

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

"ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ"

ΜΠΕΛΛΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

«Πολυμορφισμός του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 και σύνδεση των πολυμορφισμών αυτών με υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV-16 κλινικών δειγμάτων»

«Polymorphism of the tumor suppressor gene p16 and association of these polymorphisms with high and low-grade dysplasia positive for HPV-16 clinical samples»



Τριμελής Επιτροπή:

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

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Στάγκος Δημήτριος :Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πρόλογος

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον καθηγητή μου 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 Τοξικολογίας, 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 τον κύριο Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Τοξικολογία» για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, καθώς και τον κύριο Δημήτρη Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Τους ευχαριστώ θερμά για το ότι δέχτηκαν να είναι μέλη της Τριμελούς Επιτροπής μου και επιπροσθέτως για όλες τις γνώσεις, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τηλέμαχο Δημητρίου για την καθοδήγηση και τη συνεργασία, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Δάσκου και τον προπτυχιακό φοιτητή Κώστα Λάμπρου για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύξαμε στο εργαστήριο αλλά και όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Ιολογίας με τους οποίους είχα τη χαρά να συνεργαστώ. Κυρίως όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το διδάκτορα Δημήτρη Τσακογιάννη για τις γνώσεις, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε και το μεταπτυχιακό φοιτητή Γιώργο Μοσχονά για τις γνώσεις, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου παρείχε καθώς και για τη συμβολή του στη συντέλεση τμήματος της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιάννη και Κατερίνα 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.

Το p16 (επίσης γνωστό ως CDKN2/MTS-1/INK4a) είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9p21 και αποτελείται από τρία εξόνια. Η αδρανοποίηση του έχει ως αποτέλεσμα την παράκαμψη της φυσιολογικής αναστολής του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S σε περίπτωση κυτταρικής βλάβης και συνεπώς έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πιστεύεται ότι συμβάλλει στην κακοήθεια, όπως έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Ο L. Yan και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη συχνότητα δύο πολυμορφισμών στο εξόνιο 3 του γονιδίου p16 (540C→G και 580C→T) και κατέληξαν στο ότι ο ένας εκ των δύο πολυμορφισμών (580C→T) πιθανώς σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης των δύο προαναφερθέντων πολυμορφισμών (540C→G και 580C→T) του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες για HPV-16 θετικών κλινικών δειγμάτων.

Συμπερασματικά προτείνεται πως η επικράτηση του p16 540CC γονότυπου έχει σημαντική προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό, καθώς επίσης και ότι φορείς του αλληλομόρφου C έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρού βαθμού δυσπλασίας. Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε σημαντική σύνδεση του πολυμορφισμού p16 580C/T με την εμφάνιση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων. Τέλος προτείνεται πως ο 540G / 580C είναι ένας σημαντικός απλότυπος κινδύνου για την ανάπτυξη υψηλού βαθμού δυσπλασίας μεταξύ των Ελληνίδων γυναικών. Θα πρέπει όμως να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα ώστε ο αριθμός των HPV-16 αρνητικών δειγμάτων να αυξηθεί σε ανάλογο επίπεδο με τα δείγματα των υπόλοιπων ομάδων. Με αυτόν τον τρόπο αυτές οι ομάδες θα είναι πιο ομοιόμορφες και θα υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία των στατιστικών αποτελεσμάτων.

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.

P16 (also known as CDKN2/MTS-1/INK4a) is an important tumor suppressor gene located on chromosome 9p21 composed of three exons. P16 inactivation results in bypassing the normal cell cycle arrest checkpoint G1 / S in the case of cellular damage and therefore has the effect of increasing cell proliferation and it is believed to contribute to malignancy, as it has been shown in previous studies. L. Yan and colleagues studied the frequency of two polymorphisms in exon 3 p16 gene (540C → G and 580C → T) and concluded in that one of the two polymorphisms (580C → T) is probably associated with cancer development of the cervix.

The purpose of this study was to investigate the correlation of these two polymorphisms (540C → G and 580C → T) of the tumor suppressor gene p16 with low and high grade dysplasia of HPV-16-positive Greek women.

In conclusion our results suggest that p16 540CC genotype has significant protective effect on the development of a higher-grade cervical intraepithelia dysplasia in Greek women and also that C allele carriers significantly reduced the risk of high-grade cervical intraepithelia dysplasia. Moreover there is no association between p16 580C / T polymorphism and the appearance of pre-cancerous and cancerous lesions.

Moreover 540G/580C is a major risk haplotype for the development of high grade dysplasia among Greek women. However, these results need to be further validated in a larger group study of HPV-16 negative Greek women.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1.....	8
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά -- Ιστορικά στοιχεία.....	8
1.2. Ταξινόμηση των Papillomaίων.....	8
1.2.1. Alpha-papillomavirus.....	10
1.2.2. Beta-papillomavirus.....	12
1.2.3. Gamma, Mu, Nu papillomavirus.....	12
1.3. Δομή των Ανθρώπινων Papillomaίων (HPVs).....	13
1.3.1. Δομή του καψιδίου.....	13
1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος.....	14
1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1.....	16
1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2.....	17
1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4.....	18
1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5.....	18
1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6.....	19
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7.....	20
1.5. Μορφή του γονιδιώματος.....	23
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs.....	23
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	24
1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	25
1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	26
1.6.4. Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση.....	27
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	28
1.8. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p16 και συσχέτιση των πολυμορφισμών του με ενδοτρα- χηλικές αλλοιώσεις.....	28
1.9. Σκοπός.....	29
Κεφάλαιο 2.....	30

2. Υλικά και μέθοδοι.....	30
2.1. Κλινικά δείγματα.....	30
2.2. Εκχύλιση DNA.....	35
2.2.1. Εκχύλιση DNA (ThinPrep).....	35
2.2.2. Εκχύλιση DNA (Τραχηλικός ιστός μονιμοποιημένος σε παραφίνη)	36
2.3. Ταυτοποίηση δειγμάτων	36
2.4. Ενίσχυση του γονιδίου p16 με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	38
2.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR	40
2.6. RFLP – Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR.....	40
2.7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης	42
2.8. Καθορισμός γενοτύπου	42
Κεφάλαιο 3.....	44
3.Αποτελέσματα.....	44
3.1 Μελέτη των πολυμορφισμών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16	44
3.2. Συσχέτιση των πολυμορφισμών C540G και C580T με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα	50
3.3. Συσχέτιση των πολυμορφισμών C540G και C580T με την ανάπτυξη τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα	54
Κεφάλαιο 4.....	64
4.Συζήτηση.....	64
Κεφάλαιο5	67
5. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	67

Κεφάλαιο 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά-Ιστορικά στοιχεία

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 (HPV) και οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι (de Villiers, 2013, Van Doorslaer, 2013).

Ο ιός HPV μολύνει το τραχηλικό επιθήλιο και ανιχνεύεται τόσο σε κονδυλώματα όσο και σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Η εμπλοκή του HPV 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 καρκινογόνο.

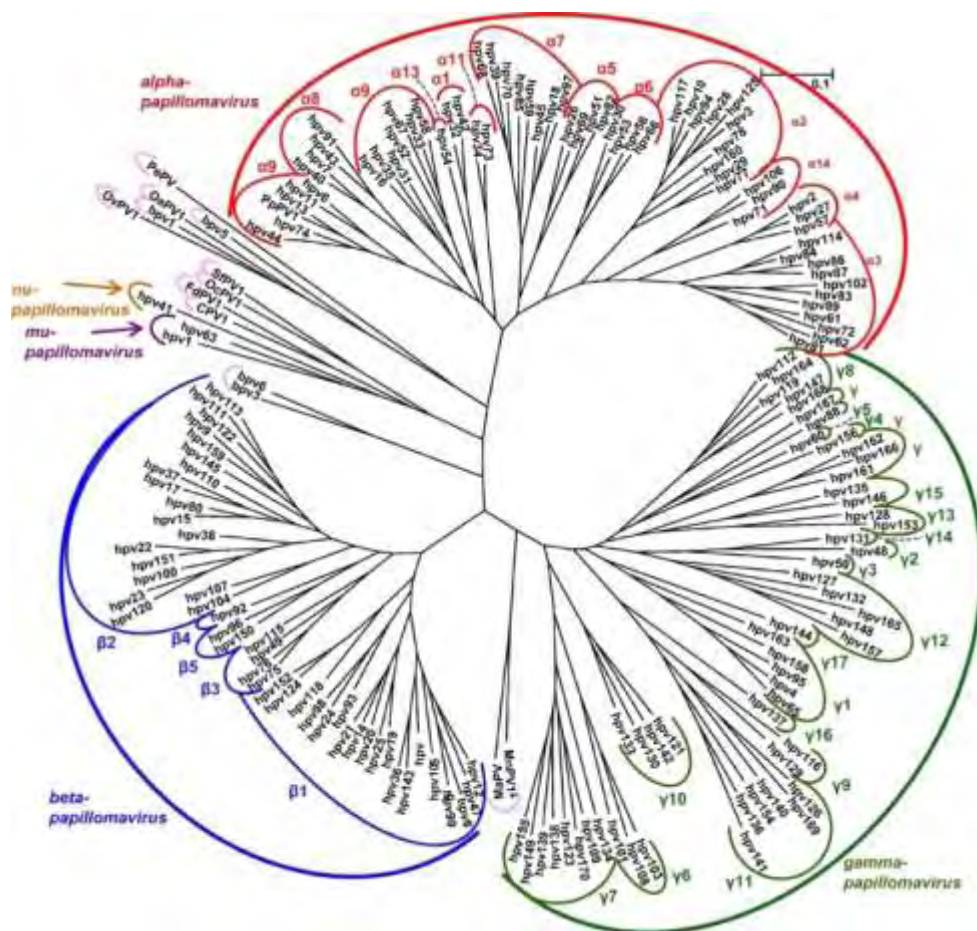
Το 1935 ο ερευνητής Francis Peyton Rous διεπίστωσε πως οι ιοί, που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια, μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο του δέρματος σε κουνέλια, παρατηρώντας ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *Sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Ένα χρόνο αργότερα, το 1936 γεννήθηκε ο Harald zur Hausen, ο οποίος το 1976, δημοσίευσε την υπόθεση ότι ο ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μαζί με τους συνεργάτες του, το 1983-1984, απομόνωσαν τα πρώτα στελέχη HPV16 και HPV18 από καρκινικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας. (Boshart et al., 1984, Gissman et al., 1984). Για αυτή του την έρευνα, και τη συμβολή του στην Ιολογία και την Ιατρική επιστήμη, το 2008 τιμήθηκε μαζί με τους Luc Montagnier και Barre-Sinoussi (HIV) με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής καθώς και με το διεθνές βραβείο Γκάρντνερ.

1.2 Ταξινόμηση

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά ομαδοποιήθηκαν μαζί με τους polyomaviruses και τον SV40 στην μεγάλη οικογένεια των Papovaviridae. Η ομαδοποίηση αυτή βασίστηκε στην ομοιότητα του καψιδίου των παραπάνω ιών, στην έλλειψη περιβλήματος καθώς επίσης στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA (Danos O et al_1989). Πρόσφατα όμως από την διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) έγινε αποδεκτό ότι οι ιοί των θηλωμάτων-papillomaviruses αποτελούν μια ξεχωριστή ταξινομική οικογένεια ιών των Papillomaviridae, η οποία δεν σχετίζεται καθόλου με τους polyomavirus και τον SV40. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε βάση της διαφοράς της οργάνωσης, του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των papillomaviruses και των μελών της οικογένειας Papovaviridae. (de villiers E.M et al 2004)

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους, λόγω του ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμες κυτταρικές σειρές διαφοροποιούμενων επιθηλιακών κυττάρων ώστε να καλλιεργηθούν. Η ταξινόμηση τους συνεπώς βασίστηκε στον προσδιορισμό γενοτύπου του ιού. Συγκεκριμένα, η ταξινόμηση των Papilloma ιών βασίζεται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1, διότι είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο. Ένας νέος τύπος PV ορίζεται εφόσον διαφέρει η αλληλουχία του γονιδίου L1 κατά 10% από τους ήδη γνωστούς τύπους των υπόλοιπων PVs, ενώ διαφορές 2%-10% ορίζουν έναν υπότυπο, καθώς και διαφορές μικρότερες από 2% ορίζουν μία παραλλαγή (de Villiers et al., 2004, Bernard et al., 2010).

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPVs) ομαδοποιούνται σε πέντε γένη (Άλφα-, Βήτα-, Γάμμα-, Μι-, και Νι-PVs) (Εικόνα 1.1.), με βάση το διαφορετικό βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που προκαλούν, καθώς και διαφορετικά χαρακτηριστικά στον κύκλο ζωής τους και την ανάλυση του γονιδιώματός τους (de Villiers et al., 2004, Doorbar et al., 2006, Bernard et al., 2010).



Εικόνα 1.1 Η φυλογενετική ανάλυση των PVs με βάση τις αλληλουχίες L1 ORF 170 τύπων HPV, καθώς και μεμονωμένων ζωικών PV. (deVilliers, 2013)

Ανάλογα με τον επιθηλιακό τροπισμό τους, οι HPVs διαχωρίζονται σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου.

1.2.1 Alpha-papillomavirus

Το γένος Alpha, που αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα HPV, είναι το μοναδικό γένος που περιλαμβάνει αμφοτέρους τους τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου και τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος (όπως ο HPV 2). Οι τύποι που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk), με βάση το κακοήθες δυναμικό τους (Πίνακας 1.1.) (Bzhalava et al., 2013) Περισσότεροι από 30 τύποι HPV είναι γνωστό ότι προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου και μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Οι σχετιζόμενοι με εμφάνιση καρκίνου τύποι HPV ταξινομούνται ως υψηλού κινδύνου (high risk), αφού σύμφωνα με την Παγκόσμια Αρχή της Έρευνας στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση καρκινικών αλλοιώσεων. Οι πιο διαδεδομένοι είναι οι HPV-16 και HPV-18. Ο HPV-16 μάλιστα, κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής, είναι ο πιο συχνά ανιχνεύσιμος τύπος σε κάθε βαθμό ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας (Bzhalava et al., 2013).

