον πίνακα αυτό φαίνεται για τον πολυμορφισμό του κωδικονίου 72 της p53 η συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου Arg/Arg σε σχέση με τους άλλους δύο γονοτύπους (Arg/Pro+Pro/Pro) μεταξύ HPV16 θετικών δειγμάτων που έχουν χαρακτηριστεί ως δείγματα χαμηλού (Low grade) και υψηλού βαθμού (High grade) τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και σε περιπτώσεις καρκίνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι υπάρχει σημαντική επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (34%) και των δειγμάτων υψηλού βαθμού δυσπλασίας (62.5%) και των περιπτώσεων καρκίνου (60%).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική διαφορά στην επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg (Arg/Arg vs Arg/Pro + Pro/Pro) μεταξύ των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού δυσπλασίας (34% των δειγμάτων με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας έναντι του 62.5% των δειγμάτων με υψηλό βαθμό δυσπλασίας). Η υψηλή επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας είναι στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνεται με δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας ( $P = 0.0041$ ). Επιπλέον, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 3.24 (OR = 3.24) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.43 έως 7.32 (95% CI = 1.43 έως 7.32). Τέλος, δεν αναφέρθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά από την σύγκριση της επικράτησης του Arg/Arg γονοτύπου μεταξύ δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και καρκίνου (34% των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας έναντι 60% των δειγμάτων καρκίνου) ( $P\text{-value} = 0.12 > 0.05$ ).

Όπως παρατηρείται και στον πίνακα 3.2 η ανάλυση του λόγου των σχετικών πιθανοτήτων (OR) από την σύγκριση των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας με τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας και των περιπτώσεων καρκίνου έδωσε τιμές  $> 1$ , γεγονός που υποδηλώνει ότι η επικράτηση του Arg/Arg γονοτύπου έχει βλαπτική επίδραση στην ανάπτυξη τραχηλικής αλλοίωσης και καρκίνου. Παρόλα αυτά, μόνο η σύγκριση των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού δυσπλασίας θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Λαμβάνοντας όλα τα ανωτέρω στοιχεία υπόψη συμπεραίνουμε ότι η επικράτηση του

γονοτύπου Arg/Arg έχει βλαπτική επίδραση στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού δυσπλασίας στο εξεταζόμενο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκε στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό.

Cervical lesion	Samples (n)	Arg [n (%)]	Pro[n (%)]	OR Arg vs Pro (95% CI)	P-value
Low grade	53	59(55.7)	47 (44.3)	1	
High grade	48	<b>75 (78.1)</b>	<b>21 (21.9)</b>	<b>2.85 (1.53-5.27)</b>	<b>0.0007</b>
Cervical Cancer	10	16 (80)	4 (20)	3.18 (0.1- 10.1)	0.042

Πίνακας 3.3: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η αλληλομορφική συσχέτιση. Από την στατιστική ανάλυση φαίνεται πως οι γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο Arg έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού δυσπλασίας ( $P = 0.0007$ ), ο OR είναι 2.85 (95% CI = 1.53–5.27), καθώς και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας ( $P = 0.0042$ ), ο OR είναι 3.18 (95% CI = 0.1–10.1).

### 3.3. Συσχέτιση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της p53 με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας και την μετάλλαξη T350G σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα

Στην συγκεκριμένη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα για τα οποία ελέγχθηκε η μετάλλαξη T350G (από τα 53 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας χρησιμοποιήθηκαν τα 35 και από τα 48 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας χρησιμοποιήθηκαν τα 35). Επιπλέον, τα καρκινικά δείγματα δεν συμπεριλήφθηκαν καθώς μόνο σε δύο ελέγχθηκε η μετάλλαξη.

