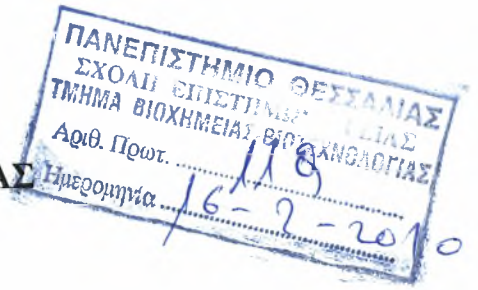
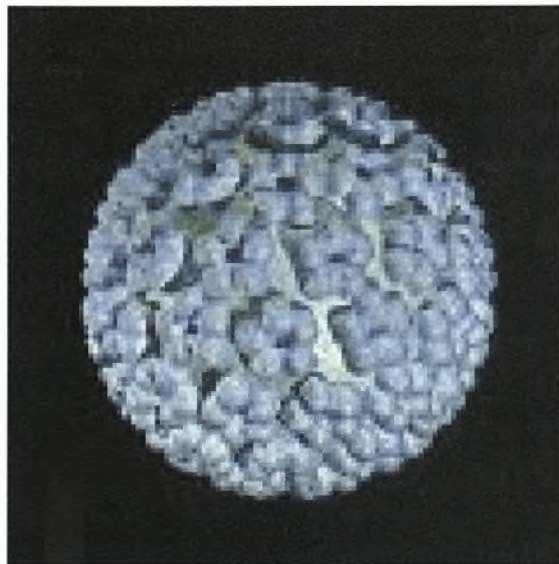


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Κλωνοποίηση και φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου E2 του Human
Papillomavirus (HPV)-16**



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΘΕΟΧΑΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

Λάρισα 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8174/1
Ημερ. Εισ.: 16-04-2010
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087107

Στους γονείς μου, Δημήτρη και Ευαγγελία.

Στοιχεία πτυχιακής εργασίας

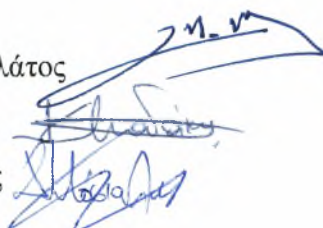
Η πειραματική και εργαστηριακή διαδικασία της πτυχιακής εργασίας με τίτλο <<Κλωνοποίηση και φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου E2 Human Papillomavirus (HPV)-16>> πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας – Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο Μάρτιος 2009 - Νοέμβριος 2009 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Π. Μαρκουλάτου.

Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής : Π. Μαρκουλάτος

Κ. Λιαδάκη

Δ. Μόσιαλος



Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας : 11/2/2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ.Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση και επίβλεψη της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας για την δυνατότητα που μου δόθηκε να ασχοληθώ με ένα θέμα που με ενδιέφερε από την πρώτη στιγμή των φοιτητικών μου σπουδών. Τον ευχαριστώ βαθύτατα που με τη βοήθειά του κατάφερα να πραγματοποιήσω την επιθυμία μου να ασχοληθώ με το ερευνητικό πεδίο της ιολογίας και μοριακής ογκογένεσης. Θέλω να εκφράσω τον θαυμασμό και την εκτίμησή μου στο πρόσωπό του και επίσης να αναφέρω πως τον θεωρώ υποδειγματικό καθηγητή.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους λέκτορες κ.Καλλιόπη Λιαδάκη και κ.Δημήτρη Μόσιαλο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα εργασία καθώς και για τις γνώσεις που απέκτησα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες Βάϊα Πλιάκα και Δημήτρη Τσακογιάννη για τη βοήθειά τους στο χώρο του εργαστηρίου καθώς επίσης και για το φιλικό περιβάλλον κατά τη συνεργασία μας. Ιδιαίτερα όμως θέλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη που νιώθω για τον Δημήτρη Τσακογιάννη για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διεξαγωγή της πτυχιακής εργασίας μου. Το ενδιαφέρον του για την περάτωση του εργαστηριακού μέρους της εργασίας μου ήταν αμέριστο και τον εκτιμώ γι'αυτό. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς φοιτητές Αικατερίνη Νικολούλη, Ιωάννα Χριστογιάννη και Ιωάννη Μουστάκα για τις εύθυμες στιγμές σ'αυτό το χρονικό διάστημα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τους κόπους και τις θυσίες που έκαναν ώστε να αποκτήσω τα απαραίτητα εφόδια για να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	7
1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPV)	8
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	8
1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses	10
1.2.1 Alpha-papillomaviruses	12
1.2.2 Beta-papillomaviruses.....	12
1.2.3 Gamma, Mu, Nu-paillomaviruses.....	12
2. Δομή του Human Papillomavirus (HPV).....	14
2.1 Δομή του καψιδίου.....	14
2.2 Οργάνωση γενώματος.....	15
2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1	16
2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2	17
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4	18
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5	19
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6	19
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7	21
3. Ο κύκλος ζωής των (HPV)	25
3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	25
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος.....	26
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος	27
3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	28
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις	29
4. Κλινικές εκδηλώσεις.....	30
4.1 Τρόποι μετάδοσης του HPV	30
5. Υλικά και μέθοδοι.....	31
5.1 Κλινικά δείγματα	31
5.2 Προετοιμασία DNA	31
5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.....	33
5.4 PCR με εκκινητικά μόρια που ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο E2 και τα επιμέρους τμήματα.....	34
5.5 PCR.....	37

5.6 Autonested PCR	38
5.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Autonested PCR.....	39
6. Κλωνοποίηση.....	39
6.1 Autonested Go Taq Flexi Πολυμεράση PCR	39
6.2 Αντίδραση λιγάσης	40
6.3 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων.....	41
6.4 Μετασχηματισμός.....	41
6.5 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης	42
7. Επεξεργασία αποτελεσμάτων με προγράμματα βιοπληροφορικής	43
8. Αποτελέσματα	44
8.1 Αποτελέσματα Autonested PCR	44
8.2 Αποτελέσματα κλωνοποίησης	47
8.2.1 RFLP με EcoRI.....	47
8.3 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των κλινικών δειγμάτων	48
8.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	50
9. Συζήτηση	58
10. Βιβλιογραφία	61

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (human papillomaviruses) περιέχουν δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους περίπου 8000 βάσεων. Περισσότεροι από 100 γενότυποι HPV έχουν χαρακτηριστεί ενώ 40 από αυτούς μολύνουν τη γεννητική οδό. Οι ιοί HPV προκαλούν ένα ευρύ φάσμα από κακοήθειες και καλοήθειες αλλοιώσεις στον άνθρωπο. Προσβάλλουν τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση κοινών θηλωμάτων έως και την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καρκίνου του πρωκτού ή του πέους. Οι ιοί HPV ταξινομούνται σε τύπους χαμηλής ή υψηλής επικινδυνότητας σύμφωνα με το βαθμό αλλοίωσης που προκαλούν. Οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου σχετίζονται με το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, από τις οποίες ο HPV-16 ευθύνεται για το 50% αυτών ενώ ο HPV-18 για το 10-20%.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με την κλωνοποίηση και την αλληλούχηση του γονιδίου E2 στελεχών HPV-16 από κλινικά δείγματα (Low και High grade) (τα οποία είναι μολυσμένα με HPV-16) με στόχο τον εντοπισμό μεταλλάξεων, οι οποίες μπορούν να συσχετιστούν με το βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Η πρωτεΐνη E2 αποτελεί αντικείμενο μελέτης διότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού γενώματος. Η E2 εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής των πρώιμων γονιδίων και με την πρωτεΐνη E1 εμπλέκονται στη ρύθμιση της αντιγραφής του ιικού γενώματος. Επίσης η E2 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7.

Για τη μελέτη της κατάστασης του γονιδίου E2 σχεδιάστηκαν έξι ζεύγη εκκινητικών μορίων που ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο E2 αλλά και τα επιμέρους τμήματά του. Τα προϊόντα που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν οι κλώνοι. Ακολούθησε η σύγκριση και η στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής. Στη συνέχεια έγινε εντοπισμός νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλλαγών και κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα.

1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPV)

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (human papillomaviruses-HPV) αποτελούνται από κυκλικό, δίκλωνο DNA μήκους 8 περίπου kb, το οποίο περιβάλλεται από εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο με 72 καψομερίδια. Οι HPV στερούνται περιβλήματος και είναι κατά συνέπεια ανθεκτικοί σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον έχουν παγκόσμια κατανομή και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα από καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις στον άνθρωπο. Παρά το γεγονός πως η λοίμωξη από τον ιό HPV θεωρείται σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, οι ιοί HPVs μπορούν επίσης να μεταδοθούν μέσω και άλλων μη σεξουαλικών οδών.

Οι HPV προσβάλλουν κατά κύριο λόγο τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, στη μεταβατική ζώνη του τραχήλου της μήτρας και σε μικροδιαβρώσεις του επιθηλίου (Hooy T. 2008). Μέχρι τον 19^ο αιώνα δεν είχε εντοπιστεί η προέλευση γενετικών αλλοιώσεων από τον ιό. Αν και οι αλλοιώσεις είχαν αναγνωριστεί ήδη από τους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, ομαδοποιήθηκαν με τις σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες όπως η σύφιλη και η γονόρροια. Αποδείχτηκε όμως από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα ότι ο ιός διαβιβάστηκε από διηθήματα κυττάρων και προσδιορίστηκε και σε διάφορα άλλα σπονδυλωτά είδη εκτός από τον άνθρωπο (Hooy T. et al 2008).

Σημαντικές πρόοδοι κατά τη δεκαετία του '50 και του '60 περιλαμβάνουν την απόδειξη ότι η αντιγραφή του ιού σχετίζεται με τη διαδικασία διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων που ο ιός μολύνει. Η μοριακή κλωνοποίηση οδήγησε σε μια αναγέννηση στην έρευνα των papillomaviruses γύρω στη δεκαετία του 1970 που επέτρεψε στους επιστήμονες να κλωνοποιήσουν τα γονιδιώματα των papillomaviruses και ως αποτέλεσμα ενισχύθηκε κατά ένα μεγάλο μέρος το ενδιαφέρον για τη μελέτη των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των ιών αυτών. Η αλληλούχηση επέτρεψε τον προσδιορισμό των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) που προέρχονται από γονίδια του ιού και η αντίστροφη γενετική επέτρεψε τον καθορισμό της λειτουργίας των γονιδίων (Howley P., Lowy D. 2007).