Οι υπόλοιποι τύποι του γένους ταξινομούνται ως ενδιάμεσου (middle risk) ή χαμηλού κινδύνου (low risk), ανάλογα με τη συχνότητα που ανευρίσκονται σε καρκίνους. Οι ενδιάμεσου κινδύνου τύποι HPV σχετίζονται κυρίως με κακοήθεις όγκους του τραχήλου, ενώ οι χαμηλού κινδύνου HPV σχετίζονται σπάνια με καρκίνο αλλά προκαλούν θηλώματα στο ουρογεννητικό σύστημα, μια σημαντική σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια (Doorbar, 2006).

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

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση των HPVs σε ομάδες επικινδυνότητας (Bzhalava et al., 2013)

και IARC.

1.2.2 Beta-papillomavirus

Το γένος των Beta papillomaviruses διαιρείται σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη. Τα μέλη της οικογένειας αυτής προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος χωρίς να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί, ότι η μόλυνση από τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis), μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Pfister 2003). Κυρίως τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 παρουσιάζονται στο 90% αυτών των όγκων (Kremsdorf D. et al 1983)

1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV προέρχονται από τρία άλλα γένη (Gamma, Mu and Nu) και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.2) περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu papillomavirus (Doorbar. J 2006)

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

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

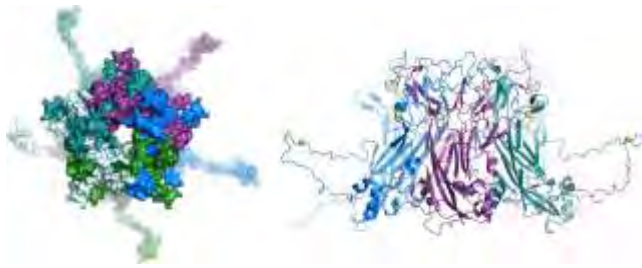
1.3 Δομή του Human papillomavirus (HPV)

1.3.1 Δομή καψιδίου

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων είναι μικροί, άνευ περιβλήματος DNA ιοί, διαμέτρου 55-60nm, οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Το γονιδίωμα των HPVs εσωκλείεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο που συντίθεται από τις πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες μεταφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου μόλυνσης του ιού (Doorbar et al., 2012). Η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του ιού αποκάλυψε ότι η εξωτερική επιφάνεια των ιοσωματίων των HPVs αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 και σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια (Εικόνα 1.2.) (Baker et al., 1991). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Yang R et al 2004).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1, μοριακού βάρους 55kDa, σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου και μεσολαβεί στην αρχική προσκόλληση του ιού στον ξενιστή. Αμέσως μετά την κυτταρική προσκόλληση, η L1 συμβάλλει στην απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η εξωτερική επιφάνεια των HPV ιοσωματίων φέρει 72 πλαϊνές προεξοχές που συντίθενται από πενταμερή της πρωτεΐνης L1. Το N-τελικό και το C-τελικό άκρο της L1 διευθετούνται ως προεξέχουσες θηλίες, οι οποίες σχηματίζουν τον χώρο μεταξύ των πενταμερών (Εικόνα 1.3.). Μεταξύ των γειτονικών πενταμερών δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός, ο οποίος προσδίδει σταθερότητα στο καψίδιο (Modis et al., 2002, Wolf et al., 2010, Buck et al., 2013). Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη L1, δημιουργεί άδεια καψίδια που ορίζονται ως VLPs (virus-like particles) που είναι

μορφολογικά και ανοσολογικά πολύ όμοια με τα ιικά σωματίδια αλλά τους λείπει το ιικό γένωμα. Εμβολιασμός με L1 VLPs προστατεύει από τη μόλυνση από papillomavirus (Yang R et al 2004) (Εικόνα 1.2).



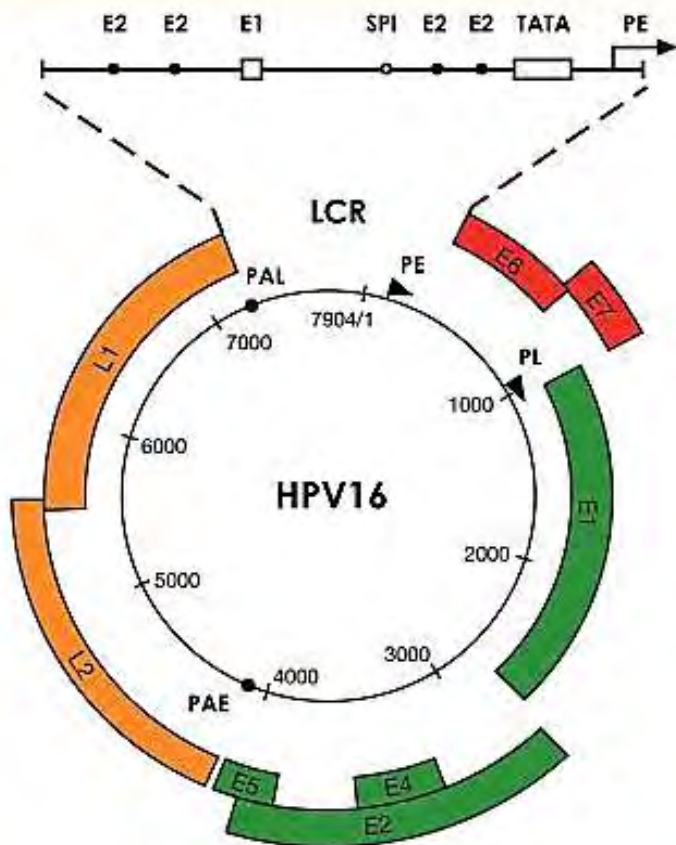
Εικόνα 1.2 Δομή L1 πενταμερούς. Η κάθε L1 αλυσίδα παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η όψη ενός L1 πενταμερούς από την κορυφή. Διακρίνονται ξεκάθαρα οι αλληλοεμπλεκόμενες θηλιές των L1 πενταμερών. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο γειτονικών πενταμερών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί απεικονίζονται ως κίτρινες σφαίρες (Buck et al., 2013).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 έχει μοριακό βάρος ~55 kDa και βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια του καψιδίου. Στο C-τελικό άκρο της L2 υπάρχει ένας υδρόφοβος δεσμός με την L1, ο οποίος επιτρέπει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι να εισέλθει η L2 στο κέντρο του L1 πενταμερούς (Finnen et al., 2003). Η L2 συμμετέχει σε διάφορες σημαντικές διεργασίες, όπως είναι η είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή και η μετακίνηση των ιικών σωματιδίων στα κατάλληλα κυτταρικά όργανα. Η βασικότερη, όμως, λειτουργία της L2 είναι η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες L1 και E2 κατά το σχηματισμό των ώριμων ιικών σωματιδίων (Wang et al., 2013).

1.4 Οργάνωση του γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, το γονιδίωμα των Papilloma ιών είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA μεγέθους περίπου 8kb η οργάνωση του οποίου είναι όμοια σε όλους τους PVs. Το γονιδίωμα των PVs μπορεί να διαιρεθεί, σε τρεις κύριες περιοχές: την πρώιμη (early), την όψιμη (late) και την ρυθμιστική περιοχή (long control region, LCR) (Εικόνα 1.3).

Η πρώτη περιοχή καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γονιδιώματος του ιού και είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του ιού, συμπεριλαμβανομένων των ικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την έναρξη της ικής αντιγραφής. Διακρίνεται σε έξι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs): E1, E2, E4, E5, E6 και E7, τα οποία κωδικοποιούν τις ομόνυμες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η όψιμη περιοχή καταλαμβάνει σχεδόν το 40% του γονιδιώματος του ιού, βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής και περιλαμβάνει δύο ORF, το L1 και το L2 απ' τα οποία προκύπτουν οι καψιδιακές πρωτεΐνες, που εκφράζονται μόνο στα παραγωγικά μολυσμένα κύτταρα (Baker and Howley, 1987). Η περιοχή LCR καταλαμβάνει ένα τμήμα περίπου 850 bp (10% του γονιδιώματος του HPV) και αποτελεί τη ρυθμιστική περιοχή του ικού γονιδιώματος. Εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L1 και πριν την αρχή του γονιδίου E6. Φέρει την θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλαπλές θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, (π.χ. SP1, AP1, Oct1) σημαντικές για τη ρύθμιση της έκφρασης τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων γονιδίων από την RNA πολυμεράση II (Zheng et al., 2006), (Bernard, 2013).



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος του HPV-16 (Doorbar et al., 2012).

Στο γονιδίωμα του HPV-16 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 πρώιμων γονιδίων και ο υποκινητής PL (late promoter, ή αλλιώς

p670), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων. Στην εικόνα 1.3. παρουσιάζονται οι ανωτέρω υποκινητές στις θέσεις 97 και 670. Οι περιοχές που επισημαίνονται ως PAE και PAL υποδηλώνουν τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης, αντίστοιχα (Doorbar et al., 2012).

1.4.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η E1, μεγέθους 600-650 αμινοξέων, αποτελεί την πιο συντηρημένη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τους HPV ιούς, κάτι που αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στον κύκλο ζωής του ιού (Howley PM & Lowy DR 2007, Bergvall et al., 2013). Εμφανίζει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA καθώς και θέση πρόσδεσης για την περιοχή έναρξης της αντιγραφής που βρίσκεται στη ρυθμιστική περιοχή LCR (Dany Vanden Broeck 2012). Επιπλέον έχει δραστηριότητα ελικάσης, ATPάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

Δομικά, η E1 μπορεί να διαιρεθεί σε τρία κύρια λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.5.):

α) Σε μία N-τελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αντιγραφή του ιού (Amin et al., 2000, Morin et al., 2011), β) Σε μία κεντρική περιοχή που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής (Sun et al., 1998, Titolo et al., 2003, Auster and Joshua-Tor, 2004), γ) Σε μία C-τελική ενζυματική περιοχή, ικανή για αυτοσυγκρότηση σε εξαμερή, η οποία έχει δραστηριότητα ATPάσης και βοηθά στο ξετύλιγμα μικρών δίκλωνων τμημάτων DNA (Titolo et al., 2000, White et al., 2001, Castella et al., 2006).



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E1 του BPV1. Τα κύρια λειτουργικά της τμήματα από αριστερά προς τα δεξιά είναι: το N-τελικό άκρο με τη ρυθμιστική περιοχή, η DNA-binding περιοχή και η ATPάση (με δραστηριότητα DNA ελικάσης) (Bergvall et al., 2013).

Η κυριότερη λειτουργία της ιικής E1 πρωτεΐνης είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων των ιικών επισωμάτων κατά τη μόλυνση των βασικών κερατινοκυττάρων. Με άλλα λόγια, η E1 είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ιικό DNA την επισωμική του μορφή (Bergvall et al., 2013). Για να συμβεί αυτό, η E1 πρέπει πρώτα παρουσία ATP να συνδεθεί στη θέση ori του ιικού DNA, με τη βοήθεια

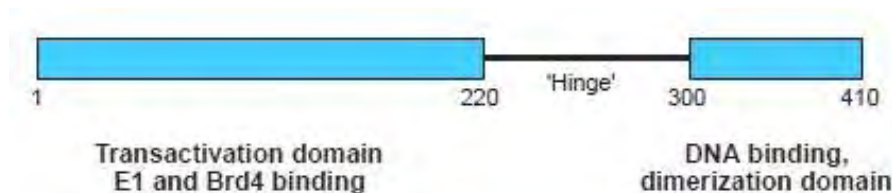
της πρωτεΐνης E2, οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo S. et al 2003). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα E2 διμερές και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν δομική μονάδα για την συγκρότηση ενός μεγαλύτερου E1 εξαμερούς συμπλόκου, που έχει την ιδιότητα να ξετυλίγει το DNA (Sedman J et al 1998). Εκτός από την E2, η E1 αλληλεπιδρά και με κυτταρικές πρωτεΐνες, στρατολογώντας τον κυτταρικό μηχανισμό έναρξης της αντιγραφής στην ιική θέση έναρξης της αντιγραφής (Howley PM & Lowy DR 2007) . Η E1 είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντι-HPV φαρμάκων, καθώς είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (Peter W. White et al.2005).

1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη , μεγέθους περίπου 360 αμινοξέων, εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την μεταγραφή και την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και η έκφρασή της λαμβάνει χώρα στα πρώιμα και τα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού (McBride, 2013). Δομικά αποτελείται από τρεις περιοχές:

- μια C-τελική περιοχή, υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό DNA και τον διμερισμό της E1 (DNA-binding/dimerization domain, DBD) (Howley PM & Lowy DR 2007).
- μια περιοχή- αρμό (hinge region), για το σχηματισμό ενός εύκαμπτου άξονα
- μια N-τελική περιοχή (transactivation domain, TAD) ,η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες του κυττάρου-ξενιστή (Brd4, Sp1,TFIIB,AMF1), εμπλέκεται δηλαδή στην ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων, και επιπλέον εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1 (Abbate EA. et al. 2006).

Η N-τελική και C-τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPV, ενώ η hinge περιοχή δείχνει μεγαλύτερη ετερογένεια (Francis et al 2000).



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E2 του BPV1, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Αυτά από τα αριστερά προς τα δεξιά είναι: το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης

όπου βρίσκεται η περιοχή TAD, η περιοχή-αρμός και η C-τελική περιοχή που λειτουργεί ως DBD και dimerization domain. (Howley PM & Lowy DR 2007).

Η E2 δρα στρατολογώντας κυτταρικούς παράγοντες στο ιικό γονιδίωμα, οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Προσδέεται ειδικά σε θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (ή ACCN₆GGT) και είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή, ανάλογα με την φύση των σχετιζόμενων κυτταρικών παραγόντων (Bernard et al., 1989, Stubenrauch et al., 1996). Ένας δεύτερος βασικός ρόλος της πρωτεΐνης E2 είναι η συμβολή της στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, ενισχύοντας την δράση της E1 πρωτεΐνης (Sanders and Stenlund, 2000). Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεσή της στις θέσεις πρόσδεσης του υποκινητή, στρατολογεί την E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιού. Αφού προσδεθεί η E1, η E2 μετατοπίζεται και έτσι η αντιγραφή ξεκινά. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την συμμετοχή της E2 στην κατανομή του επισωμικού γονιδιώματος του ιού στα θυγατρικά κύτταρα στην φάση της μίτωσης (McBride et al., 2008), καθώς και στη διαδικασία της συναρμολόγησης του ιικού γονιδιώματος στα ιοσωμάτια (Zhao et al., 2000).