Cervical lesion	Samples (n)	Arg/Arg [n (%)]	Arg/Pro[n (%)]	Pro/Pro[n (%)]	OR Arg/Arg vs other (95% CI)	P-value
Low grade	35	13 (37.1)	17 (48.6)	5 (14.3)	1	
High grade	35	26 (74.3)	6 (17.1)	3 (8.6)	4.88 (1.76-13.6)	0.0018
Allelic association						
Cervical lesion		Arg [n (%)]	Pro[n (%)]	OR Arg vs Pro (95% CI)	P-value	
Low grade		43 (61.4)	27 (38.6)	1		
High grade		58 (82.9)	12 (17.1)	3 (1.38-6.66)	0.0047	

Πίνακας 3.4 : Στον πίνακα αυτό φαίνεται για τον πολυμορφισμό του κωδικονίου 72 της p53 η συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου Arg/Arg σε σχέση με τους άλλους δύο γονοτύπους (Arg/Pro+Pro/Pro) μεταξύ HPV16 θετικών δειγμάτων που έχουν χαρακτηριστεί ως δείγματα χαμηλού (Low grade) και υψηλού βαθμού (High grade) τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι υπάρχει σημαντική επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (37,1%) και των δειγμάτων υψηλού βαθμού δυσπλασίας (74,3%). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική διαφορά στην επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg (Arg/Arg vs Arg/Pro + Pro/Pro) μεταξύ των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού δυσπλασίας (37,1% των δειγμάτων με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας έναντι του 74,3% των δειγμάτων με υψηλό βαθμό δυσπλασίας). Η υψηλή επικράτηση του γονοτύπου Arg/Arg σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας είναι στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνεται με δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (P = 0.0018). Επιπλέον, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 4,88 (OR = 4,88) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.76 έως 13,5 (95% CI = 1.76 έως 13,5).

Από την αλληλομορφική συσχέτιση προκύπτει ότι οι γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο Arg έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού δυσπλασίας (P = 0.0047), ο OR είναι 3 (95% CI = 1.38–6.66).

Cervical lesion	Samples (n)	T350G [n (%)]	T350T [n (%)]	OR T350G vs T350T (95% CI)	P-value
Low grade	35	23 (65.7)	12 (34.3)	1	
High grade	35	27 (77.1)	8 (22.9)	2.34 (0.72-7.58)	0.28

Πίνακας 3.5 : Η παραλλαγή T350G είναι επικρατής τόσο στις χαμηλού βαθμού όσο και στις υψηλού βαθμού δυσπλασίες. Η παρουσία της παραλλαγής T350G στις υψηλού βαθμού δυσπλασίες (77.1%) σε σύγκριση με την παρουσία στις χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (65.7%) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ( $X^2$  test= 1.12, P=0.28), ο OR είναι 1.76 (95% CI: 0.6-5.05).

T350G	Samples (n)	Arg/Arg [n (%)]	Arg/Pro or Pro/Pro [n (%)]	OR Arg/Arg vs other (95% CI)	P-value
Low grade	23	10 (43.5)	13 (56.5)	1	
High grade	<b>27</b>	<b>19 (70.4)</b>	<b>8 (29.6)</b>	<b>3.09 (0.96-9.9)</b>	<b>0.05</b>

Πίνακας 3.6 : Στον πίνακα αυτό φαίνεται η σύγκριση των δειγμάτων υψηλού βαθμού δυσπλασίας που φέρουν την παραλλαγή T350G και φέρουν επίσης τον γενότυπο Arg/Arg, με τα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας που φέρουν την παραλλαγή T350G και φέρουν έναν από τους δυο άλλους γενότυπους. Η παρουσία του γενότυπου Arg/Arg στα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας που φέρουν την παραλλαγή T350G ήταν 70.4% (19/27) και στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας 43.5% (10/23). Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $X^2$  test= 3.687 **P=0.05**), ο OR είναι 3.09 (95% CI: 0.96-9.9).

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

### Συζήτηση

Η πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο έναντι της ογκογένεσης καθώς ρυθμίζει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς όπως η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η επιδιόρθωση βλαβών του DNA ως απάντηση σε στρεσογόνους παράγοντες. [45] Η κατανομή των διαφορετικών πολυμορφισμών του κωδικονίου 72 της p53 και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο τραχηλικής κακοήθειας ποικίλλει ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς και φυλές. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί πως το αλληλόμορφο Arg είναι πιο επικρατές σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου στους Καυκάσιους σε σύγκριση με τους Ασιατικούς και τους Αφρικανικούς πληθυσμούς. [71,72,73] Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση του Storey και των συνεργατών του [45], προτείνοντας ότι η ομοζυγωτία Arg/Arg στο κωδικόνιο 72 της p53 παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης τραχηλικής κακοήθειας. [72,74,75] Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι συσχέτιση του γενότυπου αυτού με τον κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας περιγράφηκε και σε πληθυσμιακές ομάδες στην Ινδία, το Σουδάν και την Κίνα. [76,77,78]