Η τυποποίηση των HPV στηρίζεται στις διαφορές του γονιδιώματος με βάση τις οποίες έχουν απομονωθεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι. Όμως στο συμπόσιο για τους ιούς των ανθρωπίνων θηλωμάτων που έγινε στο Seattle το 1991

αποφασίστηκε ότι για να αναγνωρισθεί ένας τύπος ως νέος θα πρέπει να κλωνοποιηθεί όλο το γονιδιωματά του και η αλληλουχία ορισμένων περιοχών (E6, L1 και URR) του ιού να εμφανίζει μικρότερη του 90 % ομολογία με τους γνωστούς τύπους. Οι διάφοροι τύποι των HPV διακρίνονται σε υπότυπους με βάση τις διαφορές που παρατηρούνται στη συμπεριφορά των τελευταίων κατά την ηλεκτροφόρηση μετά από διάσπαση του γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα.

Οι ιοί HPV μπορούν να ταξινομηθούν σε δερματικούς και βλεννογόνιους ανάλογα με τη θέση της λοίμωξης. Οι δερματικοί HPV τύποι προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι βλεννογόνιοι HPV τύποι προσβάλλουν το βλεννογόνο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, του ανώτερου αναπνευστικού σωλήνα και του οισοφάγου και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, παρά το γεγονός πως η παρουσία «υψηλού κινδύνου» ιών HPV έχει προταθεί ως αναγκαία συνθήκη για την αθανατοποίηση των επιθηλιακών κύτταρων, πειράματα *in vitro* έχουν δείξει πως η μόλυνση από μόνη της δεν είναι ικανή να οδηγήσει στον κακοήγη μετασχηματισμό του τραχήλου της μήτρας. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται στην κλινική πράξη λόγω τόσο της χαμηλής επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με την ευρεία διασπορά των ιών HPV παγκόσμια, όσο και λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που διαρκεί η εξέλιξη της HPV-επαγόμενης νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας. Επιπρόσθετα, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων του κυττάρου ξενιστή, συμμετέχουν στην εξέλιξη της λοίμωξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Narisava-Saito M., Kiyono T. 2007).

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί στον άνθρωπο περισσότεροι από 130 υπότυποι ενώ 20 από αυτούς προσβάλλουν το ουρογεννητικό του σύστημα. Μεταξύ αυτών υπάρχουν οι τύποι υψηλής επικινδυνότητας (High risk) που συναντώνται σε δυσπλασίες και σε καρκίνους επιδερμικής προέλευσης, οι τύποι χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk) που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε καλοήγη βλάβες, σε οξυτενή κονδυλώματα και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα και τέλος οι τύποι ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), οι οποίοι ανευρίσκονται σε δυσπλασίες (Munoz N. et al 2003).

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

Πίνακας 1. Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

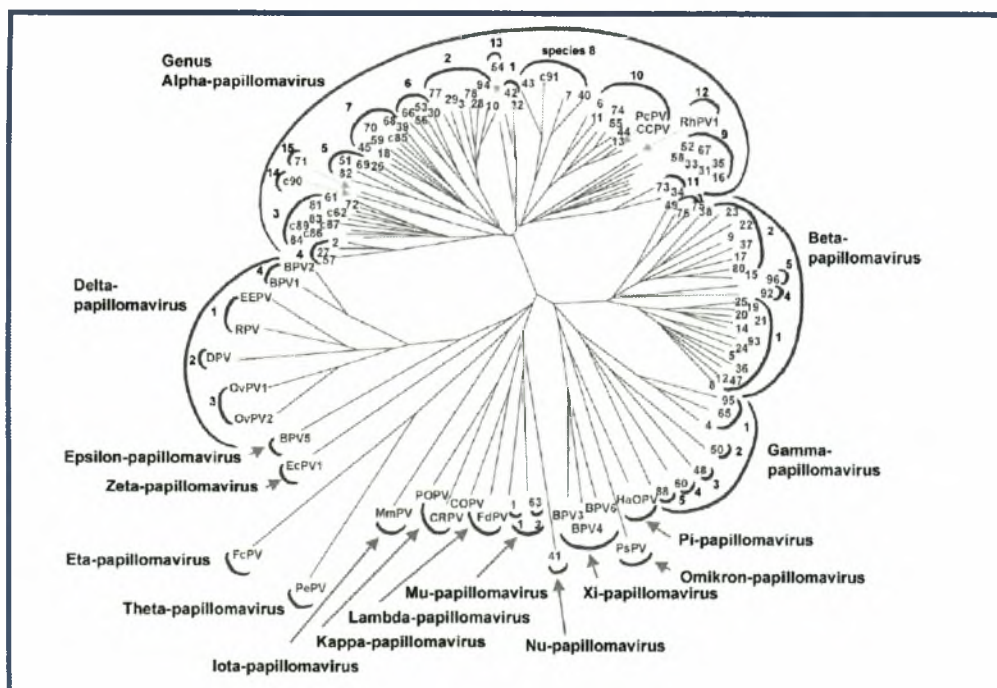
Το τραχηλικό τέστ Παπανικολάου (Pap-test) χρησιμοποιείται για να εντοπίσει κυτταρικές ανωμαλίες και την ύπαρξη του HPV. Έτσι, γίνεται δυνατή η χειρουργική αφαίρεση κονδυλωμάτων και/ή προ-καρκινικών αλλοιώσεων, πριν εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Παρόλο που η χρήση του τέστ Παπανικολάου έχει μειώσει την θνησιμότητα και την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου στις ανεπτυγμένες χώρες, αυτή η ασθένεια εξακολουθεί να αποτελεί αιτία θανάτου για χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο ανά τον κόσμο. Πρόσφατα εγκρίθηκε η χρήση δύο εμβολίων τα οποία αποτρέπουν την μόλυνση από τους πιο επικίνδυνους ογκογόνους τύπους HPV. Ο εμβολιασμός και η δημιουργία προστατευτικών αντισωμάτων προφυλάσσει από τους τύπους 16 και 18 κατά περίπου 100%, δηλαδή για τους δυο πιο επικίνδυνους για πρόκληση καρκίνου τύπους HPV, οι οποίοι ευθύνονται συνολικά για το 71% των περιπτώσεων καρκίνου. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο συνδυασμός εμβολιασμού και τακτικού προληπτικού ελέγχου με το Τεστ Παπ μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας κατά 94%.

1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) ήταν αρχικά ομαδοποιημένοι μαζί με τους polyomaviruses σε μια οικογένεια των Papovaviridae. Η ομαδοποίηση βασίστηκε στην έλλειψη περιβλήματος καθώς και στο κοινό κυκλικό δίκλωνο γονιδίωμα DNA. Δεδομένου ότι αργότερα αναγνωρίστηκε πως οι δύο ομάδες ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, τελείως διαφορετική οργάνωση του γονιδιώματος και καθόλου ομοιότητες νουκλεοτιδικής ή αμινοξικής ακολουθίας, αναγνωρίστηκαν από τη Διεθνή

Επιτροπή Ταξινόμησης των ιών (ICTV) σαν δύο διαφορετικές οικογένειες ιών, των papillomaviruses και polyomaviruses (de Villiers EM et al 2004).

Η αλληλουχία L1 είναι συντηρημένη μέσα στο γονιδίωμα και επομένως έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό νέων τύπων HPV κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 15 ετών. Εάν οι διαφορές στην ομολογία της αλληλουχίας L1 είναι μεταξύ 2 % και 10 % τότε καθορίζεται μια υποκατηγορία ενώ αν διαφέρει κατά 2 % τότε καθορίζεται ένα στέλεχος (de Villiers EM et al 2004). Μια τέτοια έκταση στην ομολογία έχει οδηγήσει στις ακόλουθες ταξινομήσεις: γένος, είδος, τύπος, υποκατηγορία και στέλεχος. Υπάρχουν 12 γένη που υποδεικνύονται με τα πρώτα 12 γράμματα της ελληνικής αλφαβήτου. Το L1 DNA όλων των μελών ενός γένους έχει ομοιότητα κατά 60 %. Από τα 12 γένη τα Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu είναι HPVs ενώ τα υπόλοιπα είναι ζωικά papillomaviruses (Hoory T. et al 2008). Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1, τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu περιέχουν στελέχη papillomaviruses που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) περιέχουν στελέχη papillomaviruses που έχουν απομονωθεί από πτηνά και θηλαστικά (Charles E. et al 2007, A.Antonson et al 2006).



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers E.M. et al 2004)

1.2.1 Alpha - papillomaviruses

Οι περισσότεροι HPV ιοί ανήκουν στην ομάδα των Alpha papillomaviruses και βρίσκονται μόνο στους ανθρώπους και τα πρωτεύοντα. Οι Alpha papillomaviruses είναι η ομάδα που περιέχει τύπους HPV που συνδέονται συχνά με την πρόκληση καρκίνου. Ο HPV-16 ευθύνεται για το 50 % των περιπτώσεων του καρκίνου της μήτρας ενώ ο HPV-18 για το 20 %. Αυτοί οι τύποι είναι ταξινομημένοι στους υψηλού κινδύνου ιούς και βρίσκονται μεταξύ των 20 ιών που μολύνουν τον τράχηλο. Οι Alpha papillomaviruses περιέχουν επίσης τύπους χαμηλού κινδύνου που δεν σχετίζονται όμως με τον καρκίνο. HPV τύποι όπως ο HPV-6 και HPV-11 προκαλούν αλλοιώσεις στα εξωτερικά γεννητικά όργανα κυρίως στους νέους ενήλικες. Το γένος των Alpha papillomaviruses επίσης περιλαμβάνει και ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος, όπως ο HPV-2 που προκαλεί κοινές αλλοιώσεις στα παιδιά (Doorbar J. 2006).

1.2.2 Beta - papillomaviruses

Το γένος Beta – papillomaviruses διαφέρει σημαντικά από το γένος Alpha papillomaviruses και εμφανίζεται να προκαλεί ασυμπτωματικές μολύνσεις στο γενικό πληθυσμό και σε παιδιά που μολύνονται σε νεαρή ηλικία. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε άτομα που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια Epidermodysplasia Verruciformis (EV), μπορούν αυτοί οι ιοί να διαδώσουν την ανάπτυξη μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος (Doorbar J. 2006).