1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Η E4 θεωρείται πρόιμη πρωτεΐνη, ωστόσο βρίσκεται αποκλειστικά στις διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλίου που έχουν μολυνθεί από τον ιό (Zur Hausen, 1996). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της πρωτεΐνης E4 βρίσκεται εντός του ORF της E2. Η πρωτεΐνη E4 μεταφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, του οποίου τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το γονίδιο E1. Η παραγόμενη πρωτεΐνη συνήθως αναφέρεται ως E1[^]E4 (Wang et al., 2011, Doorbar, 2013). Έχει προταθεί ότι η E4 επηρεάζει τον σκελετό των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Επίσης, πιθανολογείται ότι συμμετέχει στην αντιγραφή και την απελευθέρωση του ώριμου ιού, καθώς και στην καθήλωση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 (Doorbar, 2013).

1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη των HPVs είναι μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη μήκους 83 αμινοξέων και εκφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, το οποίο ξεκινά να μεταγράφεται ανοδικά του γονιδίου E2. Είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία συγκεντρώνονται σε μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, δίνοντας στην E5 τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών (DiMaio and Petti, 2013).

Προηγούμενες μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν πως υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης E5 του στελέχους HPV16 στο δέρμα, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων του επιθηλίου και οδηγούν σε αυτόματο σχηματισμό όγκων (Maufort JP. et al. 2007). Σε ποντίκια τα οποία λάμβαναν θεραπεία με οιστρογόνα, αποδείχτηκε πως η E5 μπορεί να προκαλεί καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, υποστηρίζοντας την ογκογόνο δράση του εν λόγω γονιδίου (Maufort JP. et al. 2010)

Όσον αφορά τη δομή της, η E5 αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο, η οποία διαπερνά την μεμβράνη τρεις φορές (Nath et al., 2006, Wetherill et al., 2012). Ολιγομερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα εξαμερές, σχηματίζοντας μια δομή «δαχτυλιδιού» (Yang et al., 2003, Wetherill et al., 2012).

Η απώλεια της E5 συμβάλλει στην αναστολή των όψιμων ικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores E.R et al 2000). Βασικός ρόλος της E5 είναι ότι εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al 2005). Ακόμη, η E5 έχει την ικανότητά να μειώνει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξααρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (CKIs) p21 και p27, προκαλώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, και διεγείροντας έτσι τη μεταγραφή των ικών ογκογονιδίων E6 και E7. Επίσης έχει αναφερθεί πως η E5 ρυθμίζει τη δραστηριότητα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR και εμπλέκεται έτσι στο MAPK μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του EGFR διεγείρει τη μεταγωγή ενδοκυττάρων σημάτων, τα οποία ελέγχουν λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος και η διαφοροποίηση. Ο EGFR ενεργοποιεί σημαντικά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια όπως: την Ras-Raf κινάση (MEK), την MAPK κινάση, την Akt-RT3k κινάση και την mTOR πρωτεΐνη. Το Ras-Raf-MEK-MAPK μονοπάτι ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως η μεταγραφή, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε G2/S φάση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Με λίγα λόγια η αλληλεπίδραση της E5 με τον EGFR επάγει την μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνει την ικανότητα διήθησής τους (Kivi et al., 2008, Barbaresi et al., 2010, DiMaio and Petti, 2013).

1.4.5 Η ική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη, μεγέθους 160 αμινοξέων περίπου, έχει δύο μοτίβα πρόσδεσης ψευδαργύρου, στο N-τελικό (το οποίο διμερίζεται) και στο C-τελικό της άκρο, τα οποία μοτίβα

με την βοήθεια μιας συνδετικής αλληλουχίας με δομή α-έλικας, που τα 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 αποφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης (Vande Pol and Klingelutz, 2013, Zanier et al., 2013). Η E6 είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την διάρκεια της HPV λοίμωξης (Kajitani, 2012). Οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου βρίσκονται στον πυρήνα κυρίως και στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αφού στερούνται τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (Tao M. et al. 2003).

Η πιο κατανοητή, αλλά και καλύτερα μελετημένη λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η ικανότητά της να προκαλεί την αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η οποία όπως είναι γνωστό ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, όπως βλάβη στο DNA το p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε το p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S.E et al 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι η E6 προσδένεται στην ουβικιτινική λιγάση E6AP μέσω της συντηρημένης αλληλουχίας LXXLL. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο E6/E6AP προσδένεται στην p53, η οποία άμεσα ουβικιτινιλιώνεται και οδηγείται στο 26S πρωτεάσωμα για την αποικοδόμησή της (Huibregtse et al., 1991, Scheffner et al., 1993, Zanier et al., 2012, Vande Pol and Klingelutz, 2013). Από τα παραπάνω προκύπτει πως αποικοδόμηση της p53 έχει ως αποτέλεσμα την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου και συνεπώς τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

1.4.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η ιική πρωτεΐνη E7 αποτελείται από περίπου 100 κατάλοιπα αμινοξέων και όπως και η E6 παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E6, επάγει την έναρξη της ογκογένεσης καθώς και την γενωμική αστάθεια (Roman and Munger, 2013). Περιέχει τρεις συντηρημένες περιοχές (conserved regions, CR), την N-τελική CR1 περιοχή, την CR2 και την C-τελική CR3 περιοχή (Εικόνα 1.15.). α) Η N-τελική περιοχή CR1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb, β) Η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb, γ) η C-τελική CR3 περιοχή περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (Munger et al., 2004, Hebner and Laimins, 2006, Boulet et al., 2007).



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E7, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Χωρίζεται σε τρεις περιοχές: α) η CR1 (γκρίζο ανοιχτό χρώμα) που περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, β) η CR2 (κόκκινο χρώμα) που περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία LXCXE και γ) η CR3 (μπλε χρώμα) που περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (Boulet et al., 2007).

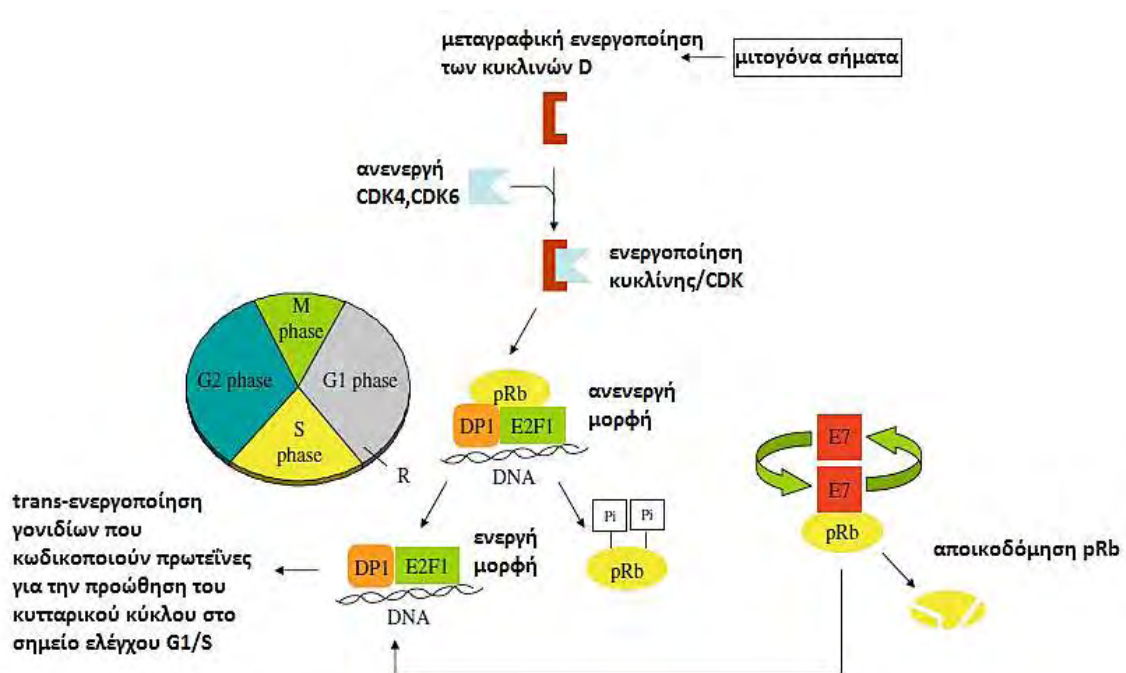
Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητα της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107) και να την καταστέλει. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), η οποία είναι πρωτεΐνη-υπόστρωμα φωσφορυλίωσης από σύμπλοκα των πρωτεϊνικών κινασών Cdk4, 6 και της κυκλίνης D στη φάση G1, ταυτοποιήθηκε αρχικά στο ρετινοβλάστωμα, σπάνιο κληρονομικό καρκίνο του οφθαλμού. Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στα φυσιολογικά κύτταρα, η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Μετά το περιοριστικό σημείο, κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S, η pRb φωσφορυλιώνεται όπως προαναφέρθηκε από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D, αποδεσμεύεται από τον E2F και ο E2F ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA.

Όσον αφορά την δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος. (Berezutskaya et al 1997, Wang et al 2001). Συνεπώς και με βάση τα παραπάνω, η πρόσδεση της E7 στην Rb έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τους αναστολείς των κυκλίνων-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27 έχοντας σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των γονιδίων των κυκλινών E και A της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην

διέγερση της ανάπτυξης των μολυσμένων κυττάρων και συνεισφέρει στην έναρξη της ογκογένεσης, αφού επάγεται φωσφορυλίωση της Rb και κατ'επέκταση πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Boulet et al., 2007, Wise-Draper and Wells, 2008, Funk J.O et al 1997).

Τέλος, η E7 αλληλεπιδρά με τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και βασική τους λειτουργία είναι να αφαιρούν ακετυλο-ομάδες από τις ουρές των H3 και H4 ιστονών και να ευνοούν μια πιο κλειστή χρωματινική δομή. Οι HDACs μπορούν επιπρόσθετα να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας την λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί ότι σύνδεση της E7 στην HDAC αναστέλλει την σύνδεση της Rb-HDAC με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η λειτουργία της. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση της E7 στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απορύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth M.S et al 2004, Brehm A et al 1999).

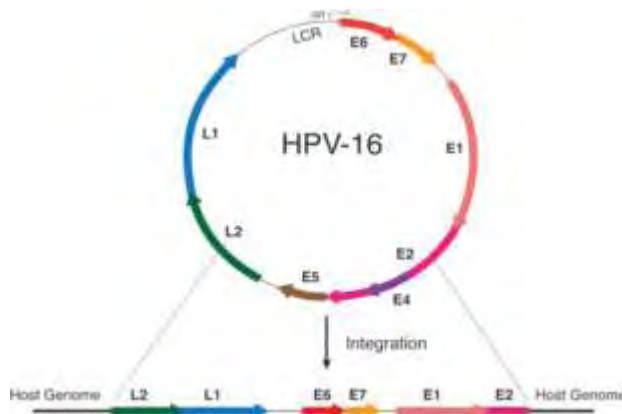


Εικόνα 1.7. Η πρωτεΐνη E7 απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο ελέγχου G1/S. Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με μέλη της οικογένειας DP και έτσι ρυθμίζει την μεταγραφή αρκετών γονιδίων, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο ηρεμίας, η pRb βρίσκεται σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή και συνδέεται με τα μόρια E2F,

αναστέλλοντας την λειτουργία τους. Η E7 μιμείται την φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς, τα κύτταρα εισέρχονται στην φάση S, απουσία μιτογόνων σημάτων (Ghittoni et al., 2010).

1.5 Η μορφή του γονιδιώματος των HPV

Το γονιδίωμα των HPVs συναντάται σε δύο μορφές, σε μορφή επισώματος, ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου-ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Υπό φυσιολογικές για τον ιό συνθήκες, αφού αυτός εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα του μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου διατηρεί την κυκλική του μορφή (επίσωμα) (Howley PM, Lowy DR 2007). Επίμονη λοίμωξη από υψηλού κινδύνου HPV μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση του ιικού επισώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή. Κατά την ενσωμάτωση συνήθως γίνεται ρήξη των γονιδίων E1 ή και E2, με αποτέλεσμα το κυκλικό γονιδίωμα του ιού να μετατρέπεται σε γραμμικό DNA, ενώ τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα (Schwarz et al., 1985, Wagatsuma et al., 1990, Xu et al., 2013). 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 ιικών ογκογονιδίων. Η υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 συμβάλλει καθοριστικά στη συσσώρευση γενετικών λαθών, η οποία οδηγεί στον κακοήγη φαινότυπο (Ham et al., 1991, Yu et al., 2005).



Εικόνα 1.8 Επάνω φαίνεται το επίσωμα του HPV16, ενώ ακριβώς από κάτω φαίνεται το γραμμικό πλέον ιικό DNA ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του ξενιστή (Sathish et al., 2014)

Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV στο DNA του κυττάρου-ξενιστή αποτελεί ένα καθοριστικό βήμα για την τραχηλική καρκινογένεση και η εμφάνισή της σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από CIN II/III σε διηθητικό καρκίνο (Durst et al., 1985, Klaes et al., 1999, Kalantari et al., 2001, Wentzensen et al., 2004, Pett and Coleman, 2007, Schmitz et al., 2012). Παρόλα αυτά, η ενσωμάτωση δεν είναι αναγκαία για την δημιουργία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκληθεί και από κύτταρα που περιέχουν τον ιό μόνο υπό την επισωματική του μορφή (Vinokurova et al., 2008). Όσον αφορά τον HPV-16, περίπου το 30% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φέρουν τον ιό υπό την επισωματική του μορφή (Matsukura et al., 1989, Pett and Coleman, 2007, Vinokurova et al., 2008, Doorbar et al., 2012), ενώ στο υπόλοιπο 70% των περιπτώσεων ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο DNA του

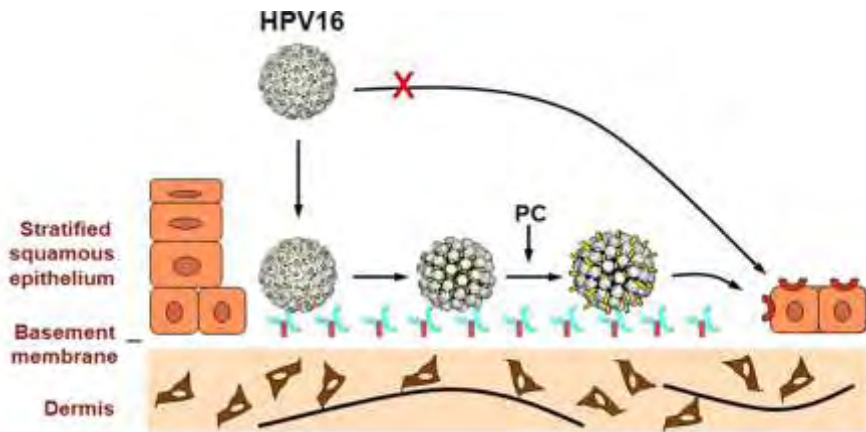
κυττάρου-ξενιστή (Cullen et al., 1991, Badaracco et al., 2002, Fehrmann and Laimins, 2003, Doorbar et al., 2012).