Αντίθετα, σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση σε Κινέζικο πληθυσμό έδειξε ότι οι φορείς του γενότυπου Pro/Pro έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου [79], ενώ επίσης έρευνες έδειξαν ότι ο γενότυπος αυτός συνεισφέρει στην ανάπτυξη καρκίνου σε γυναίκες στην Ινδία και στην Κορέα. [80,81]

Μια πιθανή εξήγηση για τα αντικρουόμενα ευρήματα είναι ότι οι διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες εκτίθενται σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και έχουν επίσης διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη διερευνά το αν οι διαφορετικοί γενότυποι όσον αφορά το κωδικόνιο 72 της p53 επηρεάζουν την εξέλιξη των ενδοεπιθηλιακών τραχηλικών αλλοιώσεων σε κακοήθεια σε θετικές για HPV16 Ελληνίδες και επίσης διερευνά την επίπτωση των ενδοκυτταρικών παραλλαγών στον γονίδιο E6 σε συνέργεια με τις διαφορετικές p53 στην πρόοδο της κακοήθειας του τραχήλου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν μια ισχυρή επικράτηση του γενότυπου Arg/Arg ανάμεσα στα διάφορα στάδια της τραχηλικής αλλοίωσης, καθώς και στα καρκινικά δείγματα. Συγκεκριμένα, σημαντικό ποσοστό γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασία είχαν το γενότυπο Arg/Arg και φαίνεται ότι οι φορείς του αλληλομόρφου Arg έχουν τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης υψηλού βαθμού δυσπλασίας σε σχέση με χαμηλού βαθμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση του Storey και των συνεργατών του. Παρόλο που αυξημένη παρουσία του γενότυπου Arg/Arg παρατηρήθηκε στα καρκινικά δείγματα (60%), δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως ο αριθμός των καρκινικών δειγμάτων ήταν μικρός και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να δωθεί

συμπέρασμα όσον αφορά τη σχέση μεταξύ του γενοτύπου Arg/Arg και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου.

Στην παρούσα μελέτη ο δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση του κατά πόσο τα πρότυπα στελέχη ή οι παραλλαγές του HPV16 σε συνδυασμό με τον γενότυπο p53 Arg/Arg μπορούν να επιρεάσουν την ευαισθησία του ασθενούς στην ανάπτυξη σοβαρότερων δυσπλασιών. Σε μια πρόσφατη μελέτη στην Ιταλία βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό η παρουσία της παραλλαγής T350G σε γυναίκες που φέρουν τον γενότυπο p53 Arg/Arg αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. [79] Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά, στην παρούσα εργασία βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραλλαγής T350G και του γενότυπου p53 Arg/Arg σε γυναίκες με υψηλού βαθμού δυσπλασία, γεγονός που υποδεικνύει ότι ασθενείς με τον γενότυπο p53 Arg/Arg που έχουν μολυνθεί από την συγκεκριμένη παραλλαγή του HPV16 έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής τραχηλικής αλλοίωσης. Η σχέση αυτή έχει περιγραφεί στο παρελθόν, προτείνοντας πως η επίπτωση της πρωτεΐνης p53 στη μορφή Arg-72 στην πρόοδο της ενδοεπιθηλιακής τραχηλικής αλλοίωσης πιθανώς να επηρεάζεται από την παραλλαγή T350G. [75,79] Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η πρωτεΐνη p53 στη μορφή Arg-72 να είναι πιο ευαίσθητη στην αποικοδόμησή της από την ογκοπρωτεΐνη E6 με την αμινοξική αντικατάσταση L83V (T350G) , γεγονός που αυξάνει την ευπάθεια των ασθενών όσον αφορά τον καρκίνο του τραχήλου. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των γενοτύπων της p53 και των E6 παραλλαγών επηρεάζει το ογκογόνο δυναμικό του HPV16 και μπορεί να εξηγήσει την διαφορετική επίδραση των γενοτύπων p53 στην ευαισθησία ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου σε διαφορετικούς γεωγραφικούς πληθυσμούς. Παρόλα αυτά περεταίρω μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς είναι απαραίτητες έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η υπόθεση.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει πως ασθενείς με γενότυπο p53 Arg/Arg παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ άτομα που έχουν μολυνθεί από την παραλλαγή του HPV16 T350G και φέρουν και το γενότυπο p53 Arg/Arg εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως το ογκογόνο δυναμικό του HPV16 αυξάνεται με την παρουσία του γενότυπου p53 Arg/Arg ,συμπεραίνοντας ότι η ειδική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών E6 (L83V) - p53 (Arg-72) μπορούν να μεταβάλλουν την ευαισθησία του ατόμου ως προς την ανάπτυξη κακοήθειας του τραχήλου της μήτρας.

## Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* Oct;445(1-2):11-20
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* Jun 20;324(1):17-27.
3. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* Oct;445(1-2):224-31
4. Zheng ZM, Baker CC. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* Sep 1;11:2286-302
5. de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* Oct;445(1-2):2-10
6. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* Dec;60(6):1445-56
7. Stanley M. (2008) The epidemiology and burden of HPV disease. *Nurs Times* Sep 9-15;104(36):38-40
8. Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* Oct;445(1-2):169-74
9. El Mehdaoui S, Touzé A, Laurent S, Sizaret PY, Rasschaert D, Coursaget P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. (2000) *J Virol.* Nov;74(22):10332-40
10. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* Nov 20;30 Suppl 5:F55-70
11. Frattini MG, Laimins LA.(1994) Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;91(26):12398-402
12. Hughes FJ, Romanos MA.(1993) E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* Dec 25;21(25):5817-23.
13. Eric A. Abbate, James M. Berger, and Michael R. Botchan(2004) The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* Aug 15;18(16):1981-96
14. Leng X, Ludes-Meyers JH, Wilson VG.(1997) Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding and E2 interaction capacity. *J Virol.* Jan;71(1):848-52
15. Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. (1998) The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology.* Mar 15;242(2):378-86.



16. Sanders CM, Stenlund A (2000) Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* Feb 4;275(5):3522-34.
17. Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* Oct;445(1-2):80-98
18. McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J.(2010) E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*
19. Tsakogiannis D, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Skordas V, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece.(2012) *Arch Virol. Sep*;157(9):1729-39
20. DiMaio D, Petti LM. (2013) The E5 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):99-114
21. DiMaio D, Mattoon D.(2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* Nov 26;20(54):7866-73
22. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS.(2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* Nov 1;119(9):2105-12
23. Laura F. Wetherill, Kristopher K. Holmes, Mark Verow, Marietta Müller, Gareth Howell, Mark Harris, Colin Fishwick, Nicola Stonehouse, Richard Foster, G. Eric Blair,<sup>a</sup> Stephen Griffin, and Andrew Macdonald (2012) High-Risk Human Papillomavirus E5 Oncoprotein Displays Channel-Forming Activity Sensitive to Small-Molecule Inhibitors. *J Virol* May;86(9):5341-51
24. Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE.(1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Natl Cancer Inst. Jul* 21;91(14):1211-20
25. zur Hausen H.(2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst. May* 3;92(9):690-8
26. Brimer N, Lyons C, Vande Pol SB.(2007) Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein. *Virology* Feb 20;358(2):303-10
27. Thomas M, Banks L.(1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* Jun;80 ( Pt 6):1513-7
28. Vande Pol SB, Klingelutz AJ.(2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology. Oct*;445(1-2):115-37
29. Yugawa T, Kiyono T.(2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* Mar;19(2):97-113
30. Roman A, Munger K.(2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):138-68

31. Stevaux O, Dyson NJ.(2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol.* Dec;14(6):684-91
32. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO.(1990) The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* Feb;64(2):723-30
33. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA.(2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.* May 18;24(10):1821-30
34. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P.(1995) Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* Oct;69(10):6389-99
35. Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One* ;7(6):e39632
36. Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Durst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One* Jun 18;8(6):e66693
37. Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *GynecolOncol* Jun;118(1 Suppl):S12-7
38. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl AcadSci USA* Dec 1;106(48):20458-63
39. Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* May;110(5):525-41
40. McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* ;72:155-205
41. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (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* May;53(1):25-36
42. Tsakogiannis D, Diamantidou V, Toska E, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Ruether IG, Gortsilas P, Markoulatos P.(2015) Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Arch Virol* Jan;160(1):207-14
43. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* Apr 24;287(16):2114-9
44. Albrechtsen N, Domreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: Complementary roles of activated and non-activated p53. *Oncogene* Dec 13;18(53):7706-17
45. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumour suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* Jun;13(3):332-7
46. Bates S and Vousden KH.(1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* Jan;55(1):28-37

47. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. 2000 The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* May;113 ( Pt 10):1661-70
48. Marin MC and Kaelin Jr WG2000. p63 and p73: old members of a new family. *Biochim Biophys Acta* May 17;1470(3):M93-M100
49. Valkov NI and Sullivan DM2003. Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resistance Updates* Feb;6(1):27-39
50. Kussie PH, Gorina S, Maréchal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP1996. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* Nov 8;274(5289):948-53
51. Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ1994. *Genes Dev*
52. Walker KK, Levine AJ1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* Dec 24;93(26):15335-40
53. Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. *Mol Cell Biol* 1992
54. McKinney K and Prives C2002. Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol*; Oct;22(19):6797-808
55. Meplan C, Richard MJ, Hainaut P2000. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* Jan 1;59(1):25-33
56. Gu J, Nie L, Wiederschain D and Yuan ZM2001. Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol*; Dec;21(24):8533-46
57. Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA and Mukhopadhyaya T. 2002 C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. *Oncogene*; Mar 27;21(13):2102-7
58. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* Apr;1(1):45-9.
59. Levine AJ1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division *Cell* Feb 7;88(3):323-31
60. Almog N and Rotter V1997. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* Aug 8;1333(1):F1-27
61. Oren M and Rotter V1999. Introduction:p53-the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* Jan;55(1):9-11
62. Adimoolam S and Ford JM2003. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair(Amst.)* Sep 18;2(9):947-54
63. Guimaraes DP and Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002 Jan;84(1):83-93.
64. Meek DW. The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol Biol* 2000 Apr;48(3):246-54
65. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharm Sci* 2004 Apr;25(4):177-81
66. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the

- development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998 May 21;393(6682):229-34
67. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006Mar 1;118(5):1071-6
  68. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Apr;15(4):820-2
  69. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Aug 2;98(15):1045-52
  70. Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, Blakey GL, Teel T. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer*. 2009 Dec 1;125(11):2609-13
  71. Inserra P, Abrahamsen M, Papenfuss M, Giuliano AR. Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS* 2003 Dec;14(12):800-4.
  72. Malisic E, Jankovic R, Brotto K, Radulovic S. TP53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Serbian women. *Arch Gynecol Obstet* 2013 Sep;288(3):621-5.
  73. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* 2007 Nov;20(5):731-41
  74. Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* 1999 Dec;80 ( Pt 12):3233-40
  75. van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol*. 2000 Feb;81(Pt 2):317-25
  76. Singhal P, Hussain S, Thakur N, Batra S, Salhan S, Bhamhani S, Bharadwaj M. Association of MDM2 and p53 polymorphisms with the advancement of cervical carcinoma. *DNA Cell Biol*. 2013 Jan;32(1):19-27
  77. Eltahir HA, Elhassan AM, Ibrahim ME. Contribution of retinoblastoma LOH and the p53 Arg/Pro polymorphism to cervical cancer. *Mol Med Rep*. 2012 Sep;6(3):473-6
  78. Yang SD, Cai YL, Jiang P, Li W, Tang JX. Association of a miR-502-binding site single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of SET8 and the TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer in the Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(16):6505-10

79. Burrioni E, Bisanzi S, Sani C, Puliti D, Carozzi F. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. *J Med Virol* 2013 Jan;85(1):83-90
80. Bhattacharya P, Sengupta S. Lack of evidence that proline homozygosity at codon 72 of p53 and rare arginine allele at codon 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. *Gynecol Oncol* 2005 Oct;99(1):176-82
81. Roh JW, Kim BK, Lee CH, et al. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. *Oncol Res* 2010;18(9):453-9.
82. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1):11-22
83. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann. N Y Acad Sci* 2000; 121-139
84. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load : A tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Scientific Publications* 2004;157:247-270