1.2.3 Gamma, Mu, Nu - papillomaviruses

Οι υπόλοιποι τύποι HPV προέρχονται από τα γένη Gamma, Mu, Nu papillomaviruses και προκαλούν δερματικά θηλώματα που δεν προχωρούν όμως σε καρκίνο. Από το γένος Mu μόνο δύο στελέχη είναι γνωστά (HPV-1 και HPV-63) ενώ το γένος Nu περιλαμβάνει μόνο ένα στέλεχος (HPV-41) (Doorbar. J 2006). Στον πίνακα 2 περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu των papillomaviruses.

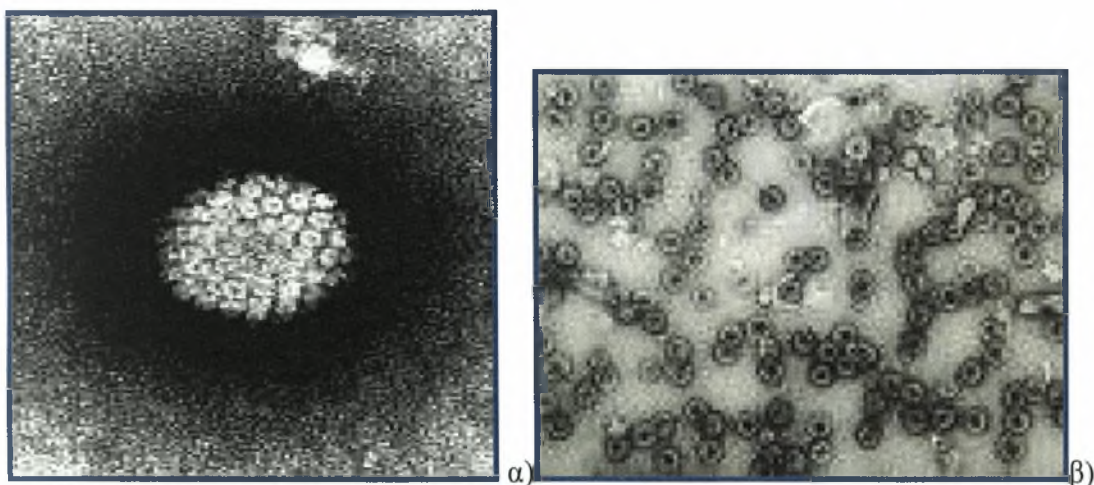
Γένος	Στέλεχος
Beta papillomaviruses	HPV-2, 5, 8, 107
Gamma papillomaviruses	HPV-101, 103
Mu papillomaviruses	HPV-1, 63
Nu papillomaviruses	HPV-41

Πίνακας 2. Σύντομη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

2. Δομή του Human Papillomavirus (HPV)

2.1 Δομή του καψιδίου

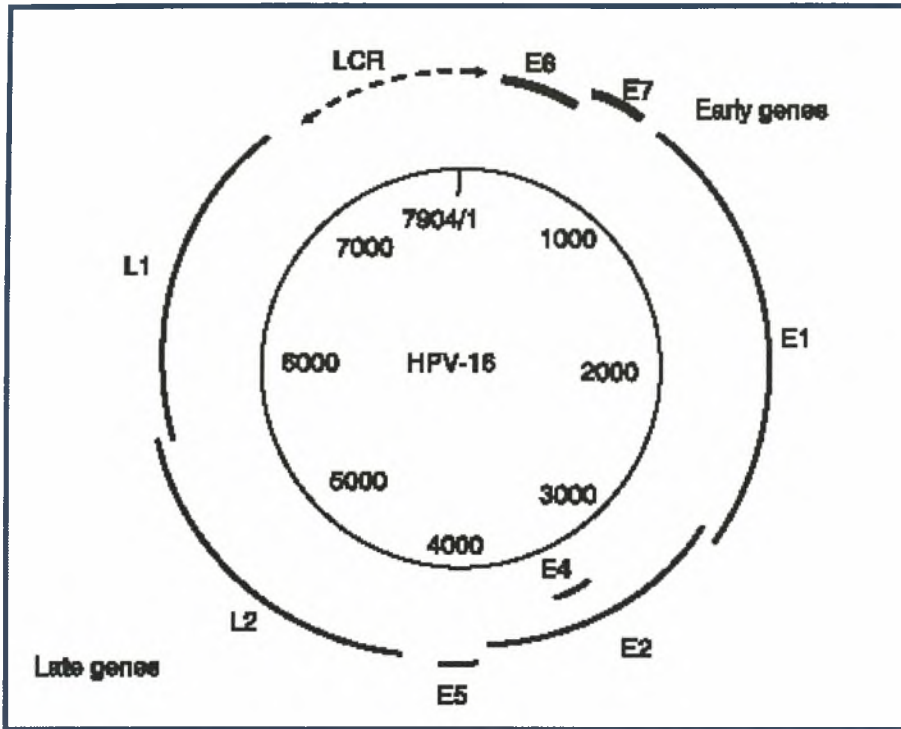
Οι papilloma ιοί είναι μικροί DNA ιοί, χωρίς εξωτερικό περίβλημα, με εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο και αντιγράφονται στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων. Τα ιικά σωματίδια των καψιδίων των papilloma ιών έχουν διάμετρο 52 έως 55 nm (Zhi-Ming Zheng et al. 2006). Οι ιοί αποτελούνται από 72 πενταμερικά καψομερίδια που σχηματίζουν ένα T=7 δικτυωτό πλέγμα επιφάνειας (Baker et al 1991). Το καψίδιο αποτελείται από δύο δομικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη του καψιδίου L1 έχει μοριακό βάρος 55kDa και αντιπροσωπεύει το 80 % της συνολικής ιικής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη του καψιδίου L2 έχει μοριακό βάρος 70kDa. Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη, 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. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι η δομική μονάδα του καψιδίου. Τα ιικά μόρια μπορούν να παραχθούν με την έκφραση της L1 πρωτεΐνης ή με τον συνδυασμό L1 και L2, χρησιμοποιώντας τα συστήματα έκφρασης του ξενιστή (Howley P., Lowy D. 2007).



Εικόνα 2. Το ιικό καψίδιο (α), ιικά σωματίδια(β) από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.2 Οργάνωση γενώματος

Οι HPV είναι ιοί χωρίς φάκελο, με καψίδιο εικοσαεδρικής δομής που αντιγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Το DNA του ιού είναι συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες για να διαμορφώσει σύμπλοκα που μοιάζουν με την χρωματίνη. Το γένωμά τους περιέχει 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται από τον ένα κλώνο DNA (Howley P.M 1996). Το δίκλωνο DNA των HPV κωδικοποιεί 6 πρώιμες (E) και 2 όψιμες (L) πρωτεΐνες. Το γένωμα των HPV αποτελείται από τρεις περιοχές που διαχωρίζονται ανάλογα με τη λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Επομένως το γονιδίωμα των HPV περιλαμβάνει την πρώιμη περιοχή (E= Early region), την όψιμη περιοχή (L=late region) και τέλος την ρυθμιστική περιοχή LCR (ή URR). Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή, την μεταγραφή και την μετάφραση του DNA του ιού. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p97 για τον HPV-16 και HPV-31 και p105 για τον HPV-18. Ο p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων (Danos O et al 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων γονιδίων (Zheng, Baker, 2006). Η περιοχή LCR έχει μέγεθος περίπου 1kb και δεν περιλαμβάνει ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, βρίσκεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E6. Η περιοχή αυτή περιέχει το σημείο έναρξης της αντιγραφής και πολλά στοιχεία ρύθμισης της μεταγραφής DNA (Demeret et al 1995, Shyh-Han Tan et al 2002).



Εικόνα 3. Παρουσίαση του γενώματος του HPV-16 (Narisava-Saito M., Kiyono T. 2007).

2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Το πιο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης είναι αυτό που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E1. Η πρωτεΐνη E1 έχει μέγεθος 68kDa και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα μολυσμένα από HPV κύτταρα. Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής και εμφανίζει δραστικότητα ATPάσης και 3',5' ελικάσης. Αναγνωρίζει πλούσιες περιοχές σε AT στο σημείο έναρξης της αντιγραφής (Frattini et al 1994, Muller et al,1997). Η E1 δεσμεύεται αδύναμα σε αλληλουχίες στην αφετηρία έναρξης της αντιγραφής αλλά η σύνδεσή της διευκολύνεται από το σχηματισμό συμπλόκου με την E2. Οι περιοχές σύνδεσης E2 βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με τις αλληλουχίες αναγνώρισης E1. Η πρωτεΐνη E2 ενεργεί ώστε να συνδεθεί η E1 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Οι πρωτεΐνες E1 σχηματίζουν εξαμερή που έχουν υψηλή συγγένεια με το DNA, το οποίο περνά από το κέντρο του εξαμερούς δακτυλίου (Sedman et al 1998, Liu et al 1998). Τα σύμπλοκα E1 ξετυλίγουν αποτελεσματικά το DNA με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (chaperone proteins). Η E1 επίσης δεσμεύει την DNA πολυμεράση και βοηθά στην στρατολόγηση των κυτταρικών συμπλόκων στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μπορεί επίσης να στρατολογηθεί από την E1 ώστε να διαμορφωθεί το νουκλεόσωμα

και να επιτραπεί η έναρξη της αντιγραφής. Η περιοχή του DNA όπου δεσμεύεται η E1, αποτελείται από μια εκτεταμένη θηλιά και μια α-έλικα που παίζουν ρόλο στην αναγνώριση του DNA. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της E1 και των κυκλινών A και E ρυθμίζει την δραστικότητα της E1. Επιπλέον βρίσκονται στην E1 4 θέσεις φωσφορυλίωσης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ενώ πιθανές μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές μειώνουν την δραστικότητα της E1 (Longworth M.S, Laimins L.A 2004).

2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 έχει μέγεθος 50kDa, λειτουργεί σαν διμερές και είναι απαραίτητη στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού γενώματος (Laimins et al 1998). Αποτελείται από την C-τελική περιοχή, η οποία μετά από κρυστάλλωση έδειξε ότι σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελίου που συνδέεται με το DNA (Hegde et al 1992). Η N-τελική περιοχή έχει κρυσταλλοποιηθεί επίσης και έχει δείξει ότι αποτελείται από μια α-έλικα πλούσια σε γλουταμίνες ανάμεσα σε ένα πλαίσιο β-έλασμα. Τα διμερή της E2 δεσμεύονται στις παλινδρομικές αλληλουχίες ACCN6GGT που ονομάζονται E2BSs. Υπάρχουν 4 από αυτές τις αλληλουχίες στην περιοχή URR ενώ 3 από αυτές πλαισιώνουν τις ακολουθίες αναγνώρισης E1 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής (Longworth M.S, Laimins L.A 2004).