1.6 Κύκλος ζωής των HPVs

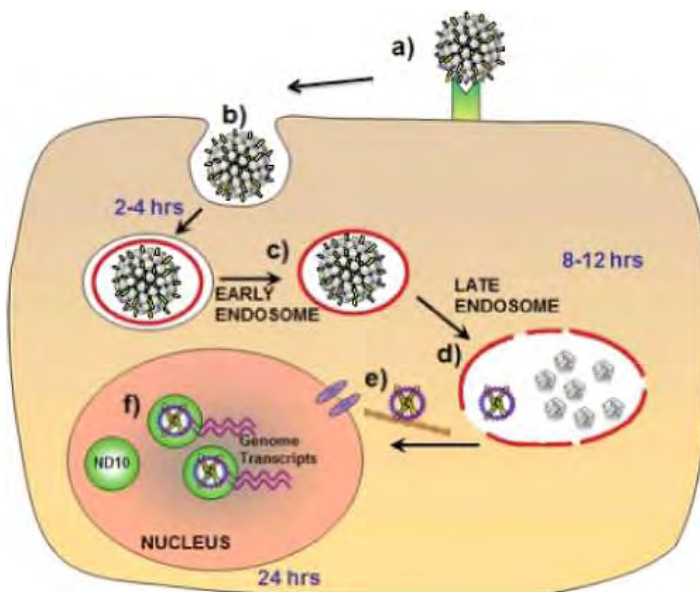
Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα. Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Ο κύκλος ζωής των ιών ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή. Η γονιδιακή έκφραση του ιού ρυθμίζεται αυστηρά, καθώς το μολυσμένο κύτταρο της βασικής στοιβάδας μεταναστεύει προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Στα κατώτερα στρώματα του επιθηλίου η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 οδηγεί τα κύτταρα στη φάση S, δημιουργώντας ένα περιβάλλον κατάλληλο για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ενίσχυση του ιικού DNA εξαρτάται από την παράλληλη έκφραση αρκετών ιικών πρωτεϊνών και εμποδίζεται μέχρι αυτές να φτάσουν σε κατάλληλα επίπεδα. Οι καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού εκφράζονται σε κύτταρα του ανώτερου επιθηλίου, τα οποία εκφράζουν επίσης την ιική πρωτεΐνη E4 (Doorbar 2005).

1.6.1. Είσοδος του ιού στα κύτταρα

Για να εισέλθει ο HPV στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, θα πρέπει το επιθήλιο να έχει τραυματιστεί και να έχει υποστεί λύση της συνέχειας του σε βάθος. Η είσοδος του ιού στα κύτταρα προϋποθέτει τη σύνδεσή του σε κυτταρικούς υποδοχείς. Τα μέλη των πρωτεογλυκανών της οικογένειας της θεικής ηπαρίνης (Heparin Sulfate Proteoglycan HSPG) λειτουργούν στην κυτταρική επιφάνεια ως υποδοχείς. 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 (Richards et al., 2006, Schiller et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του ιοσωματίου στον κυτταρικό υποδοχέα οι μορφολογικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο καψίδιο του, φέρνουν στην επιφάνεια ένα μέρος της πρωτεΐνης L2. Τότε, ένα τμήμα του N-τελικού άκρου της L2 καψιδιακής πρωτεΐνης κόβεται από φουρίνη, γεγονός που επάγει τη σύνδεση του καψιδίου στον δεύτερο υποδοχέα. Τελικά, τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Στους περισσότερους HPV, όπως και στον HPV16, η ενδοκύτωση πραγματοποιείται με κυστίδια κλαθρίνης. Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το καψίδιο αποσυναρμολογείται στα ενδοσώματα ή/και λυσοσώματα και απελευθερώνεται ένα σύμπλοκο καψιδιακής πρωτεΐνης L2 και ιικού DNA. Το σύμπλοκο L2- DNA μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου και το DNA εισέρχεται σε αυτόν κατά πάσα πιθανότητα κατά τη μίτωση των κυττάρων (Schiller et al., 2010).



Εικόνα 1.9 Μοντέλο των γεγονότων που οδηγούν σε in vivo μόλυνση. Τα καψίδια δένονται στη HSPG, υφίστανται αλλαγές που οδηγούν στην επεξεργασία της L2, ένα μέρος της οποίας κόβεται και έτσι συνδέεται ο ιός και στον δεύτερο υποδοχέα (Kines et al., 2009)



Εικόνα 1.10 a) Ο ιός συνδέεται σε κυτταρικούς υποδοχείς και b) εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύττωση. c) Το ιοσωμάτιο εισέρχεται στα ενδοσώματα, όπου d) διαλύεται το καψίδιο. e) Η πρωτεΐνη L2 μαζί με το ιικό DNA ξεφεύγει από το ενδόσωμα και μεταφέρει το DNA στον πυρήνα. f) Μετά την είσοδο του ιικού DNA στον πυρήνα ξεκινάει η μεταγραφή του (Howley PM, Lowy DR 2007).

1.6.2 Αντιγραφή του ιού

Οι HPV ιοί έχουν τρεις τύπους αντιγραφής του ιικού DNA που αντιστοιχούν στη διαδικασία εγκατάστασης του ιού, διατήρησης του και δημιουργίας απογόνων ικανών για περαιτέρω μόλυνση. Κατά τον πρώτο τύπο, το ιικό γονιδίωμα εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και ενισχύεται σε περίπου 200 αντίγραφα ανά κύτταρο (Pyeon et al., 2009). Το ιικό γονιδίωμα παραμένει εντός του πυρήνα των κυττάρων σε επισωμική μορφή, γεγονός που είναι σημαντικό για την εγκατάσταση του ιού (McBride, 2008). Απαραίτητες για την αντιγραφή αυτή είναι όπως προαναφέρθηκε οι δύο πρώιμες πρωτεΐνες του HPV, η E1 που αποτελεί την κύρια

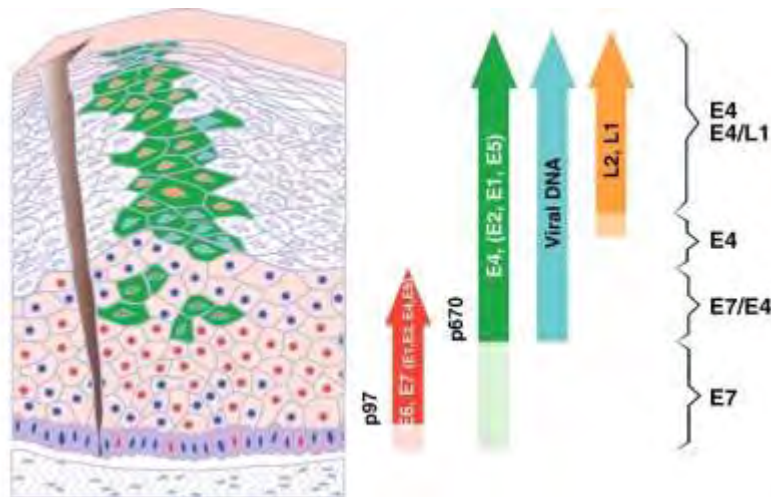
πρωτεΐνη αντιγραφής των HPV και η E2. Επιπλέον η E1 και η E2 πιθανόν να χρησιμεύουν και στην διατήρηση του ιικού γονιδιώματος στην επισωματική μορφή, εφόσον ο αριθμός των αντιγράφων σταθεροποιηθεί (Egawa et al., 2012). Η επόμενη φάση αντιγραφής του ιικού DNA, που αφορά τη διατήρηση του, συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας, στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στην φάση αυτή, το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται παράλληλα με το DNA του κυττάρου-ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα (ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο), οδηγώντας στη σταθεροποίηση του ιικού DNA (McBride, 2008, Pyeon et al., 2009). Η τελευταία φάση αντιγραφής στον κύκλο ζωής του HPV πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Στα κύτταρα αυτά, τα οποία πλέον δεν συνθέτουν κυτταρικό DNA, παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια (McBride, 2008).

1.6.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως έχει αναφερθεί, ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Οι HPVs έχουν δύο κύριους υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους, τον πρώιμο και το όψιμο υποκινητή. Στον HPV16 οι δύο αυτοί υποκινητές είναι ο p97 και ο p670 αντίστοιχα. Οι υποκινητές αυτοί ελέγχονται αυστηρά από τη ρυθμιστική περιοχή LCR, καθώς εκεί εντοπίζεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι λειτουργικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 και E7). Ο πρώιμος υποκινητής p97 βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των έξι παραπάνω πρώιμων γονιδίων του ιού στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα.

Από την άλλη, ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής p670, είναι τοποθετημένος εντός του ORF της E7, ενεργοποιείται ειδικά στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου και συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων E1 και E2, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων, ενισχύοντας έτσι το γονιδίωμα του ιού (Grassmann et al., 1996). 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 (Doorbar et al., 2012, Zheng et al., 2006).



Εικόνα 11 Οργάνωση του κύκλου ζωής κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από HPV16. Αριστερά φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση του δέρματος όπου φαίνεται το μοτίβο γονιδιακής έκφρασης του HPV καθώς το μολυσμένο κύτταρο μεταναστεύει προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Αμέσως μετά τη μόλυνση της βασικής μεμβράνης ο υποκινητής p97 κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7, που είναι απαραίτητα για την είσοδο του κυττάρου στη φάση S (κόκκινο). Σε ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες ρυθμίζεται θετικά ο υποκινητής p670 και οι ικές πρωτεΐνες αντιγραφής (E1, E2, E4, E5) εκφράζονται σε αφθονία (πράσινο), διευκολύνοντας την ενίσχυση των ικών γονιδιωμάτων (μπλε). Στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου όπου πλέον παράγονται οι ικές καψιδιακές πρωτεΐνες (κίτρινο) (Doorbar 2005).

1.6.4 Συναρμολόγηση του ικού καψιδίου και απελευθέρωση

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι η συναρμολόγηση των αντιγράφων του ιικού γενώματος σε ιικά καψίδια και η απελευθέρωση των τελευταίων. Αρχικά παράγεται η πρωτεΐνη L2, η οποία μετά την έκφρασή της εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ έπειτα παράγεται η πρωτεΐνη L1, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου σχηματίζει τα L1 πενταμερή, τα οποία αποτελούν τη βασική δομική μονάδα των HPV καψιδίων. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 συμβάλλει στην τοποθέτηση του ικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων (Buck et al., 2004).

Η ωρίμανση του ιού συμβαίνει στα κερατινοκύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας. Εν τέλει, ο ιός απελευθερώνεται από το κύτταρο χωρίς να προκαλέσει τη λύση τους, με τη βοήθεια της E4 πρωτεΐνης, η οποία είναι ικανή να διαρρήξει το δίκτυο κερατίνης που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια.

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 (Juckett G. et al.2010). 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 (Doorbar et al., 2012).

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) (Solomon et al., 2002).

1.8 Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p16 και συσχέτιση των πολυμορφισμών του με ενδοτραχηλικές αλλοιώσεις

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι παγκοσμίως ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, και προκαλείται ως γνωστόν από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Παρόλο που η αιτιολογία του δεν είναι γνωστή ακόμα, έχουν ταυτοποιηθεί πολλές μεταλλάξεις, που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των φυσιολογικών πρωτοογκογονιδίων σε μεταλλαγμένα ογκογονίδια και στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Το p16 (επίσης γνωστό ως CDKN2/MTS-1/INK4a) είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9p21 και αποτελείται από τρία εξόνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 156 αμινοξέων. Φυσιολογικά, το σημείο περιορισμού της φάσης

G1 του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες Cdk4, Cdk6 με κυκλίνες τύπου D. Η κυκλίνη D1 σχηματίζει σύμπλοκα με τις Cdk4, Cdk6 στη φάση G1, που προωθούν την διέλευση από το σημείο περιορισμού στη φάση S. Το σύμπλοκο κυκλίνη D / Cdk4, Cdk6 συνδέεται στη φάση G1 με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά στο ρετινοβλάστωμα, σπάνιο κληρονομικό καρκίνο του οφθαλμού, και τη φωσφορυλιώνει. Η πρωτεΐνη Rb ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, καθώς προσδένεται στον E2F και καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων ρυθμιζόμενων από αυτόν. Η φωσφορυλίωση της pRb επιτρέπει στον παράγοντα E2F να αποσυνδεθεί από αυτήν και να γίνει ενεργός.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p16 προσδένεται στις Cdk4 και Cdk6 και αναστέλλει την αλληλεπίδρασή τους με την κυκλίνη D1. Η αναστολή της εργότητας του συμπλόκου κυκλίνη D1 -CDK4/6 αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος και την απελευθέρωση του E2F και αυτό οδηγεί στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S. Η αδρανοποίηση του p16 συνεπώς έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πιστεύεται ότι συμβάλλει στην κακοήθεια (L. Yan et al. 2007). Στον καρκίνο των ωοθηκών, η διαγραφή του p16 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 50% στις κυτταρικές σειρές, και η απώλεια της έκφρασης του p16 ανιχνεύθηκε στο 11-37% των καρκίνων που μελετήθηκαν (Marchini et al. 1997). Ακόμα, οι πολυμορφισμοί του p16 στην κωδική περιοχή και στην 3'αμετάφραστη περιοχή συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη συγκεκριμένων τύπων καρκίνου σε προηγούμενες μελέτες (Debniak et al. 2005, McCloud et al. 2004).

Ο L. Yan και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη συχνότητα δύο πολυμορφισμών στο εξώνιο 3 του γονιδίου p16 (540C→G και 580C→T) και κατέληξαν στο ότι ο ένας εκ των δύο πολυμορφισμών (580C→T) πιθανώς σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

1.9 Σκοπός

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης των δύο προαναφερθέντων πολυμορφισμών (540C→G και 580C→T) του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες για HPV-16 θετικών κλινικών δειγμάτων.

Κεφάλαιο 2^ο

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κλινικά Δείγματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας, προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας», το εργαστήριο Κυτταροπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας από από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ» και από ιδιωτικό ιστοπαθολογικό εργαστήριο.

Συνολικά εξετάστηκαν 110 δείγματα. Από την κυτταροπαθολογική ανάλυση προέκυψε πως από αυτά τα 13 ήταν αρνητικά για HPV-16 (WNL) (Πίνακας 2.1), τα 44 διαγνώστηκαν ως χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) (Πίνακας 2.2), τα 43 ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) (Πίνακας 2.3), και τα υπόλοιπα 10 ως περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Πίνακας 2.4).

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC16	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC17	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC18	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC19	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC20	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»

LBC1	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC2	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC3	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC4	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC7	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC10	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC14	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC15	WNL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»

Πίνακας 2.1 Κλινικά δείγματα αρνητικά για HPV-16

Κωδική Ονομασία	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC41	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC26	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC31	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC39	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC36	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC38	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC22	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC28	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC29	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC30	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
LBC32	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών»
ΑΣ 3500	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3515	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3570	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο

			Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3571	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3603	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3677	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3841	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3611	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3807	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3670	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
747	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
868	LSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
Δ34	LSIL	Thinprep	Ιδιωτικό Εργαστήριο
ATT 1	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT2	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 6	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT8	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 10	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 12	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 13	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 14	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 15	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 22	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 26	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 45	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 46	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 51	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»

ATT 67	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 90	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 98	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ATT 105	LSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»

Πίνακας 2.2 Κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC45	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC51	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC60	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC52	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC53	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC55	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC54	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC57	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC44	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC46	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC47	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC56	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC43	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC50	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
LBC42	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ΑΣ 3674	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»

ΑΣ 3676	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3592	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3539	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3578	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3591	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3623	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΣ 3629	HSIL	Thinprep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
Δ2	HSIL	Thinprep	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ3	HSIL	Thinprep	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ15	HSIL	Thinprep	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ16	HSIL	Thinprep	Ιδιωτικό Εργαστήριο
ΠΝΑ 1	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 4	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 5	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 6	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 9	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 10	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 11	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 12	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 13	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 14	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 15	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΑΤΤ 4	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ΑΤΤ 5	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ΑΤΤ9	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
ΑΤΤ 16	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»

ATT20	HSIL	Thinprep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών»
-------	------	----------	--

Πίνακας 2.3 Κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Δ59	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ60	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ61	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ62	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ63	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ64	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ65	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
Δ66	CANCER	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
ΠΝΑ 7	Ca in situ	Ιστός σε παραφίνη	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΑ 16	τραχήλου διηθητικό	Ιστός σε παραφίνη	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.4 Κλινικά δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας

2.2. Εκχύλιση DNA

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, ανάλογα με το είδος του δείγματος (ThinPrep ή βιοψία τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη).

2.2.1. Εκχύλιση DNA (ThinPrep)

Για την απομόνωση των κλινικών δειγμάτων από ThinPrep χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Συγκεκριμένα, σε πλαστικό σωλήνα των 2ml αναμείχθηκαν 10μl γλυκογόνου (100mg/ml), 100μl από κάθε δείγμα και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απελευθερωθεί το ιικό DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20 °C),

ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20 °C. Ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA). Το απομονωμένο DNA των δειγμάτων αποθηκεύτηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Διαλύματα: Διάλυμα Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

2.2.2. Εκχύλιση DNA (Τραχηλικός ιστός μονιμοποιημένος σε παραφίνη)

Με τη χρήση νυστεριού απομακρύνθηκαν τομές τραχηλικού ιστού, διαμέτρου 5-10 μm, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με 400μl ξυλόλης και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400μl αιθανόλης (100%). Ύστερα, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995) που περιγράφηκε παραπάνω. **Διαλύματα:** Διάλυμα Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

2.3 Ταυτοποίηση δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα ακολούθησε μία Multiplex-PCR όπως περιγράφεται από τους Tsakogiannis et al. (2014). Η PCR αυτή επιτρέπει την γρήγορη ταυτοποίηση των τύπων HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 και 66. Για την εκτέλεση της έχουν σχεδιαστεί τρία διαφορετικά μείγματα εκκινητών, καθένα από τα οποία ανιχνεύει τρεις από τους παραπάνω τύπους HPV. Πιο αναλυτικά, το PrimerMix I περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 16, 45, και 66. Αντίστοιχα, το PrimerMix II περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 18, 33, και 35 και το PrimerMix III για τους 35, 31 και 51 (Πίνακας 2.5). Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν σε μια περιοχή του γονιδίου L1 του ιού. Καθώς το γονίδιο αυτό είναι καλά συντηρημένο μεταξύ των HPV οι εκκινητές για τους στενά συγγενικούς ιούς σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να υπάρχουν τουλάχιστον δύο mismatch στις τελευταίες 5 βάσεις του 3' άκρου τους. Κάθε PrimerMix περιέχει επιπλέον ένα ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο της β-ακτίνης, που λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο το PrimerMix I καθώς θέλαμε απλά να επιβεβαιώσουμε την παρουσία του HPV16. Επίσης, με την παρουσία των

εκκινητών β-ακτίνης ελέγχθηκε παράλληλα η ορθότητα και η ποιότητα της απομόνωσης του DNA καθώς και η ύπαρξη αναστολέων της PCR. Επίσης, παράλληλα με τα κλινικά δείγματα εξετάστηκαν κύτταρα των καρκινικών κυτταρικών σειρών CaSki και SiHa ως θετικοί μάρτυρες για τον HPV16.

HPV Identification Mix I			
	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν PCR
β-ακτίνη	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	498 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	
HPV 16	HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291 bp
	HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV45	HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233 bp
	HPV45 L1R	CCACGACCAATTTCCATACC	
HPV66	HPV66 L1F	CGCCGTA AACGTATTCCCTA	168 bp
	HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Πίνακας 2.5 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην MultiplexPCR

Το PrimerMix I περιείχε 25pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών και 10pmol 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 MgCl₂, 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 2 min
- 40 κύκλοι:
 - 95°C για 30s
 - 58°C για 50s και
 - 72°C για 10s
- Τελική ενίσχυση στους 72°C για 1 min

Η ταυτοποίηση των HPV και η ανίχνευση της β-ακτίνης έγινε με βάση το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

2.4 Ενίσχυση του γονιδίου p16 με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί επανάσταση στην βιοϊτεχνολογία με μεγάλο φάσμα εφαρμογών. Τον Οκτώβριο του 1993 απενεμήθη το βραβείο Νόμπελ Χημείας στον Δρ Κ. Mullis, για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, "in vitro". Μέσα σε λίγες ώρες, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Στην παρούσα εργασία, η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των δύο κάτωθι συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
P16F	GATGTGCCACACATCTTTGACCT
P16R	CTACGAAAGCGG GGTGGGTTGT

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές ή "primers") στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσος επεκτείνεται (3ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσος ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl. Κάθε PCR tube περιείχε:

- 3μl DNA από το υπό εξέταση δείγμα
- 0,25 μl του εκκινητή P16R , συγκέντρωσης 50pmol/μl και 0,25 μl του εκκινητή P16F , συγκέντρωσης 50pmol/μl.
- 5 μl dNTPs συγκέντρωσης 10mM
- 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος KAPA Taq Buffer 10x
- 0,1μl KAPA Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)
- 1μl MgCl₂ (25mM)
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μl.

Η διαδικασία έλαβε χώρα υπό τις κάτωθι συνθήκες:

i. Αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95°C για 2 min

ii. 40 κύκλοι αποδιάταξης - υβριδοποίησης - επιμήκυνσης του DNA στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Στάδιο Αντίδρασης	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη Κλώνων	95°C	45sec
Υβριδοποίηση Κλώνων DNA	62°C	45sec
Επιμήκυνση Κλώνων DNA	72°C	30sec

iii. Επώαση των κλώνων του ενισχυμένου τμήματος στους 72°C για 5 min.

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 3 μl H₂O (αντί των 3 μl δείγματος DNA) .

2.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από την αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 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» 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 αгарόζης 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).

2.6 RFLP – Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR (Restriction fragments Length Polymorphism)

Ως γνωστών, τα ένζυμα περιορισμού, γνωστά και ως «ψαλίδια» της μοριακής βιολογίας, αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες MspI και HaeIII. Το ένζυμο MspI αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.1, ενώ το ένζυμο HaeIII αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.1 . Αλληλουχία που αναγνωρίζει και τέμνει το ένζυμο MspI



Εικόνα 2.2. Αλληλουχία που αναγνωρίζει και τέμνει το ένζυμο HaeIII

Η κάθε αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Κάθε tube περιείχε :

- 1μl ενζύμου περιορισμού MspI (5U/μl)
- 5 μl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος 10X NEBuffer(CutSmart)
- 8-10 μl από κάθε ειδικό προϊόν της PCR
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50μl

Ομοίως πραγματοποιήθηκε και η κάθε αντίδραση πέψης με το ένζυμο HaeIII σε τελικό όγκο 50μl και κάθε tube περιείχε :

- 1μl ενζύμου περιορισμού HaeIII (5U/μl)
- 5 μl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος 10X NEBuffer
- 8-10 μl από κάθε ειδικό προϊόν της PCR
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50μl

Εν συνεχεία, τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °c για μια ώρα, ώστε να δράσουν τα ένζυμα περιορισμού και κατόπιν προστέθηκε στο κάθε ένα 5 μl loading buffer ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης

Τα αποτελέσματα της πέψης και το μέγεθος των δειγμάτων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα (gel) αγαρόζης συγκέντρωσης 3% 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 αναμιχθήκαν 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 αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.8 Καθορισμός γενοτύπου

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί 540C→G και 580C→T στο εξόνιο 3 του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 με τις τεχνικές PCR-RFLP. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 540C→G, τα αλλήλια C/C παρουσιάζονταν με 2 μπάντες DNA μεγέθους 104 bp και 77 bp αντίστοιχα, τα αλλήλια G/G παρουσιάζονταν με μια μπάντα μεγέθους 181 bp, ενώ οι ετεροζυγώτες (C/G) με 3 μπάντες μεγέθους 181 bp, 104 bp και 77 bp αντίστοιχα. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 580C→T, τα αλλήλια C/C παρουσιάζονταν με 2 μπάντες DNA μεγέθους 142 bp και 39 bp, τα αλλήλια T/T παρουσιάζονταν με μια μπάντα μεγέθους 181 bp, ενώ οι ετεροζυγώτες παρουσιάζονταν με 3 μπάντες μεγέθους 181 bp, 142 bp και 39 bp αντίστοιχα.

2.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο χ^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

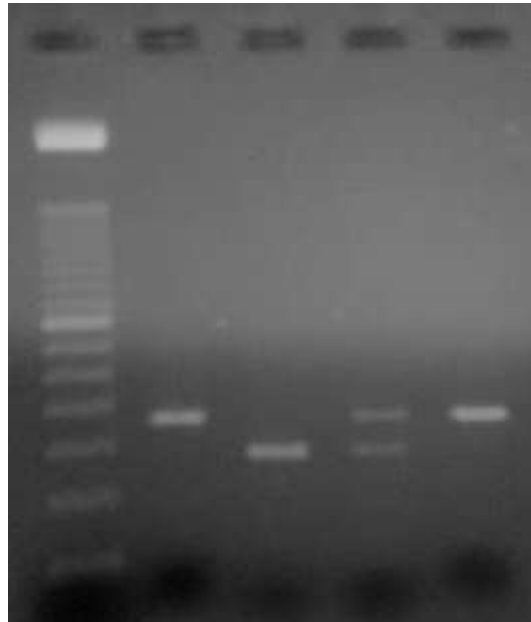
κριτηρίου P θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική σε τιμές μικρότερες του 0.05. Η τιμή κριτηρίου P καθορίζει το παρατηρούμενο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας που υπολογίστηκε με τη μέθοδο χ^2

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). Ως λόγος σχετικών πιθανοτήτων ορίζεται η σχετική πιθανότητα έκθεσης σε Ασθενείς προς σχετική πιθανότητα έκθεσης σε Μάρτυρες. Όσον αφορά την εν λόγω Μεταπτυχιακή εργασία ο λόγος OR αναφέρεται στην πιθανότητα να αναπτύξει ο ασθενής τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία όταν φέρει συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντός της p16 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.

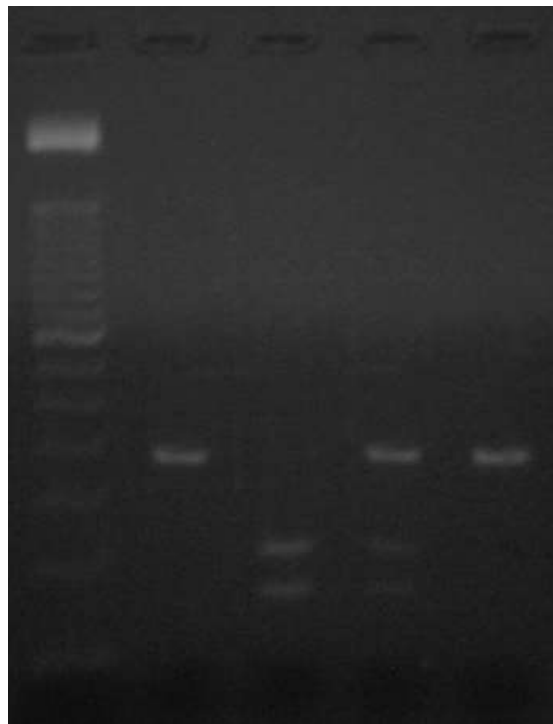
Κεφάλαιο 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη των πολυμορφισμών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16



Εικόνα 3.1 .Γενότυποι του πολυμορφισμού C580T όπως προέκυψαν από την ανάλυση PCR-RFLP και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Από δεξιά προς αριστερά βλέπουμε : Πρώτη στήλη = ladder 50 bp. Δεύτερη στήλη= προϊόν PCR. Τρίτη στήλη=C/C(η κάτω μπάντα μεγέθους 39 bp δεν φαίνεται) Τέταρτη στήλη =C/T. Πέμπτη στήλη = T/T



Εικόνα 3.2. Γενότυποι του πολυμορφισμού C540G όπως προέκυψαν από την ανάλυση PCR-RFLP και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Από δεξιά προς αριστερά βλέπουμε : Πρώτη στήλη = ladder 50 bp. Δεύτερη στήλη= προϊόν PCR. Τρίτη στήλη=C/C. Τέταρτη στήλη =C/G. Πέμπτη στήλη = G/G

Στους κάτωθι πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων πολυμορφισμών ,βάσει της κατηγοριοποίησης των κλινικών δειγμάτων όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1 .