Κατά τη μόλυνση, η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων ενεργοποιείται αρχικά από κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται στις ακολουθίες στην περιοχή URR (Steger et al, 1997). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 ενεργοποιεί περαιτέρω την έκφραση των πρώιμων γονιδίων ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων, όπως των TFIID και Sp1, στις E2BSs. Η E2 δρα επίσης ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Demeret et al 1997, Dostatni et al 1991). Η ρύθμιση της ιικής έκφρασης συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στη διαφοροποίηση υπάρχει μια αλλαγή στον όψιμο υποκινητή, ο οποίος δεν καταστέλλεται από την E2, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη έκφραση των E1 και E2 που οδηγεί στην ενίσχυση του ιικού DNA. Η E2 επίσης σχηματίζει σύμπλοκο με τους C/EBP μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλούς υποκινητές που παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση. Εκτός από το ρόλο της στη ρύθμιση της μεταγραφής, η υπερέκφραση της E2 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση μέσω ενός ανεξάρτητου μηχανισμού της p53 (Longworth M.S, Laimins L.A 2004).

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της E4 εκφράζεται κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του κύκλου ζωής του ιού. Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται ως το τρίτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στα πολυκιστρονικά μετάγραφα (Longworth M.S, Laimins L.A 2004). Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε σύγκριση με τις άλλες πρωτεΐνες του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της E4 μεταφράζεται μαζί με τα 5 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης E1 για να παραχθεί η πρωτεΐνη E1^{E4}. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της E4 στερείται του κωδικονίου AUG και χρησιμοποιεί την E1 για την έναρξη της μετάφρασης (Howley P.M 1996). Η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και την C-τελική περιοχή (Roberts et al., 1994).

Οι πρωτεΐνες E1^{E4} όλων των papillomaviruses εκφράζονται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των ιών. Οι E1^{E4} πρωτεΐνες των τύπων υψηλού κινδύνου HPV συνδέονται με δίκτυα κερατίνης στα κύτταρα και η υπερέκφρασή τους μπορεί να προκαλέσει την κατάρρευσή τους, καταδεικνύοντας το ρόλο των E1^{E4} κατά την έξοδο των ιών από τα κύτταρα. Το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του (Roberts et al 1994).

Οι E4 πρωτεΐνες στους HPV υψηλού κινδύνου μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, δεδομένου ότι αλληλεπιδρούν με μια RNA ελικάση, την E4-DBD, η οποία είναι μέλος μιας οικογένειας ελικασών που συμμετέχουν στο μάτισμα του mRNA, τη μεταφορά και την έναρξη της μετάφρασης. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών E1^{E4} στους τύπους HPV-11 και HPV-16 προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 σε διάφορους τύπους κυττάρων. Δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος της E1^{E4} στην παύση του κυτταρικού κύκλου κατά την προαγωγή του κύκλου ζωής, πιθανόν όμως να επιδρά στις επιπτώσεις της πρωτεΐνης E7, η οποία ωθεί τα κύτταρα στη φάση S (Davy C.E et al 2002).

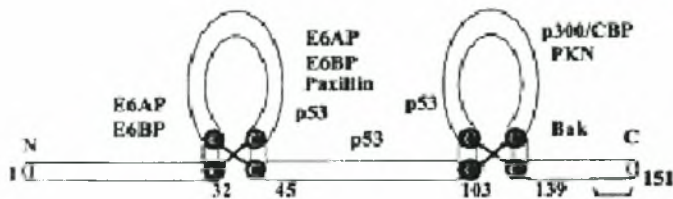
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της E5 εκφράζεται κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του κύκλου ζωής του ιού. Η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται ως το τέταρτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στα πολυκιστρονικά μετάγραφα (Longworth M.S, Laimins L.A 2004). Οι πρωτεΐνες E5 είναι μικρές, υδρόφοβες και οι λειτουργίες τους δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι εντοπισμένες σε ενδοσωμικές μεμβράνες και στο Golgi αλλά περιστασιακά μπορούν να βρεθούν και σε κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et al 1993).

Στα στελέχη των papilloma ιών (BPV) των βοειδών, η πρωτεΐνη E5 εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό μέσω της ένωσής της με τον παράγοντα PDGF. Οι πρωτεΐνες E5 των HPV έχουν μικρή ομολογία με τις αντίστοιχες των BPV και ενεργούν πιθανώς μέσω διαφορετικών κυτταρικών στόχων. Η E5 των HPV συνδέεται με τον παράγοντα EGF και λειτουργεί κατά παρόμοιο τρόπο όπως η E5 των BPV και ο PDGF. Η υπερέκφραση της E5 αυξάνει την φωσφορυλίωση του παράγοντα EGF και παράλληλα εμποδίζει την αποδόμησή του (Straight et al 1993). Η E5 των HPV μπορεί να εκφραστεί κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του κύκλου ζωής του ιού στα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Στα πλαίσια ολόκληρου του γονιδιώματος του HPV-31, η E5 μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης του παράγοντα EGF στα διαφοροποιημένα αλλά και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Επιπλέον, η απώλεια της E5 οδηγεί στην εξασθένιση της ενεργοποίησης των όψιμων ικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της σε αυτή την κατηγορία κυττάρων (Flores E.R et al 2000). Η E5 εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του αντιγόνου του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II (Howley P., Lowy D. 2007).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Οι E6 πρωτεΐνες υψηλού και χαμηλού κινδύνου των τύπων HPV έχουν μέγεθος 150 αμινοξέα και περιέχουν 2 περιοχές δέσμευσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys.



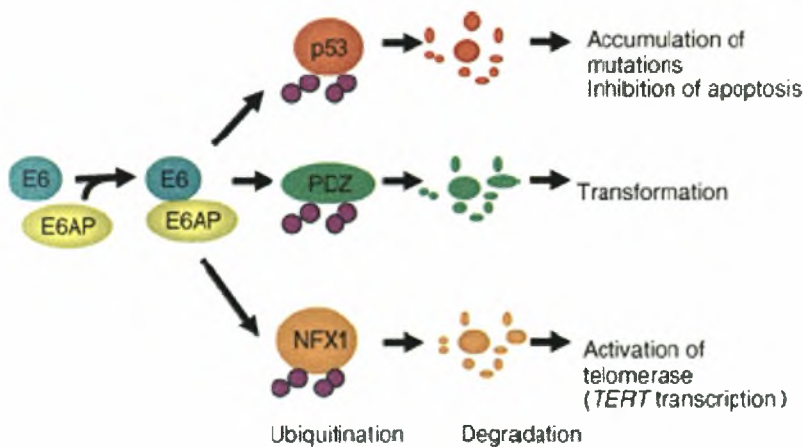
Εικόνα 4. Η πρωτεΐνη E6. Διακρίνονται οι δύο περιοχές δέσμευσης του ψευδαργύρου.

Οι πρωτεΐνες E6 των HPV υψηλού κινδύνου κατανέμονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και δεσμεύουν 12 διαφορετικές πρωτεΐνες (zur Hausen H. 2002). Η έκφραση της πρωτεΐνης E6 υψηλού κινδύνου οδηγεί στο μετασχηματισμό NIH3T3 κυττάρων και στην αθανатоποίηση ανθρώπινων μαστικών κυττάρων (Kiyono T. et al 1998, Liu L. et al 1999). Η αποτελεσματική αθανатоποίηση των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών (Hawley-Nelson, P., K. et al 1989).

Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την p53. Η p53 είναι καταστολέας όγκων και ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης, p21. Σε περίπτωση βλάβης του DNA, ενεργοποιείται η p53 και προκαλεί την έκφραση της p21 σε υψηλά επίπεδα, με συνέπεια την παύση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Ko L. and Prives C. 1996). Η E6 δεσμεύεται με την p53 και την ουβικιτινική λιγάση και σχηματίζει το τριαδικό σύμπλοκο που ονομάζεται E6AP (Hubregtse J.M. et al 1993). Το σύμπλοκο που δημιουργείται οδηγεί στην ουβικιτινίωση της p53 και τελικά στην αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα 26S, επομένως ο χρόνος ημιζωής της p53 μειώνεται από αρκετές ώρες σε λιγότερο από 20 λεπτά στα κερατινοκύτταρα (Hubbert N.L. et al 1992, Hubregtse J.M. et al 1993). Η E6 μπορεί επίσης έμμεσα να ρυθμίσει αρνητικά τη δραστηριότητα της p53 μέσω της σύνδεσης με την p300/CBP, που είναι συνεργοποιητής με την p53 (Lechner M.S and Laimins L.A. 1994. Zimmermann H. et al 1999). Δεδομένου ότι η p53 ρυθμίζει τα σημεία του κυτταρικού ελέγχου G1/S και G2/M προκαλώντας την κατάργηση αυτών των ελέγχων, οδηγεί σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και διπλασιασμούς στο κύτταρο (Foster S.A. et al 1994, Kesis T.D et al 1993, Tompson D.A. et al 1997). Μια εναλλακτική μορφή της E6 που ονομάζεται E6*, αλληλεπιδρά με τις E6 και E6AP. Η E6* λειτουργεί ώστε να εμποδιστεί η αποικοδόμηση της p53 (Bedel M.A. et al 1989).

Μια άλλη σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών PDZ. Οι πρωτεΐνες PDZ διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή που συνδέεται με τις PSD, Dlg και ZO-1 πρωτεΐνες (Craves S. Et al 1998, Gamper S.N. 1996). Η σύνδεση των PDZ γίνεται μέσω του C-τελικού άκρου και την E6 του τύπου HPV υψηλού κινδύνου και οδηγεί στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης PDZ (Kiyono T. et al 1998, Lee S.S et al 2000, Lee S.S et al 1997). Η αποικοδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη της επιδερμικής υπερπλασίας σε ποντίκια.