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Πολυμορφισμός C540G	Πολυμορφισμός C580T
LBC16	WNL	C/C	C/C
LBC17	WNL	C/C	C/C
LBC18	WNL	C/C	C/C
LBC19	WNL	C/C	C/C
LBC20	WNL	C/C	C/C
LBC1	WNL	C/C	C/C
LBC2	WNL	C/C	C/C
LBC3	WNL	C/C	C/C
LBC4	WNL	C/G	C/C
LBC7	WNL	C/C	C/T
LBC10	WNL	C/C	C/C
LBC14	WNL	C/C	C/T
LBC15	WNL	C/C	C/C

Πίνακας 3.1 Πολυμορφισμοί κλινικών δειγμάτων αρνητικών για HPV-16

Κωδική Ονομασία	Κλινική εικόνα	Πολυμορφισμός C540G	Πολυμορφισμός C580T
LBC41	LSIL	C/C	C/C
LBC26	LSIL	C/C	C/C
LBC31	LSIL	C/G	C/C
LBC39	LSIL	C/C	C/C
LBC36	LSIL	C/G	C/T
LBC38	LSIL	C/C	C/C
LBC22	LSIL	C/C	C/C
LBC28	LSIL	C/G	C/T
LBC29	LSIL	C/C	C/C
LBC30	LSIL	C/C	C/C

LBC32	LSIL	C/C	C/C
AΣ 3500	LSIL	C/C	C/C
AΣ 3515	LSIL	C/C	C/T
AΣ 3570	LSIL	C/G	C/C
AΣ 3571	LSIL	C/G	C/C
AΣ 3603	LSIL	C/G	C/C
AΣ 3677	LSIL	C/G	C/C
AΣ 3841	LSIL	C/C	C/C
AΣ 3611	LSIL	C/C	C/C
AΣ 3807	LSIL	C/C	C/C
AΣ 3670	LSIL	C/C	C/C
747	LSIL	C/G	C/C
868	LSIL	C/C	C/C
Δ34	LSIL	C/G	C/C
ATT 1	LSIL	C/C	C/C
ATT2	LSIL	C/G	C/C
ATT 6	LSIL	C/C	C/T
ATT8	LSIL	C/C	C/C
ATT 10	LSIL	C/C	C/C
ATT 12	LSIL	C/C	C/C
ATT 13	LSIL	C/C	C/C
ATT 14	LSIL	C/C	C/C
ATT 15	LSIL	C/C	C/T
ATT 22	LSIL	C/C	C/T
ATT 26	LSIL	C/G	C/T
ATT 45	LSIL	C/G	C/C
ATT 46	LSIL	C/C	C/C
ATT 51	LSIL	C/C	C/T
ATT 67	LSIL	C/C	C/C
ATT 90	LSIL	C/C	C/T
ATT 98	LSIL	C/C	C/C
ATT 105	LSIL	C/G	C/C

Πίνακας 3.2 Πολυμορφισμοί κλινικών δειγμάτων χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Πολυμορφισμός C540G	Πολυμορφισμός C580T
LBC45	HSIL	C/C	C/C
LBC51	HSIL	C/G	C/C
LBC60	HSIL	C/C	C/C
LBC52	HSIL	C/G	C/C
LBC53	HSIL	C/G	C/C
LBC55	HSIL	C/G	C/C
LBC54	HSIL	C/G	C/T
LBC57	HSIL	C/C	C/C
LBC44	HSIL	C/C	C/C
LBC46	HSIL	C/C	C/T
LBC47	HSIL	C/C	C/T
LBC56	HSIL	G/G	C/C
LBC43	HSIL	C/C	C/C
LBC50	HSIL	C/C	C/C
LBC42	HSIL	C/C	C/T
AΣ 3674	HSIL	C/C	C/T
AΣ 3676	HSIL	C/C	C/C
AΣ 3592	HSIL	C/G	C/C
AΣ 3539	HSIL	C/C	C/T
AΣ 3578	HSIL	C/G	C/C
AΣ 3591	HSIL	C/C	C/C
AΣ 3623	HSIL	C/C	T/T
AΣ 3629	HSIL	C/C	C/T
Δ2	HSIL	C/C	C/T
Δ3	HSIL	C/C	C/C
Δ15	HSIL	C/C	C/C
Δ16	HSIL	C/C	C/C
ΠINA 1	HSIL	C/G	C/T
ΠINA 4	HSIL	C/C	C/C
ΠINA 5	HSIL	C/G	C/T
ΠINA 6	HSIL	C/C	C/C
ΠINA 9	HSIL	G/G	C/C
ΠINA 10	HSIL	C/G	C/C
ΠINA 11	HSIL	C/C	C/C
ΠINA 12	HSIL	C/G	C/C
ΠINA 13	HSIL	C/G	C/C
ΠINA 14	HSIL	C/G	C/C
ΠINA 15	HSIL	C/C	C/C

ATT 4	HSIL	C/G	C/C
ATT 5	HSIL	C/G	C/C
ATT9	HSIL	C/C	C/T
ATT 16	HSIL	C/G	C/T
ATT20	HSIL	C/C	C/C
ATT80	HSIL	G/G	C/C

Πίνακας 3.3 Πολυμορφισμοί κλινικών δειγμάτων υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)

Κωδική ονομασία	Κλινική εικόνα	Πολυμορφισμός C540G	Πολυμορφισμός C580T
Δ59	CANCER	C/G	C/C
Δ60	CANCER	C/C	C/C
Δ61	CANCER	C/G	C/C
Δ62	CANCER	C/C	C/C
Δ63	CANCER	C/G	C/C
Δ64	CANCER	C/C	C/C
Δ65	CANCER	C/C	C/C
Δ66	CANCER	C/C	C/T
ΠΙΝΑ 7	Ca in situ	C/C	C/C
ΠΙΝΑ 16	τραχήλου διηθητικό	C/C	C/C

Πίνακας 3.4 Πολυμορφισμοί κλινικών δειγμάτων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας

3.2 Συσχέτιση των πολυμορφισμών C540G και C580T με τη σοβαρότητα τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα

540C→G Dominant model

Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CG/GG [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Low grade	42	29 (69)	13 (31)		
High grade	44	25 (56.8)	19 (43.2)	0.58 (0.24-1.42)	0.34
Cervical Cancer	10	7 (70)	3 (30)	1.04(0.23 -4.6)	0.95

C580T

Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CT/TT [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Low grade	42	33 (78.6)	9 (21.4)		
High grade	44	31 (70.4)	13 (29.6)	0.65 (0.24-1.7)	0.53
Cervical Cancer	10	9 (90)	1 (10)	2.4 (0.27-22.01)	0.7

Πίνακας 3.5 Στον πίνακα αυτό φαίνονται πάνω, για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση μεταξύ του επικρατούς γενοτύπου CC σε σχέση με τους άλλους δύο γενοτύπους (CG+GG) μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης η συχνότητα του γενοτύπου CC δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τη συχνότητα των υπόλοιπων δύο γενοτύπων μεταξύ LG και HG δειγμάτων, αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων καθώς και στις δύο περιπτώσεις P value > 0.05. Κάτω, φαίνονται για τον πολυμορφισμό 580C→T, η συσχέτιση μεταξύ του επικρατούς γενοτύπου CC σε σχέση με τους άλλους δύο γενοτύπους (CT+TT) μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης η συχνότητα του γενοτύπου CC δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τη συχνότητα των υπόλοιπων δύο γενοτύπων μεταξύ LG και HG δειγμάτων, αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων καθώς και στις δύο περιπτώσεις P value 0. >05.

540C→G

Recessive model

Cervical lesion	Samples (n)	GG [n (%)]	CC/CG [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Low grade	42	0 (0)	42 (100)		
High grade	44	3 (6.8)	41 (93.2)	7.16 (0.35-143.1)	0.25
Cervical Cancer	10	0 (30)	10 (100)		ne

580C→T

Cervical lesion	Samples (n)	TT [n (%)]	CC/CT [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Low grade	42	0 (21.4)	42(78.6)		
High grade	44	1 (29.6)	43 (70.4)	2.9(0.11-73.9)	0.3
Cervical Cancer	10	0 (10)	10 (90)		Ne

Πίνακας 3.6 Στον πίνακα αυτό φαίνονται πάνω, για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση μεταξύ του γενοτύπου GG σε σχέση με τους άλλους δύο γενοτύπους (CC+CG) μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης η συχνότητα του γενοτύπου GG δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τη συχνότητα των άλλων δύο γενοτύπων, μεταξύ LG και HG δειγμάτων, αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων καθώς και στις δύο περιπτώσεις P value >0.05. Κάτω, φαίνονται για τον πολυμορφισμό 580C→T, η συσχέτιση μεταξύ του γενοτύπου TT σε σχέση με τους άλλους δύο γενοτύπους (CC+CT) μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης η διαφορά της συχνότητας του γενοτύπου TT και των άλλων δύο γενοτύπων δεν είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ σε LG και HG δειγμάτων, αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων καθώς και στις δύο περιπτώσεις P value > 0.05.

Codominant model

C540G					CC	CG	GG
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CG [n (%)]	GG [n (%)]	P-value		OR
Low grade	42	29	13	0	1		
High grade	44	25	16	3	1	0.58	0.23
Cervical Cancer	10	7	3	0	1	0.9	Ne
C580T					CC	CT	TT
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CT [n (%)]	TT [n (%)]	P-value		OR
Low grade	42	33	9	0	1		
High grade	44	31	12	1	1	0.65	0.9
Cervical Cancer	10	9	1	0	1	0.7	Ne

Πίνακας 3.7 Στον πίνακα αυτό φαίνεται πάνω για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση των τριών γονοτύπων μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των τριών γονοτύπων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ LG και HG δειγμάτων αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων. Κάτω, φαίνονται για τον πολυμορφισμό 580C→T, η συσχέτιση των τριών γονοτύπων μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των τριών γονοτύπων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ LG και HG δειγμάτων αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων.

Allelic Association

C540G					
Cervical lesion	Samples (n)	C [n (%)]	G [n (%)]	OR C vs G Allele (95% CI)	P-value
Low grade	42	71 (84.5)	13 (15.5)		
High grade	44	66 (75)	22 (25)	0.54(0.25 -1.17)	0.17
Cervical Cancer	10	17 (85)	3 (15)	1.03(0.26- 4.05)	0.95
C580T					
Cervical lesion	Samples (n)	C [n (%)]	T [n (%)]	OR C vs T Allele (95% CI)	P-value
Low grade	42	75 (89.3)	9 (10.7)		
High grade	44	64 (72.7)	2 (27.3)	0.22 (0.04 -1.06)	0.13
Cervical Cancer	10	19 (95)	1 (5)		0.72

Πίνακας 3.8 Στον πίνακα αυτό φαίνεται πάνω για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση των δύο αλληλομόρφων μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των δύο αλληλομόρφων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ LG και HG δειγμάτων αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων. Κάτω, φαίνονται για τον πολυμορφισμό 580C→T, η συσχέτιση των δύο αλληλομόρφων μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης και μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των δύο αλληλομόρφων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ LG και HG δειγμάτων αλλά και μεταξύ LG και καρκινικών δειγμάτων.

3.3 Συσχέτιση των πολυμορφισμών C540G και C580T με την ανάπτυξη τραχηλικής δυσπλασίας σε γυναίκες θετικές για τον HPV-16 στην Ελλάδα

Dominant model

C540G					
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CG/GG [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Control	13	12 (92.3)	1 (7.7)		
Low grade	42	29 (69)	13 (31)	0.18 (0.02-1.58)	0.18
High grade	44	25 (56.8)	19 (43.2)	0.1 (0.01-0.91)	0.043
Cervical Cancer	10	7 (70)	3 (30)	0.19 (0.01-2.24)	0.39
C580T					
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CT/TT [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Control	13	11 (84.6)	2 (15.4)		
Low grade	42	33 (78.6)	9 (21.4)	0.66 (0.12-3.56)	0.93
High grade	44	31 (70.4)	13 (29.6)	0.43 (0.08 - 2.23)	0.5
Cervical Cancer	10	9 (90)	1 (10)	1.63 (0.12 - 21.1)	0.7

Πίνακας 3.9 Στον πίνακα παρουσιάζεται η επικράτηση του γονότυπου p16 540 CC έναντι των γονότυπων CG/GG (CC vs CG/GG) μεταξύ HPV16 αρνητικών δειγμάτων που δεν φέρουν ιστολογική αλλοίωση και HPV16 θετικών δειγμάτων που έχουν χαρακτηριστεί ως δείγματα χαμηλού (Low grade), υψηλού βαθμού (High grade) τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και σε περιπτώσεις καρκίνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι υπάρχει σημαντική επικράτηση του γονότυπου p16 540 CC μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων (92.3%), των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (69%), των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης (56.8%) και των περιπτώσεων καρκίνου (70%). Παράλληλα παρατηρήθηκε μικρότερη επικράτηση των γονότυπων CG + GG τόσο σε φυσιολογικά δείγματα (7.7%), όσο και σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (31%), υψηλού βαθμού αλλοίωσης (42.2%) δυσπλασίας και καρκίνου (30%).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική διαφορά στην επικράτηση του p16 540 CC γονότυπου (CC vs CG/GG) μεταξύ φυσιολογικών

δειγμάτων και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης (92.3% των φυσιολογικών δειγμάτων έναντι του 56.8% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης). Η υψηλή επικράτηση του γονότυπου p16 540 CC σε φυσιολογικά δείγματα είναι στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνεται με υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες ($P = 0.043$). Επιπλέον, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 0.1 ($OR = 0.1$) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.01 έως 0.91 (95% CI = 0.01 έως 0.91). Τέλος, δεν αναφέρθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά από την σύγκριση της επικράτησης του p16 540 CC γονοτύπου τόσο μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (92.3% των φυσιολογικών δειγμάτων έναντι 69% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης), όσο και μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καρκίνου (92.3% των φυσιολογικών δειγμάτων έναντι 70% των δειγμάτων καρκίνου) ($P\text{-value} > 0.05$).

Όπως παρατηρείται και στον πίνακα 3.9 η ανάλυση του λόγου των σχετικών πιθανοτήτων (OR) από την σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων με όλους τους βαθμούς δυσπλασίας και των περιπτώσεων καρκίνου έδωσε τιμές < 1 , γεγονός που υποδηλώνει ότι η επικράτηση του CC γονοτύπου προσφέρει προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη τραχηλικής αλλοίωσης και καρκίνου. Παρόλα αυτά, μόνο η σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Λαμβάνοντας όλα τα ανωτέρω στοιχεία υπόψη συμπεραίνουμε ότι η επικράτηση του p16 540 CC γονοτύπου προσφέρει προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού αλλοίωσης στο εξεταζόμενο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκε στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό.

Όσον αφορά τον γενετικό τόπο 580 (C580T) παρατηρήθηκε σημαντική επικράτηση του γονοτύπου p16 580 CC μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων (84,6%), των δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (78,6%) των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης (70,4%) και των περιπτώσεων καρκίνου (90%). Παράλληλα παρατηρήθηκε μικρότερη επικράτηση των γονοτύπων CT + TT τόσο σε φυσιολογικά δείγματα (15.4%), όσο και σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (21.4%), υψηλού βαθμού αλλοίωσης (29.6%) δυσπλασίας και καρκίνου (10%).

Η ανάλυση των δεδομένων αυτών έδειξε σημαντική διαφορά στην επικράτηση του p16 580 CC γονοτύπου (CC vs CT/TT) μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (84,6% των φυσιολογικών δειγμάτων έναντι του 78.6% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού

αλλοίωσης). Η υψηλή επικράτηση του γονότυπου p16 580 CC σε φυσιολογικά δείγματα δεν ήταν στατιστικά σημαντική (P-value > 0.05), ο λόγος των σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 0.66 (OR = 0,66) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.12 έως 3.56 (95% CI = 0.12 - 3.56). Επιπλέον παρατηρήθηκε διαφορά στην επικράτηση του p16 580 CC γονότυπου (CC vs CT/TT) μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης (84,6% των φυσιολογικών δειγμάτων έναντι του 70.4% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης). Παρόλα αυτά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική καθώς το P-value > 0.05, OR = 0.43 και 95% CI = 0.08 - 2.23. Τέλος, εντοπίστηκε σημαντική επικράτηση του p16 580 CC γονότυπου σε περιπτώσεις καρκίνου (90%), αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σύνδεση όταν συγκρίθηκε με φυσιολογικά δείγματα (P-value > 0.05) OR = 1.63 και 95% CI = 0.12 - 21.1).

Recessive model

C540G					
Cervical lesion	Samples (n)	GG [n (%)]	CC/CG [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Control	13	0 (0)	13 (100)		
Low grade	42	0 (0)	42 (100)		ne
High grade	44	3 (6.8)	41 (93.2)	2.27 (0.11-46.9)	0.79
Cervical Cancer	10	0 (0)	10 (100)		ne
C580T					
Cervical lesion	Samples (n)	TT [n (%)]	CC/CT [n (%)]	OR CC vs other genotype (95% CI)	P-value
Control	13	0 (0)	13 (100)		
Low grade	42	0 (0)	42 (100)		ne
High grade	44	1 (2.3)	43 (97.7)	0.93 (0.03-24.2)	0.58
Cervical Cancer	10	0 (0)	10 (90)		ne

Πίνακας 3.10

Στον πίνακα παρουσιάζεται η επικράτηση του γονότυπου p16 540 GG, έναντι των γονότυπων CC/CG (GG vs CC/CG) μεταξύ HPV16 αρνητικών δειγμάτων που δεν φέρουν ιστολογική αλλοίωση και HPV16 θετικών δειγμάτων που έχουν χαρακτηριστεί ως δείγματα χαμηλού (Low grade), υψηλού βαθμού (High grade) τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και σε περιπτώσεις καρκίνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι ο γονότυπος p16 540 GG δεν εμφανίζεται σε φυσιολογικά δείγματα, σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και σε περιπτώσεις καρκίνου. Επιπρόσθετα, ο γονότυπος p16 540 GG παρουσιάζει μικρή επικράτηση σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες. Αντιθέτως, οι γονότυποι CC + CG φαίνεται να επικρατούν στο 100% των περιπτώσεων των φυσιολογικών δειγμάτων, των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και των περιπτώσεων καρκίνου, ενώ εντοπίστηκε στο 93.2% των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης. Τέλος, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική σύνδεση μεταξύ των γονότυπων και του βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Όσον αφορά τον γενετικό τόπο 580 (C580T) ο p16 580 TT γονότυπος δεν εντοπίστηκε σε φυσιολογικά δείγματα, σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και δείγματα καρκίνου, ενώ ανιχνεύθηκε μόνο στο 2.3% των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης. Αντιθέτως η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική επικράτηση των γονοτύπων CC + CT μεταξύ των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι γονότυποι CC + CT παρατηρήθηκαν στο 100% των περιπτώσεων των φυσιολογικών δειγμάτων, στο 100% των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης, στο 97.7% των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης και στο 90% των δειγμάτων καρκίνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική σύνδεση μεταξύ των γονοτύπων και του βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Dominant model

					CC	CG	GG
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CG [n (%)]	GG [n (%)]	P-value OR (95% CI)		
Control	13	12 (92.3)	1 (7.7)	0(0)			
Low grade	42	29 (69)	13 (31)	0 (0)		0.092	ne
High grade	44	25 (56.8)	16 (36.4)	3 (6.8)		0.075	0.6
Cervical Cancer	10	7 (70)	3 (30)	0(0)		0.16	ne
C580T					CC	CT	TT
Cervical lesion	Samples (n)	CC [n (%)]	CT [n (%)]	TT [n (%)]	P-value OR (95% CI)		
Control	13	11 (84.6)	2 (15.4)	0 (0)			
Low grade	42	33 (78.6)	9 (21.4)	0 (0)		0.63	ne
High grade	44	31 (70.5)	12 (27.3)	1 (2.2)		0.36	0.55
Cervical Cancer	10	9 (90)	1 (0)	0 (0)		0.7	ne

Πίνακας 3.11 Στον πίνακα αυτό φαίνεται πάνω για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση των τριών γονοτύπων μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και α)των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης , β)των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης και γ)των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των τριών γονοτύπων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ αρνητικών HPV-16 δειγμάτων και LG δειγμάτων, μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και HG δειγμάτων καθώς και μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και καρκινικών δειγμάτων. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε σημαντική επικράτηση του γονοτύπου CC στα φυσιολογικά δείγματα έναντι των υπολοίπων γονοτύπων CG και GG. Κάτω, φαίνονται για τον πολυμορφισμό 580C→T,η συσχέτιση των τριών γονοτύπων μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και α)των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης , β)των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης και γ)των καρκινικών δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης οι συχνότητες των τριών γονοτύπων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ αρνητικών HPV-16 δειγμάτων και LG δειγμάτων, μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και HG δειγμάτων καθώς και μεταξύ των αρνητικών σε HPV-16 δειγμάτων και καρκινικών δειγμάτων.

Allelic Association					
C540G					
Cervical lesion	Samples (n)	C [n (%)]	G [n (%)]	OR C vs G Allele (95% CI)	P-value
Control	13	25 (96.1)	1 (3.8)		
Low grade	42	71 (84.5)	13 (15.5)	0.21 (0.02-1.7)	0.22
High grade	44	66 (75)	22 (25)	0.12 (0.01-0.9)	0.037
Cervical Cancer	10	17 (85)	3 (15)	0.22 (0.02-2.36)	0.42
C580T					
Cervical lesion	Samples (n)	C [n (%)]	T [n (%)]	OR C vs T Allele (95% CI)	P-value
Control	13	24 (92.3)	2 (7.7)		
Low grade	42	75 (89.3)	9 (10.7)	0.69 (0.14- 3.43)	0.94
High grade	44	64 (72.7)	2 (27.3)	2.66 (0.35- 20.0)	0.67
Cervical Cancer	10	19 (95)	1 (5)	1.58 (0.13-18.8)	0.71

Πίνακας 3.12 Στον πίνακα αυτό φαίνεται πάνω για τον πολυμορφισμό 540C→G η συσχέτιση των δύο αλληλομόρφων μεταξύ των αρνητικών HPV-16 δειγμάτων και α)των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης, β)των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης και γ)των καρκινικών δειγμάτων.

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναφέρθηκε σημαντική επικράτηση του C αλληλομόρφου μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων, των δειγμάτων χαμηλού, υψηλού βαθμού δυσπλασίας και των περιπτώσεων καρκίνου. Αντιθέτως το αλληλόμορφο G παρατηρείται με μικρότερη συχνότητα μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και των διαφορετικών σταδίων της τραχηλικής αλλοίωσης.

Η υψηλή επικράτηση του γονότυπου αλληλομόρφου C σε φυσιολογικά δείγματα είναι στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνεται με υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες ($P = 0.037$). Επιπλέον, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 0.12 ($OR = 0.12$) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.01 έως 0.91 ($95\% CI = 0.01$ έως 0.9). Τέλος δεν αναφέρθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για την επικράτηση του C αλληλομόρφου τόσο μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, όσο και μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καρκίνου $P\text{-value} > 0.05$. Επιπλέον, όπως παρατηρείται και στον πίνακα 3.12 η ανάλυση του λόγου των σχετικών πιθανοτήτων (OR) από την σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων με όλους τους βαθμούς δυσπλασίας και των

περιπτώσεων καρκίνου έδωσε τιμές < 1 , γεγονός που υποδηλώνει ότι η επικράτηση του C αλληλομόρφου παρέχει προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη τραχηλικής αλλοίωσης και καρκίνου. Παρόλα αυτά, μόνο η σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Όσον αφορά τον γενετικό τόπο 580 (C580T) παρατηρήθηκε σημαντική επικράτηση του αλληλομόρφου C μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και σε όλα τα στάδια της τραχηλικής αλλοίωσης, ενώ παρατηρήθηκε μικρότερη επικράτηση του αλληλομόρφου T. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε σημαντική διαφορά στην επικράτηση του C αλληλομόρφου (C vs T) μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης. Η υψηλή επικράτηση C αλληλομόρφου σε φυσιολογικά δείγματα δεν ήταν στατιστικά σημαντική (P-value > 0.05), ο λόγος των σχετικών πιθανοτήτων ισούται με 0.69 (OR = 0.69) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.14 έως 3.43 (95% CI = 0.14 - 3.42). Επιπλέον παρατηρήθηκε διαφορά στην επικράτηση του C αλληλομόρφου μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων υψηλού βαθμού αλλοίωσης. Παρόλα αυτά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική καθώς P-value > 0.05 , OR = 2.66 και 95% CI = 0.35 - 20. Τέλος, εντοπίστηκε σημαντική επικράτηση του C αλληλομόρφου σε περιπτώσεις καρκίνου, αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σύνδεση όταν συγκρίθηκε με φυσιολογικά δείγματα (P-value > 0.05) OR = 1.58 και 95% CI = 0.13 - 18.8). Από την σύγκριση των φυσιολογικών δειγμάτων και των περιπτώσεων καρκίνου μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο C έχουν 1.58 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Παρόλα αυτά η σύνδεση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Haplotypes	Control	Low grade	P- value	OR (95% CI)
540C/580C	23 (88.5)	64 (75.8)		
540C/580T	2 (7.7)	7 (8.7)	0.78	1.25 (0.24-6.49)
540G/580C	1 (3.8)	11 (13.4)	0.31	3.95 (0.48-32.34)
540G/580T	0	2 (2)	0.97	1.82 (0.08- 39.35)

Πίνακας 3.13 Στον πίνακα αυτό φαίνεται η συσχέτιση του πιο συχνά εμφανιζόμενου απλότυπου 540C/580C με τους άλλους τρεις απλότυπους (540C/580T, 540G/580C, 540G/580T) μεταξύ HPV-16 αρνητικών και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δειγμάτων.

Haplotypes	Control	High grade	P- value	OR (95% CI)
540C/580C	23 (88.5)	52 (59)		
540C/580T	2 (7.7)	14 (16)	0.24	3.09 (0.65-14.7)
540G/580C	1 (3.8)	22 (25)	0.02	9.7 (1-76)
540G/580T	0	0 (0)	ne	

Πίνακας 3.14 Στον πίνακα αυτό φαίνεται η συσχέτιση του απλότυπου 540C/580C με τους άλλους τρεις απλότυπους (540C/580T, 540G/580C, 540G/580T) μεταξύ HPV-16 αρνητικών και υψηλού βαθμού δυσπλασίας δειγμάτων.

Haplotypes	Control	Cervical cancer	P- value	OR (95% CI)
540C/580C	23 (88.5)	16 (80)		
540C/580T	2 (7.7)	1 (5)	0.8	0.71 (0.06- 8.61)
540G/580C	1 (3.8)	3 (15)	0.43	4.31 (0.41-45.28)
540G/580T	0	0	ne	

Πίνακας 3.15 Στον πίνακα αυτό φαίνεται η συσχέτιση του πιο συχνά εμφανιζόμενου απλότυπου 540C/580C με τους άλλους τρεις απλότυπους (540C/580T, 540G/580C, 540G/580T) μεταξύ HPV-16 αρνητικών και καρκινικών δειγμάτων.