Μια άλλη λειτουργία των πρωτεϊνών υψηλού κινδύνου E6 που είναι σημαντική για την αθανατοποίηση κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Kligelhutz A. Et al 1996, Meyerson M.C et al 1997, Nakamura T.M et al 1997). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από 4 υπομονάδες και προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων. Η E6 εμφανίζεται να ενεργοποιεί την μεταγραφή της hTERT μέσω συνδυαστικής δράσης με τους παράγοντες Myc και Sp1. Η εκτεταμένη ενεργοποίηση της τελομεράσης οδηγεί στη διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση με συνέπεια την αναστολή της γήρανσης των κυττάρων (Liu J.P. 1999).



Εικόνα 5. Παρουσιάζονται σχηματικά οι λειτουργίες της E6.

2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη των HPV είναι η E7 που είναι σημαντική για την αθανατοποίηση των κυττάρων και για την παθογένεια του ιού. Οι E7 πρωτεΐνες των

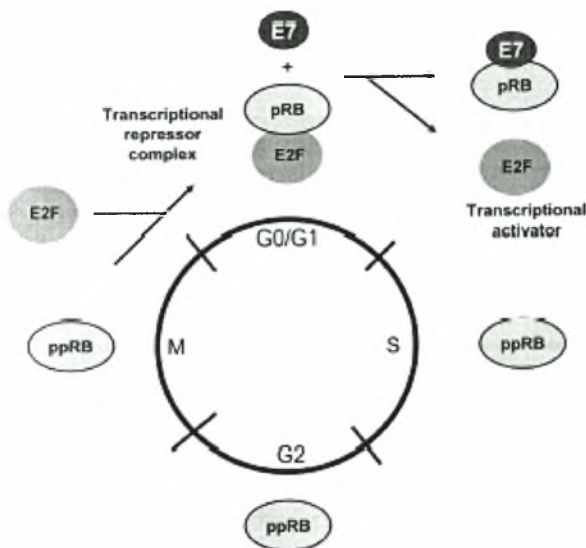
τύπων υψηλού και χαμηλού κινδύνου βρίσκονται κυρίως στον πυρήνα και έχουν μέγεθος περίπου 100 αμινοξέα. Η έκφραση μόνο της E7 μπορεί να αθανατοποιήσει NIH 3T3 κύτταρα ποντικών ενώ σε χαμηλή συχνότητα δημιουργεί αθανατοποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, αν και η απόδοση της αθανατοποίησης αυτής είναι μεγαλύτερη όταν συμβάλλει και η έκφραση της E6 πρωτεΐνης υψηλού κινδύνου (Munger K. et al 1989, Riley R.R. et al 2003).

Κεντρικός ρόλος της E7 πρωτεΐνης είναι η σύνδεσή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Dyson N. et al 1989). Η σύνδεση της Rb γίνεται μέσω της μιας από τις 3 συντηρημένες περιοχές της E7 πρωτεΐνης υψηλού κινδύνου. Οι περιοχές αυτές είναι η CR1, η CR2 και η CR3. Η περιοχή CR1 περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, η CR2 περιέχει το μοτίβο LXCXE, που συμβάλλει στη σύνδεση E7- Rb και η περιοχή CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (Phelps W.C. et al 1988).



Εικόνα 6. Η πρωτεΐνη E7, διακρίνονται οι 3 περιοχές που περιλαμβάνει.

Η οικογένεια Rb περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Rb, p107 και p130 (Berezutskaya E. et al 1997, Classon M. and Dyson N. 2001, Dyson N. et al 1989). Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων που προωθούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S καθώς επίσης και την απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S, η Rb αποφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα E2F/DP1 και την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Η πρόσδεση της E7 στην Rb, έχει σαν αποτέλεσμα τον διαχωρισμό της από το σύμπλοκο E2F/DP1- Rb, με συνέπεια την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου άρα και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (Edmonds C. and Vousden K.H. 1989). Η E7 με την σύνδεσή της στην Rb, οδηγεί στην αποικοδόμησή της μέσω ουβικιτινίωσης και λύσης από το πρωτεάσωμα.



Εικόνα 7. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τη E7.

Η E7 εκτός από τη σύνδεση με την οικογένεια του ρετινοβλαστώματος, συνδέεται με τις κυκλίνες A και E και με τους αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27. Οι πρωτεΐνες E7 υψηλού κινδύνου μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα των κυκλινών A και E ενώ οι πρωτεΐνες E7 χαμηλού κινδύνου δεν έχουν τέτοια επίδραση. Επιπλέον, η E7 εμποδίζει τη δράση των αναστολέων p21 και p27 και επομένως η Rb φωσφορυλιώνεται και ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται (Martin L.G. et al 1998).

Οι απακετυλάσες των ιστονών (HDCAs) αποτελούν την τρίτη κατηγορία πρωτεϊνών που συνδέονται με την E7. Οι HDCAs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και αφαιρούν τις ακετυλικές ομάδες από τις πλούσιες σε λυσίνες N-τελικές ουρές των ιστονών που αποτελούν το νουκλεόσωμα. Οι πρωτεΐνες E7 δεσμεύουν τις HDCAs και μπορούν να δημιουργήσουν αθάνατα κύτταρα. Η σύνδεση αυτή βοηθά στη συντήρηση της επισωμικής μορφής του ιού και έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην απώλεια της λειτουργίας τους (Marks P. et al 2001).

Ο πίνακας 3 περιλαμβάνει το σύνολο των πρωτεϊνών των HPV καθώς και τις λειτουργίες τους.

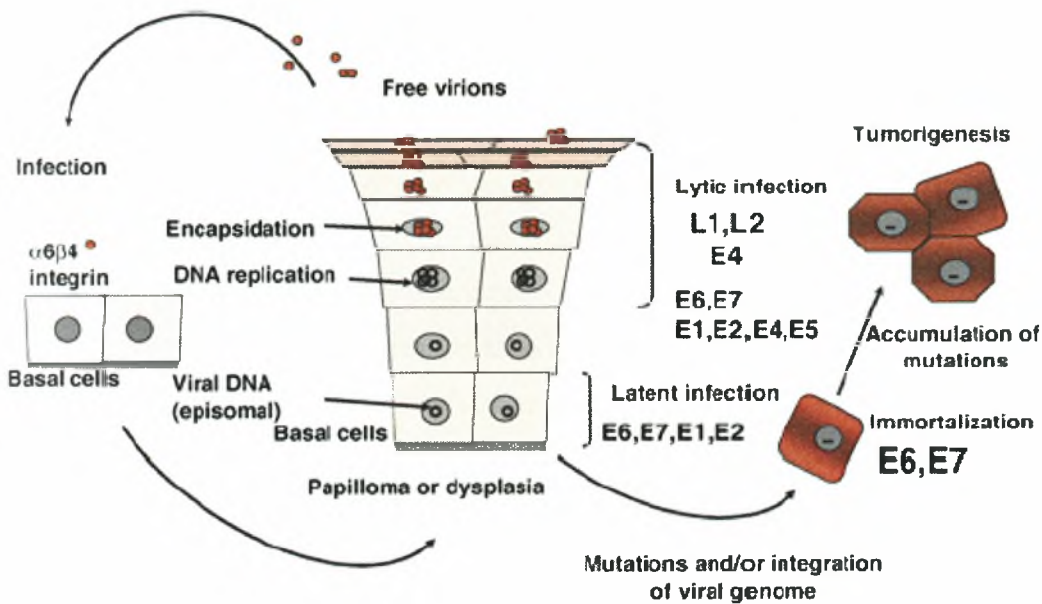
Πρωτεΐνες	Λειτουργίες
E1	Δραστικότητα 3'-5' ελικάσης και ΑΤΡάσης. Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες της E1 στην αφετηρία έναρξης της αντιγραφής. Υπάρχει σε δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός καταστολέας.
E3	Άγνωστη λειτουργία
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Συμβάλλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2.
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποικοδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της Rb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA

Πίνακας 3. Σύνοψη όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

3. Ο κύκλος ζωής των HPV

3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των ιών HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Η μόλυνση, από τους HPV, συμβαίνει μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου, εκθέτοντας τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας στον ιό.



Εικόνα 8. Μόλυνση της βασικής στοιβάδας από HPV.

Για την αποτελεσματική είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή απαιτείται η παρουσία της $\alpha 6$ ιντεγρίνης ως υποδοχέα (Yoon Cs et al 2001). Επίσης, ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων μέσω της δέσμευσής του με την θειϊκή ηπαρίνη. Η θειϊκή ηπαρίνη αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S et al 2003). Ο ιός μετά την σύνδεσή του στον υποδοχέα, εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης. Έπειτα, τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της L2 (Day P.M et al. 2004). Το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται υπό μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία

και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2, με μεγαλύτερη συχνότητα στη θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμη, έχουν δείξει ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις του γονιδίου E1 (Pulido H. et al., 2006).

3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Το γένωμα των HPV αντιγράφεται σε διαφορετικές περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, που χωρίζεται σε 3 φάσεις. Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, το γένωμα του HPV μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και παρατηρείται πολλαπλασιασμός του ιικού γενώματος που φτάνει 50-100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Στο σημείο αυτό το ιικό γένωμα παραμένει στον πυρήνα ως επίσωμα. Κατά τη δεύτερη φάση, το ιικό γένωμα πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μαζί με το κυτταρικό DNA στη φάση S, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και ο αριθμός των αντιγράφων του ιικού γενώματος, πιστεύεται ότι διατηρούνται σε ένα σταθερό επίπεδο στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό τη σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει στο εσωτερικό των νεοσχηματισμένων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R. et al 2006).

Τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται μετά από τη μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα οποία επάγουν την αντιγραφή του DNA. Η πρωτεΐνη E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας τη δράση των γονιδίων E6 και E7. Σε χαμηλά επίπεδα η E2 δρα σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής ενώ σε υψηλά επίπεδα καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7. Γενετικές αλλαγές, όπως η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη ή απενεργοποίηση της πρωτεΐνης E2) (Corden S. A. et al 1999, Pett M. R. et al 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξανόμενη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου και τελικά εμφάνιση καρκίνου.