Οι συχνότητες των απολοτύπων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Shesis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση μέσω της μεθόδου χ^2 , με βασικό στόχο να προσδιοριστεί η σύνδεση συγκεκριμένων απλοτύπων με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας

Από τον υπολογισμό της συχνότητας των απλοτύπων φαίνεται ότι σε δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας ο πιο συχνά εμφανιζόμενος απλότυπος είναι ο CC (75%) και ακολουθούν σε συχνότητα οι GC (13.4%), CT (8.7%) και τέλος ο απλότυπος GT (2%). Όσον αφορά τα φυσιολογικά δείγματα ο πιο επικρατής απλότυπος είναι ο CC (88.5%) και ακολουθούν οι CT (7.7%) και ο GC (3.8%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε ο απλότυπος GT μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν παρατηρήθηκε σύνδεση της επικράτησης συγκεκριμένου απλότυπου μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (Πίνακας 3.13)

Επιπλέον, ο πιο συχνά εμφανιζόμενος απλότυπος μεταξύ των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης είναι ο CC (59%) και ακολουθούν οι GC (25%), CT (16%), ενώ δεν παρατηρήθηκε ένδειξη του απλότυπου GT μεταξύ των δειγμάτων υψηλής αλλοίωσης. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο απλότυπος GC εμφανίζεται πιο συχνά σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (25%) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα (3.8%). Η επικράτηση του απλότυπου GC σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική (P value = 0.02, OR = 9.7, 95% CI = 1-76) (Πίνακας 3.14)

Τέλος, στις περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ο πιο συχνά εμφανιζόμενος απλότυπος είναι ο CC (80%) και ακολουθούν οι GC (15%), CT (5%), ενώ δεν παρατηρήθηκε ένδειξη του απλότυπου GT. Επιπλέον, από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν παρατηρήθηκε σύνδεση της επικράτησης συγκεκριμένου απλότυπου μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων καρκίνου (Πίνακας 3.13)

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι παγκοσμίως ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, και προκαλείται ως γνωστόν κατά κύριο λόγο από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV-16. Το p16 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η αδρανοποίηση του οποίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πιστεύεται ότι συμβάλλει στην κακοήθεια (L. Yan et.al. 2007). Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης ,που αποτελεί την πιο σημαντική επιγενετική αλλαγή, του p16 γονιδίου και της εμφάνισης χαμηλού βαθμού ενδοτραχηλικής δυσπλασίας(Silveira et.al. 2015) αλλά και της εμφάνισης καρκίνου τραχήλου της μήτρας σε Ινδές γυναίκες (Gurta A. 2016). Επίσης ο Li J και οι συνεργάτες του πρότειναν πως η μεθυλίωση του p16 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης για τη διάγνωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε πρώιμο στάδιο (Li J et al 2016) . Σημαντική συσχέτιση έγινε επιπροσθέτως και μεταξύ του επιπέδου έκφρασης του p16 και της εξέλιξης υψηλού βαθμού τραχηλικής δυσπλασίας σε καρκίνο, σε Μαροκινές γυναίκες(Zouheir Y et el, 2016) αλλά και μεταξύ της αποσιώπησης του με την ογκογόνο ικανότητα καρκινικών κυττάρων HeLa (Wu H et al 2016) . Όλα τα ανωτέρω στοιχεία συσχετίζουν άμεσα το γονίδιο p16 με τη σοβαρότητα προκαρκινικών καταστάσεων , αλλά και με την εξέλιξη τους σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η σύνδεση των πολυμορφισμών p16 540 C/G και p16 580 C/T του p16 γονιδίου με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, δίνοντας αντιφατικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα ο L. Yan και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι ο πολυμορφισμός p16 540 C/G δεν συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου του επιθηλίου των ωθηκών, ενώ ο πολυμορφισμός p16 580 C/T συνδέεται με διαφορετικές ιστολογικές υποκατηγορίες του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου (Yan, 2008). Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί p16 540C/G και p16 580C/T έχουν συνδεθεί με πιο αργή εξέλιξη του μελανώματος σε μεταστατικό καρκίνο (Sauroja, 2000), ενώ ο πολυμορφισμός p16 540 CG έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη οικογενούς μελανώματος (Aitken, 1999). Τέλος, δεν έχει παρατηρηθεί σύνδεση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την ανάπτυξη καρκίνου της κεφαλής και του λαιμού (Head and Neck cancer) (Zheng, 2002, Gebbet, 2005). Όσον αφορά την

σύνδεση των γονοτύπων αυτών με την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχει παρατηρηθεί στον Ινδικό πληθυσμό ότι ασθενείς που φέρουν είτε τον πολυμορφισμό p16 540 C/G ή τον πολυμορφισμό p16 580 C/T παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Thakur, 2011).

Για τον λόγο αυτό στην παρούσα ανάλυση μελετήθηκε η επικράτηση των γονοτύπων p16 540C/G και p16 580C/T τόσο σε φυσιολογικά δείγματα όσο και σε δείγματα προ-καρκινικής και καρκινικής τραχηλικής αλλοίωσης θετικά για μόλυνση με τον HPV16, με στόχο να εντοπίσουμε την σύνδεση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την εμφάνιση της νόσου στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο γονότυπος p16 540C/G δεν συνδέεται με την ανάπτυξη προκαρκινικών και καρκινικών τραχηλικών αλλοιώσεων. Πιο συγκεκριμένα, το «επικρατές μοντέλο» ανάλυσης του γονοτύπου p16 540CG (CC έναντι CG + GG) έδειξε σημαντική επικράτηση του γονοτύπου p16 540CC σε φυσιολογικά δείγματα (92.3%). Η επικράτηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο όταν τα φυσιολογικά δείγματα συγκρίθηκαν με δείγματα υψηλού βαθμού αλλοίωσης ($P = 0.043$, $OR = 0.1$, $95\% CI = 0,01 - 0,91$). Επιπλέον, με βάση το «υπολειπόμενο μοντέλο» (CC + CG εναντίον GG), παρατηρήσαμε ότι τρεις περιπτώσεις υψηλού βαθμού δυσπλασίας έφεραν τον γονότυπο p16 540GG, ενώ κανένα από τα HPV-16 αρνητικά δείγματα δεν εμφάνισε τον εν λόγω γονότυπο. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι το αλληλόμορφο C μπορεί να προσφέρει σημαντική προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού αλλοίωσης ($P = 0.037$, $OR = 0,12$, $95\% CI = 0,01 - 0,9$). Όλα αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η επικράτηση του p16 540CC γονότυπου έχει σημαντική προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό, καθώς επίσης και ότι φορείς του αλληλομόρφου C έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρού βαθμού δυσπλασίας. Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε σημαντική σύνδεση του πολυμορφισμού p16 580C/T με την εμφάνιση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τα δεδομένα προηγούμενης ανάλυσης στην οποία προτείνεται ότι η επικράτηση τόσο του p16 540CG γονοτύπου όσο και η επικράτηση του p16 580CT γονοτύπου προσφέρει προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, (Thakur, 2011).

Τέλος ο απλότυπος 540G / 580C βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με υψηλού βαθμού τραχηλικές δυσπλασίες, με ποσοστό 25%, σε σύγκριση με την ομάδα των HPV-16 αρνητικών δειγμάτων που εμφάνισε ποσοστό 3,8%. ($P = 0,05$, $OR = 9.7$, $95\% CI = 1-76$). Ο 540G / 580C συνεπώς είναι ένας σημαντικός

απλότυπος που συνδέεται με την ανάπτυξη υψηλού βαθμού δυσπλασίας μεταξύ των Ελληνίδων γυναικών. Καθώς όμως τα αποτελέσματα βασίζονται σε χαμηλό αριθμό HPV-16 αρνητικών δειγμάτων, πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των HPV-16 αρνητικών δειγμάτων σε ανάλογο επίπεδο με τον αριθμό δειγμάτων των υπόλοιπων ομάδων. Με αυτόν τον τρόπο οι ομάδες θα είναι περισσότερο ομοιόμορφες και θα υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία.

Κεφάλαιο 5^ο

Βιβλιογραφικές αναφορές

Abbate EA, Voitenleitner C, Botchan MR(2006) Structure of the papillomavirus DNA tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell*. 24(6):877-89

Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 91(5):446-52.

Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272(1):137-150

Artandi SE, Attardi LD, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*(3):881-90.

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS (2005) E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 113(2):276-283

Auster AS, Joshua-Tor L (2004) The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1: Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem* 279(5):3733-3742

Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML (2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* 67(4):574-582

Baker CC, Howley PM (1987) Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 6(4):1027-1035

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowsert LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60(6):1445-1456

Barbarese S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS (2010) Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol* 91(Pt 2):521-530

- Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 8:1277-1286
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology* 445(1-2):35-56
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63(10):4317-4324
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70-79
- Bernard HU (2013) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445(1-2):197-204
- Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3(5):1151-1157
- Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):2006-2011
- Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18:2449-2458
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78(2):751-757
- Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445(1-2):169-174
- 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* 445(1-2):224-231
- 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* 53:25-36
- Castella S, Burqin D, Sanders CM (2006) Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res* 34(13):3731-3741

- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65(2):606-612
- Danos, V. & Regnier, L. *Arch Math Logic* (1989) The structure of multiplicatives
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445(1-2):2-10
- Debniak T, Scott RJ, Huzarski T et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res* 2005;65:835-9
- DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445(1-2):99-114
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S7–S15
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525–541
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55-70
- Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445(1-2):80-98
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66(Pt 7):1515-1522
- Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T (2012) The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86(6):3276-3283
- Fehrmann F, Laimins LA (2003) Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22(33):5201-5207
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL (2003) Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77(8):4818-4826
- Flores, E., B. L. Allen-Hoffman, D. Lee, Lambert P., (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622-6631.

- Francis DA, Schmid SI, Howley PM(2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol* (6):2679-86
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090-2100
- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M (2010) *Virus Genes* 40(1):1-13
- Gupta A, Ahmad MK, Mahndi AA, Singh R, Pradeep Y (2016) Promoter Methylation and Relative mRNA Expression of the p16 Gene in Cervical Cancer in North Indians *Asian Pac J Cancer Prev.* :4149-54.
- Ham J, Dostatni N, Gauthier JM, Yaniv M (1991) The papillomavirus E2 protein: A factor with many talents. *Trends Biochem Sci* 16(11):440-444
- Hebner CM, Laimins LA (2006) Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16(2):83-97
- Howley PM, Lowy DR. 2007. Papillomaviruses. In: Knipe. DM, Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, :1662–1703
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10(13):4129-4135
- Juckett G., Hartman-Addams H.(2010) Human Papillomavirus: Clinical Manifestations and Prevention. *Am Fam Physician.* 2010 Nov 15;82(10):1209-1214.
- Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H (2012) Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 3:152
- Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001) Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10(1):46-54
- 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 Acad Sci USA* 106(48):20458-20463
- Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27(18):2532-2541
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M (1999) Detection of high-risk cervical

intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59(24):6132-6136

Kremsdorf D., Jablonska S., Favre M., Orth G. (1983) Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10 and 12 genomes *J Virol*, 48, pp. 340–351

Li J, Zhou C, Zhou H, Bao T, Gao T, Jiang X, Ye M The association between methylated CDKN2A and cervical carcinogenesis, and its diagnostic value in cervical cancer: a meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag.* 12:1249-60

Longworth, M. S., and L. A. Laimins., 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541

Marchini S, Codegoni AM, Bonazzi C, Chiari S, Broggin M. (1997) Absence of deletions but frequent loss of expression of p16INK4 in human ovarian tumours. *Br J Cancer* ;76:146-9

Matsukura T, Koi S, Sugase M (1989) Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 172(1):63-72

McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 72:155-205

McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445(1-2):57-79

McCloud JM, Sivakumar R, Greenhough A. et al. P16INK4a polymorphism: associations with tumour progression in patients with sporadic colorectal cancer. *Int J Oncol* 2004;25:1447-52

Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21(18):4754-4762

Morin G, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Berqeron –Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J (2011) A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85(11):5287-5300

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78(21):11451-11460

Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM (2006) Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int* 6:19

Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault, Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault, 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 29, 26765-26772

Pett M, Coleman N (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212(4):356-367

Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, Malejczyk M. (2003) High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res.* ;295:273–279

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF (2009) Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5(2):e1000318

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2006) Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5):1522-1527

Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445(1-2):138-168

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* 275(5):3522-3534

Sathish N. Wang X. Yuan Y. (2014) Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *JDR Clinical Research Supplementz* vol.93 suppl. 1, issue 7:29S-36S

Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, Punnonen K, Jansèn CT, Hemminki K, Pyrhönen S. (2000) **Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*: 404-14.**

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75(3):495-505

Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 118(1 Suppl):S12-S17

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

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314(6006):111-114

Sedman J, Stenlund A (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* (8):6893-7.

Silveira FA, Almeida G, Furtado Y, Silva KS, Maldonado P, Cavalcanti S, Carvalho Mda G (2015) .HPV DNA genotyping and methylation of gene p16 INK4A in cervical LSIL. *Exp Mol Pathol.* :308-11

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* 287(16):2114-2119

Stubenrauch F, Leigh IM, Pfister H (1996) E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* 70(1):119-126

Sun Y, Han H, McCance DJ (1998) Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79(Pt 7):1651-1658

Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF, Bharadwaj M.(2006) Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population *Mol Biol Rep.*;39(1):407-14

Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 74(16):7349-7361

Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J (2003) Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77(9):5178-5191

Vande Pol SB, Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137

Vanden Broeck D (2012), Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects. InTech; Rijeka, Croatia: p. 29

Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Durst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68(1):307-313

Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T (1990) Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* 64(2):813-821

Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi., 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749

Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM (2011) Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol* 85(16):8080-8092

Wang JW, Roden RB (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445(1-2):175-186

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64(11):3878-3884

Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Muller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S, Macdonald A (2012) High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol* 86(9):5341-5351

White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J (2001) Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276(25):22426-22438

Wise-Draper TM, Wells SI (2008) Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* 13:1003-10017

Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N, Harrison SC (2010) Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(14):6298-6303

Wu H, Zhang J, Shi H. Expression of cancer stem markers could be influenced by silencing of p16 gene in HeLa cervical carcinoma cells. *Eur J Gynaecol Oncol.* (2):221-5.

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* 8(6):e66693

Yan L, Na W, Shan K, Xiao-Wei M, Wei G, Shu-Cheng C (2007) p16(CDKN2) gene polymorphism: association with histologic subtypes of epithelial ovarian cancer in China. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:30-35

Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ (2003) Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 1. *Protein Expr Purif* 30(1):1-10

Zanier K, M'Hamed Ould Sidi AO, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Trave G (2012) Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure* 20(4):604-617

Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Bahah KO, Asnsari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S, Trave G (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* 339(6120):694-698

Zhao KN, Henqst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA, Frazer IH (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* 272(2):382-393

Zheng Y, Shen H, Sturgis EM et al (2002) Haplotypes of two variants in p16(CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:640-5

Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11:2286-2302

Zouheir Y, Fechtali T, Elgnaoui N (2016) Human Papillomavirus Genotyping and p16(INK4a) Expression in Cervical Lesions: A Combined Test to Avoid Cervical Cancer Progression J Cancer Prev. :121-5

Zur Hausen, H, (1996) Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1288(2):F55-78