3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

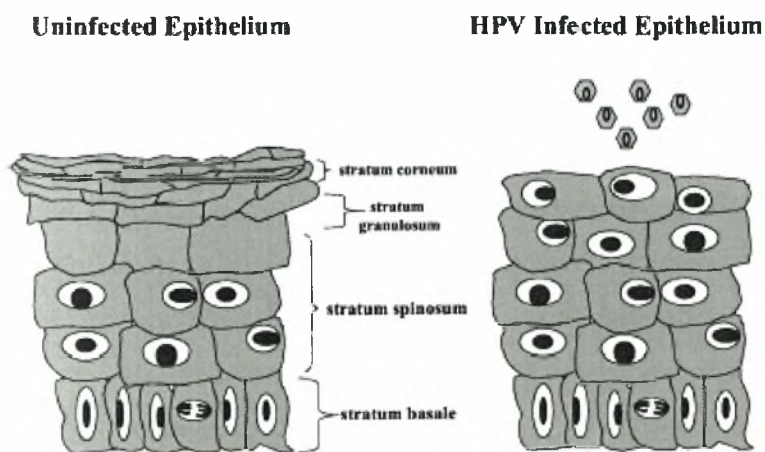
Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων των HPV εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση των γονιδίων του ιού κατά τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων δεν είναι πλήρως γνωστός (Zhi-Ming Zheng et al 2006). Έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) εκφράζονται στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα από την πρόωμη περιοχή του ιικού γενώματος. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται κάτω από τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p97 για τους HPV-16, HPV-31 και p105 για τον HPV-18. Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού ενεργοποιητή p670, ο οποίος εντοπίζεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων (Grassmann K et al. 1996).



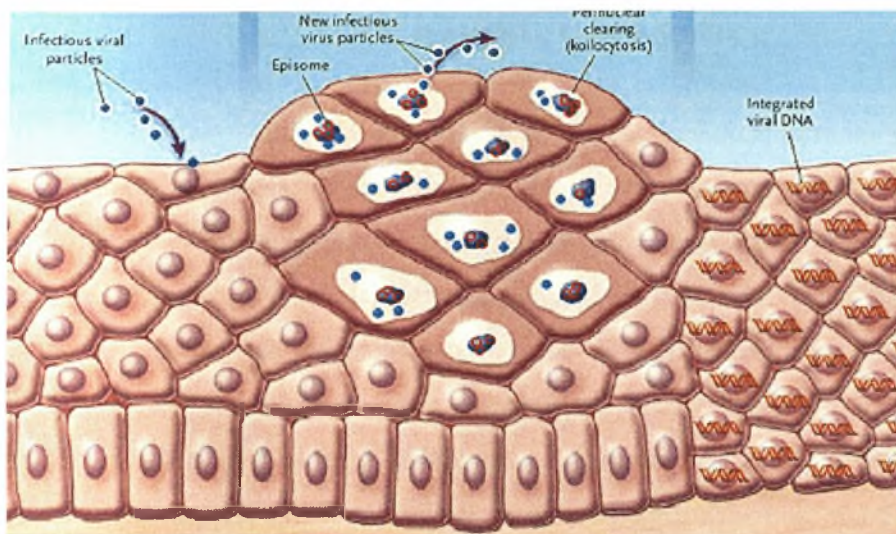
Εικόνα 9. Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97 (κόκκινο βέλος). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στην σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1, E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1, L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος). Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος).

3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής των HPV περιλαμβάνει το πακετάρισμα των αντιγράφων του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων ώστε να συναρμολογηθούν τα ιικά σωματίδια. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα απαιτεί εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 και την παρουσία της E2 (Day P.M. et al 1998), καθώς συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B. et al 2004). Τα ιικά σωματίδια παρατηρούνται στην κοκκώδη στοιβάδα του επιθηλίου. Η απελευθέρωση των ιικών σωματίων δεν συμβαίνει πριν τα στρώματα του κερατινοποιημένου επιθηλίου (Howley P.M. and Lowy D.R. 2007). Η ωρίμανση των ιικών σωματίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα κύτταρα ανέλθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια. Ο ιός HPV δεν είναι κυτταρολυτικός και σε αυτή τη διαδικασία ίσως εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^{E4}, η οποία αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια από το κύτταρο (Doorbar et al 2006).



Εικόνα 10. Απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιών HPV από μολυσμένο κύτταρο.



Εικόνα 11. Συνοπτική απεικόνιση του κύκλου ζωής του ιού.

3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A et al 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν και πολλοί άλλοι παράγοντες, όπως οι μεταλλάξεις και η συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών. Το κυτταρολογικό σύστημα Bethesda ταξινομεί τις ήπιες κυτταρολογικές αλλοιώσεις ως χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις των λεπιδωτών κυττάρων (LSIL). Οι περισσότερο σοβαρές ανωμαλίες ταξινομούνται ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις των λεπιδωτών κυττάρων (SIL), ενώ οι διαφορούμενες αλλοιώσεις ταξινομούνται ως (ASCUS) (Hoory et al 2008).

4. Κλινικές εκδηλώσεις

Η μόλυνση από HPV είναι η πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενη μόλυνση σε σεξουαλικά ενεργούς πληθυσμούς νέων στις αναπτυγμένες χώρες. Τριάντα εκατομμύρια νέες περιπτώσεις HPV μολύνσεων προκύπτουν κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο (De Schryver A. et al 1990). Στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει εκτιμηθεί ότι περίπου 20 εκατομμύρια είναι μολυσμένοι και το 50 % από αυτούς είναι μεταξύ 15-24 ετών. Επιπλέον, 6,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται ετησίως κυρίως σε άντρες και γυναίκες μεταξύ 15-44 ετών (Weinstock H. et al 2004, Gerberding JL. 2004). Επιπρόσθετα, το 75% του πληθυσμού αναπαραγωγικής ηλικίας προσβάλλεται από HPV σε κάποια φάση της ζωής του (Koutsky L. 2004). Μολύνσεις από ογκογονικούς τύπους HPV αντιπροσωπεύουν το 50-75 % όλων των HPV μολύνσεων (Cates W Jr. 1999). Μεγαλύτερα ποσοστά μολύνσεων εμφανίζονται σε νεαρές γυναίκες, κυρίως από χώρες της Αφρικής ή από Ισπανόφωνες περιοχές. Ακόμη, γυναίκες με μεγάλο αριθμό σεξουαλικών συντρόφων, γυναίκες με ιστορικό μόλυνσης από ερπητοϊούς στα γεννητικά όργανα έχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από HPV (Ho GY. et al 1998, Moscicki A.B. et al 2001, Giuliano A.R. et al 2002, Winer R.L. et al 2003, Sellors J.W. et al 2003).

4.1 Τρόποι μετάδοσης των HPV

Η μετάδοση του ιού γίνεται μέσω δερματικής επαφής. Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας. Υπάρχουν 3 τρόποι μετάδοσης του ιού:

- (α) Η σεξουαλική επαφή
- (β) Μετάδοση από τη μητέρα στο νεογέννητο
- (γ) Χωρίς σεξουαλική επαφή(επαφή με ουρογεννητικά εκκρίματα) (Fraisier 1994).

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Κλινικά δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονται από τραχηλικά επιχρίσματα που συλλέχθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα αυτά έχουν ταυτοποιηθεί ως HPV-16 από προηγούμενη μελέτη με τη μέθοδο NMPCR. Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων καθώς και η κλινική εικόνα των ασθενών.

Δείγματα	Κλινική εικόνα
A3	HG(CIN III in situ)
A4	HG(CIN III)
A6	HG(CIN III in situ)
A13	HG(CIN III in situ)
A15	HG(CIN III in situ)
A17	LG(CIN I)
A24	LG(CIN I)
A31	HG
A38	HG

Πίνακας 4. Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων.

5.2 Προετοιμασία DNA

Η απομόνωση του DNA από τα κλινικά δείγματα έγινε με την βοήθεια της πρωτεΐνωσης K και τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθηθήκαν αναφέρονται παρακάτω:

- 1) Απομάκρυνση των κυττάρων από την καλυπτρίδα με ένα αποστειρωμένο tip μέσα σε ένα σωληνάριο Eppendorf.
- 2) Προσθήκη 0,5-1,5 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και vortex.

- 3) Φυγοκέντρηση των tubes στις 13.000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 4) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με ένα 1 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA), vortex.
- 5) Επώαση στους 4°C για 1 ώρα.
- 6) Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min.
- 7) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με 50 μl buffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,3 , 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Tween 20).
- 8) Προσθήκη 1μl πρωτεΐνάση K (20μg/μl).
- 9) Επώαση στους 55°C για 60 min και βρασμός για 10 min για την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K.
- 10) Φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 5 min.
- 11) Συλλογή του υπερκείμενου.

Στη συνέχεια ακολούθησε μια δεύτερη εκχύλιση με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I. et al, 1996. Η δεύτερη εκχύλιση γίνεται για να ενισχυθεί η ποιότητα του εκχυλισμένου DNA και για να απομακρυνθούν οι επιπλέον ιστοί και πρωτεΐνες που τυχόν έχουν παραμείνει από την πρώτη διαδικασία . Η απομόνωση του DNA με τη μέθοδο θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) περιλαμβάνει τα εξής βήματα: Από κάθε κολπικό επίχρισμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μl τα οποία αναμίχθηκαν καλά με γλυκογόνο 10μg/tube και lysis Buffer 300μl (GuSCN 4M, N-lauroyl sacrosine 0,5%, Dithiotreitol 1mM, sodium citrate 25 mM) και επωάστηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), καλή ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 20 min στους +4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 ref στους +4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης. Έπειτα ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 ref στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχυλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH₂O

(RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA σε όλα τα κλινικά δείγματα και για τον έλεγχο αναστολέων της PCR πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης, ενός ‘housekeeping’ γονιδίου. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια GH20 (5’-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3’) και PC04 (5’-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3’).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl. Το μείγμα περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων (PC04/GH20) συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
PC04 και GH20	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 94°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40°C για 30sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min
	} 40 κύκλους

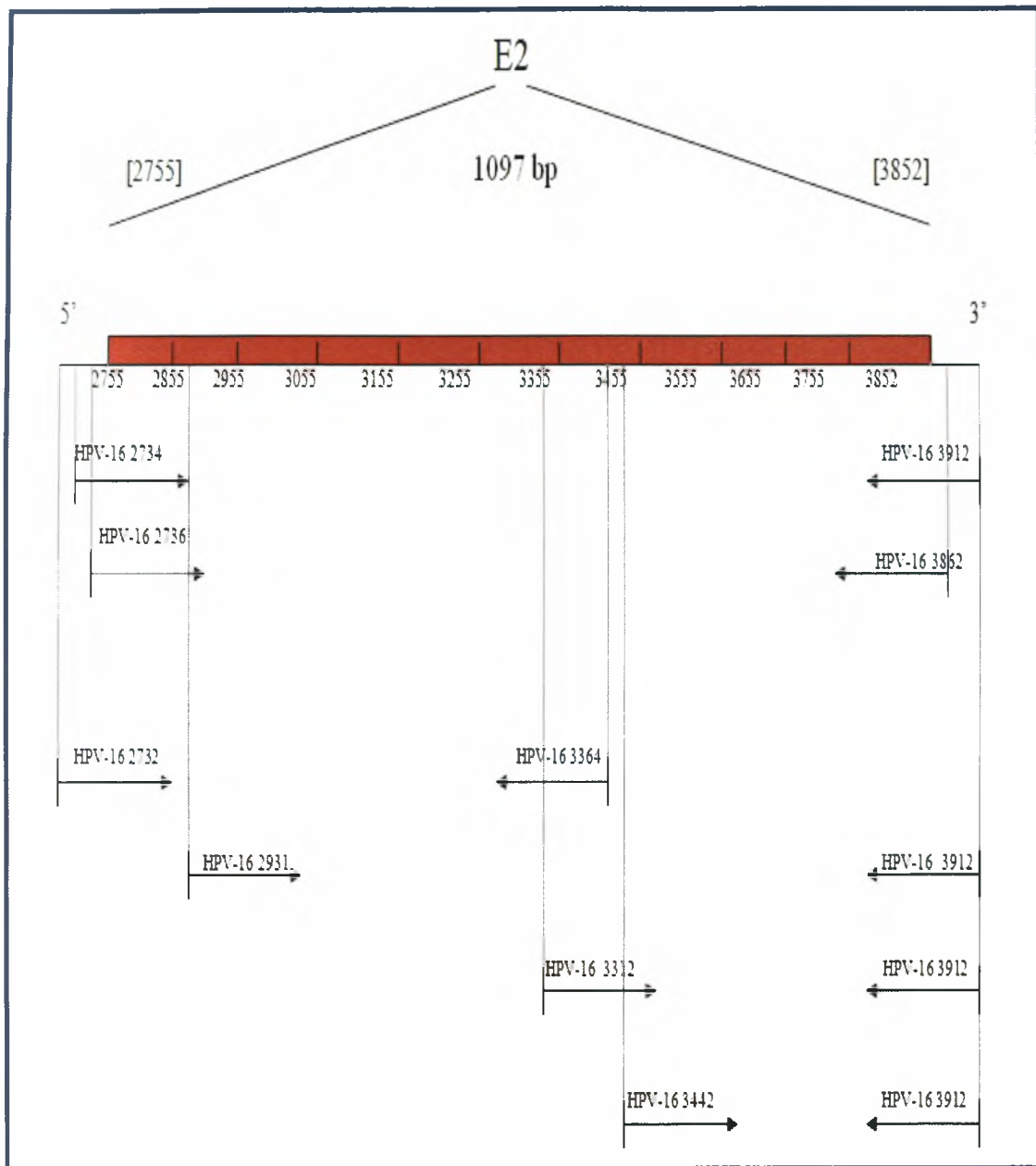
Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Η PCR που πραγματοποιήθηκε περιέχει έναν θετικό μάρτυρα, DNA κυτάρων απομονωμένο από κυτταροκαλλιέργειες MRC5 και Rd. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.4 PCR με εκκινητικά μόρια που ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο E2 και τα επιμέρους τμήματα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν έξι ζευγάρια εκκινητών με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV-16 η οποία είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων Gene Bank. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3. Τα δύο από τα έξι ζεύγη εκκινητών ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο της E2. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών είναι το HPV-16/2734-3912 και ενισχύει ένα τμήμα της τάξης 1176bp. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών είναι το HPV-16/2736-3862 και ενισχύει τμήμα της τάξης 1162bp. Τα υπόλοιπα τέσσερα ζεύγη εκκινητών ενισχύουν εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου E2. Το ζεύγος HPV-16/ 2732-3364 ενισχύει τμήμα μεγέθους 632bp, το ζεύγος HPV-16/2931-3912 ενισχύει τμήμα μεγέθους 980 bp, το ζεύγος HPV-16/3312-3912 ενισχύει τμήμα μεγέθους 598bp και το τελευταίο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι το HPV-16/3442-3912 και ενισχύει τμήμα μεγέθους 468bp. Η κωδικοποίηση των εκκινητών έγινε με βάση την θέση υβριδισμού τους στο ικό γονιδίωμα. Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 5 μαζί με τις αλληλουχίες τους και το μήκος του προϊόντος της περιοχής του γονιδίου E2 που ενισχύουν.

Εκκινητές	Πολικότητα	Αλληλουχία	Μήκος προϊόντος PCR
2734	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1176bp
3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
2736	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1162bp
3862	Antisense	GCAAAAAGCACGCCAGTAAT	
2732	Sense	GAGGACGAGGACAAGKAAAA	632bp
3364	Antisense	CGTTGCTGCTAAACACAGATG	
2931	Sense	CCAACACTGGCTGTATCAAAGA	980bp
3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
3312	Sense	ATGCGGGTGGTCAGGTAAT	598bp
3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
3442	Sense	CACCGAAGAAACACAGACGA	468bp
3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	

Πίνακας 5. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.



Εικόνα 12. Απεικονίζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν στη παρούσα ερευνητική μελέτη καθώς και οι περιοχές του γονιδίου E2 του HPV-16 στις οποίες συνδέονται.

5.5 PCR

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E2 του ιού, ολόκληρου ή των επιμέρους τμημάτων του με τα ζεύγη των εκκινητών HPV-16/2743-3912, HPV-16/2736-3862, HPV-16/2732-3364, HPV-16/2931-3912, HPV-16/3312-3912 και HPV-16/3442-3912. Η αντίδραση της PCR και με τα έξι ζεύγη εκκινητών πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στους πίνακες κατωτέρω.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
2734-3912 και 2736-3862	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56°C για 10sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40 sec
	40 κύκλους

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
2732-3364, 2931-3912 3312-3912 και 3442-3912	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56°C για 10sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30 sec
	40 κύκλους

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.6 Autonested PCR

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε Autonested PCR για την ενίσχυση του σήματος, καθώς επρόκειτο να κλωνοποιηθούν. Η αντίδραση της Autonested PCR πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα περιείχε: 2 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της Autonested PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στους πίνακες.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
2734-3912 και 2736-3862	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56°C για 10sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40 sec
	25 κύκλους

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
2732-3364, 2931-3912 3312-3912 και 3442-3912	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56°C για 10sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30 sec
	25 κύκλους

Η Autonested PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Autonested PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Autonested PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν Autonested PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 140V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne) με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK). Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το προϊόν QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

6. Κλωνοποίηση

Τα προϊόντα της PCR από τα αλληλεπικαλυπτόμενα ζεύγη HPV-16/3312-3912 και HPV-16/2732-3364 (τα οποία συμβάλλουν στην ενίσχυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου E2) καθώς και τα προϊόντα της PCR από το ζεύγος HPV-16/2743-3912 υποβλήθηκαν σε κλωνοποίηση για να διαχωριστούν τα διαφορετικά στελέχη HPV-16, με σκοπό να αλληλουχηθούν για τον εντοπισμό μεταλλάξεων και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

6.1 Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR

Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της κλωνοποίησης είναι η διεξαγωγή Autonested PCR με την βοήθεια του ενζύμου GoTaq Flexi Πολυμεράση. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στα προϊόντα των autonested PCR με τα εκκινητικά μόρια HPV-16/3312-3912, HPV-16/2732-3364 και HPV-16/2743-3912. Η ενίσχυση των PCR προϊόντων με το ένζυμο αυτό διεξάγεται με στόχο την προσθήκη poly(A) μονόκλωνων άκρων στο 3' και 5' άκρο των ενισχυμένων

αλληλουχιών. Τα μονόκλωνα άκρα που προκύπτουν είναι συμπληρωματικά με την πολυδύναμη θέση ένθεσης του πλασμιδιακού φορέα.

Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 μl προϊόντος της autonested PCR, 2μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 10μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος (Colorless Go Taq Flexi Buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM), 0,25μl GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (1,25u/tube, 5u/μl, Promega, USA), 4μl MgCl₂ solution 25mM και ddH₂O ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA) μέχρι τελικό όγκο 50μl. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα κατωτέρω.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
2734-3912,2732-3364 και 3312-3912	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56°C για 30sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min
	} 25 κύκλους

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα.

Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση των ενισχυμένων προϊόντων από το πήκτωμα. Για την διαδικασία αυτή ηλεκτροφορήθηκαν περίπου 50μl από τα προϊόντα κάθε δείγματος ενώ οι αντίστοιχες ζώνες τους απομακρύνθηκαν από το πήκτωμα και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 1,5ml. Στην συνέχεια η διαδικασία της απομάκρυνσης της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

6.2 Αντίδραση λιγάσης

Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την αντίδραση λιγάσης, στην οποία χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA). Τα προϊόντα της Autonested GoTaq PCR διαθέτουν πλέον πολύ-(A) άκρα τα

οποία ενώνονται με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά πολύ-(T) άκρα του φορέα. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 1μl pGEM®-T Easy Vector 50ng, 3μl προϊόν autonested GoTaq PCR, 1μl T4 DNA Ligase (3u/μl) και 5μl 2x Rapid Ligation Buffer σε τελικό όγκο 10μl.

6.3 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων

Το τρίτο βήμα είναι η παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂). Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5a. Από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) ακολουθώντας επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, 1ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD600 και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M (0,55g CaCl₂, Sigma, USA, διαλύονται σε ddH₂O μέχρι όγκο 50ml).

6.4 Μετασηματισμός

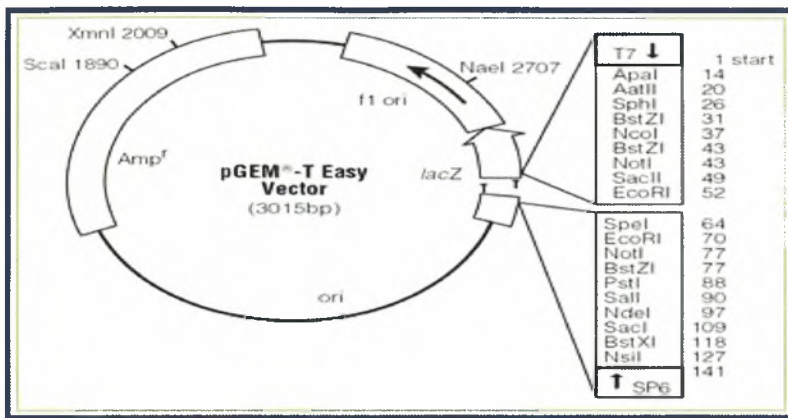
Το επόμενο βήμα στην κλωνοποίηση είναι ο μετασηματισμός των δεκτικών κυττάρων. Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200μl από τα δεκτικά κύτταρα σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes). Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στο

αντίστοιχο μικροσωληνάριο και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν τα μικροσωληνάρια στον πάγο για 30min. Έπειτα τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90sec ακριβώς και ακολούθως μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2min (heat shock). Στη συνέχεια, 200μl των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκαν σε falcon με 800μl LB Broth και επώστηκαν στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων – «επούλωση»). Εν συνεχεία, 300μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιείχε LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Agar (6,6mg/ml) και προστέθηκαν 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA), ενώ ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Ωστόσο όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι άσπρες διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται. Έτσι έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα δύο από κάθε τριβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Τέλος, ακολούθησε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.

6.5 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης

Το τελικό βήμα της κλωνοποίησης είναι η πέψη των προϊόντων της κλωνοποίησης με EcoRI. Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl 10x H Buffer, 1μl Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15μl ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 37°C

για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23μl που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων έγινε μέσω της ύπαρξης της χαρακτηριστικής μπάντας των bp με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).



Εικόνα 13. Ο φορέας κλωνοποίησης της pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. Από www.promega.com.

7. Επεξεργασία αποτελεσμάτων με προγράμματα βιοπληροφορικής

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Πιο συγκεκριμένα οι αλληλουχίες που καταφέραμε να απομονώσουμε συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες στην βάση δεδομένων (GeneBank) με την βοήθεια του προγράμματος BLAST. Ενώ η επεξεργασία των αλληλουχιών, η εύρεση μεταλλάξεων και η κατασκευή φυλλογενετικών δέντρων έγινε με την βοήθεια των προγραμμάτων Chromas, GeneRunner και Mega.

8. Αποτελέσματα

8.1 Αποτελέσματα Autonested PCR

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε Autonested PCR με όλα τα ζεύγη των εκκινητών. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα ζεύγη των εξωτερικών εκκινητών και τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε η επιθυμητή περιοχή.

Εκκινητές	Δείγματα
2734-3912 1176bp	A17, A24 και A38
2736-3862 1162bp	

Πίνακας 6. Δείγματα και ζεύγη εκκινητών με τους οποίους ενισχύθηκαν

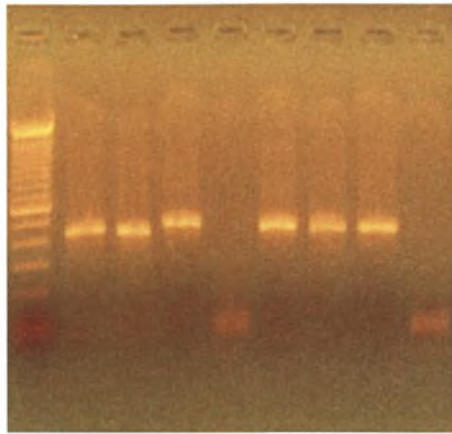
Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα ζεύγη των εσωτερικών εκκινητών και τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε η επιθυμητή περιοχή.

Εκκινητές	Δείγματα
2732-3364 632 bp	A3,A4,A6,A13,A15,A17,A24,A31,A38
3312-3912 598 bp	A3,A4,A6,A13,A15,A17,A24,A31,A38
3442-3912 468 bp	A3,A4,A6,A13,A15,A17,A24,A31,A38
2931-3912 980 bp	A13,A15,A17, A24,A38

Πίνακας 7. Δείγματα και ζεύγη εκκινητών με τους οποίους ενισχύθηκαν

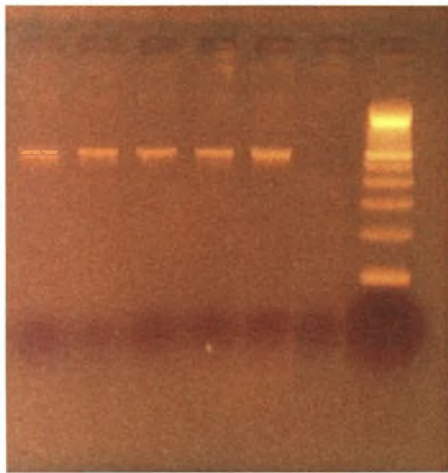
Ενδεικτικά παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες θετικών αποτελεσμάτων.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



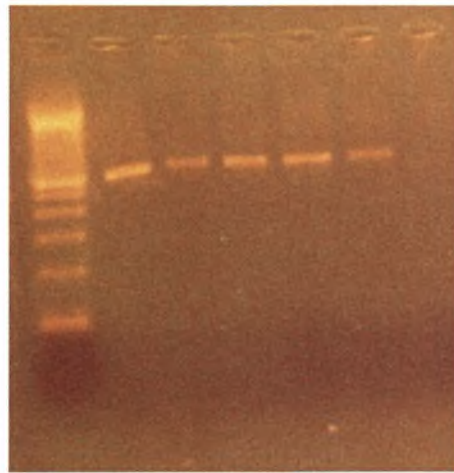
Εικόνα 14.PCR με εκκινητές 3442-3912.

1 2 3 4 5 6 M



Εικόνα 15.PCR με εκκινητές 3312-3912.

M 1 2 3 4 5 6



Εικόνα 16.PCR με εκκινητές 2732-3364.

Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται Autonested PCR με τα εκκινητικά μόρια HPV-16/3442-3912. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους και στις διαδρομές 4 και 8 υπάρχει αρνητικός μάρτυρας (απεσταγμένο-αποστερωμένο H₂O (ddH₂O)). Στις διαδρομές 1, 2, 3, 5, 6 και 7 ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα A3, A4, A6, A13, A15 και A17 αντίστοιχα, και παρατηρούμε προϊόντα όλων των δειγμάτων μήκους 468bp.

Στις εικόνες 15 και 16 παρουσιάζονται Autonested PCR με τα εκκινητικά μόρια HPV-16/3312-3912 και HPV-16/2732-3364 αντίστοιχα. Στις διαδρομές 1, 2, 3, 4 και 5 ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα A3, A4, A6, A13 και A15 αντίστοιχα ενώ στη διαδρομή 6 υπάρχει αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O). Παρατηρούμε πως ενισχύθηκαν όλα τα δείγματα και με τα δύο ζεύγη εκκινητών με προϊόντα της τάξης 598bp στην εικόνα 15 και 632bp στην εικόνα 16.

Το δείγμα A17 ενισχύθηκε με όλα τα ζεύγη εκκινητών αλλά εκκρεμεί η κλωνοποίηση και η αλληλούχησή του, συνεπώς δεν έχουμε αποτελέσματα και δεν συμπεριλαμβάνεται στους πίνακες.

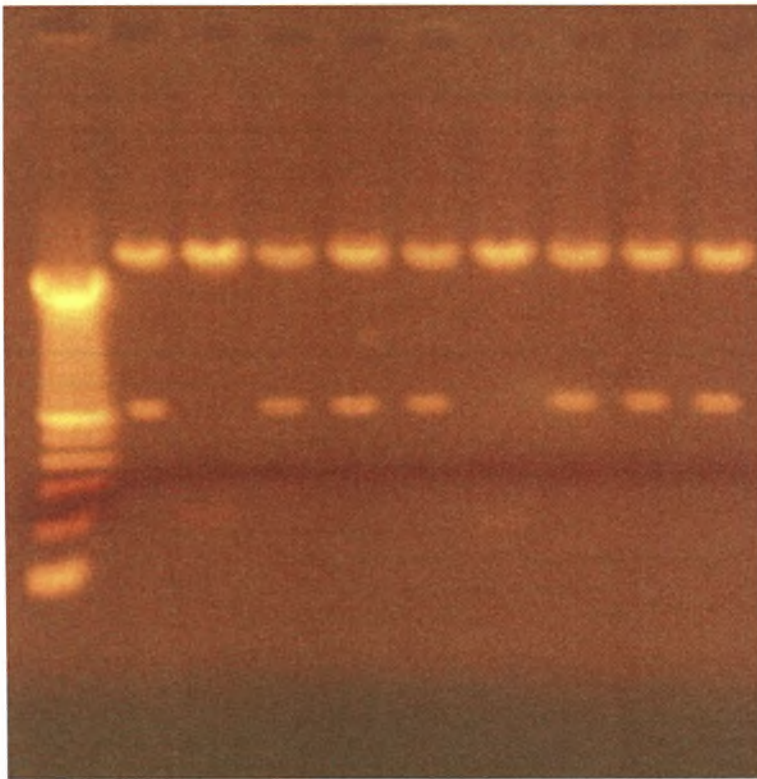
Από τα ζεύγη εσωτερικών εκκινητών κλωνοποιήσαμε μόνο τα ζευγάρια HPV-16/2732-3364 και HPV-16/3312-3912, που δίνουν προϊόντα 632bp και 598bp αντίστοιχα, ώστε να πάρουμε ολόκληρη την περιοχή E2 από τα αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Επιπλέον κλωνοποιήσαμε τα δείγματα A24 και A38 που έδωσαν ολόκληρη την αλληλουχία E2 με τη βοήθεια των εξωτερικών εκκινητών HPV-16/2734-3912.

8.2 Αποτελέσματα κλωνοποίησης

8.2.1 RFLP με EcoRI

Ενδεικτικά παρουσιάζεται μια εικόνα πένης με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, όπου κάθε δείγμα αντιπροσωπεύεται από δύο κλώνους. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στις διαδρομές 1 έως 9 βρίσκονται οι κλώνοι A3C1, A3C2, A4C1, A4C2, A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A15C1. Η 1^η ζώνη των 632 bp αντιστοιχεί στο γονιαδιακό προϊόν της E2 γενωμικής περιοχής που ανιχνεύεται, ενώ η 2^η ζώνη άνω των 2070 bp αντιστοιχεί στο πλασμίδιο.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

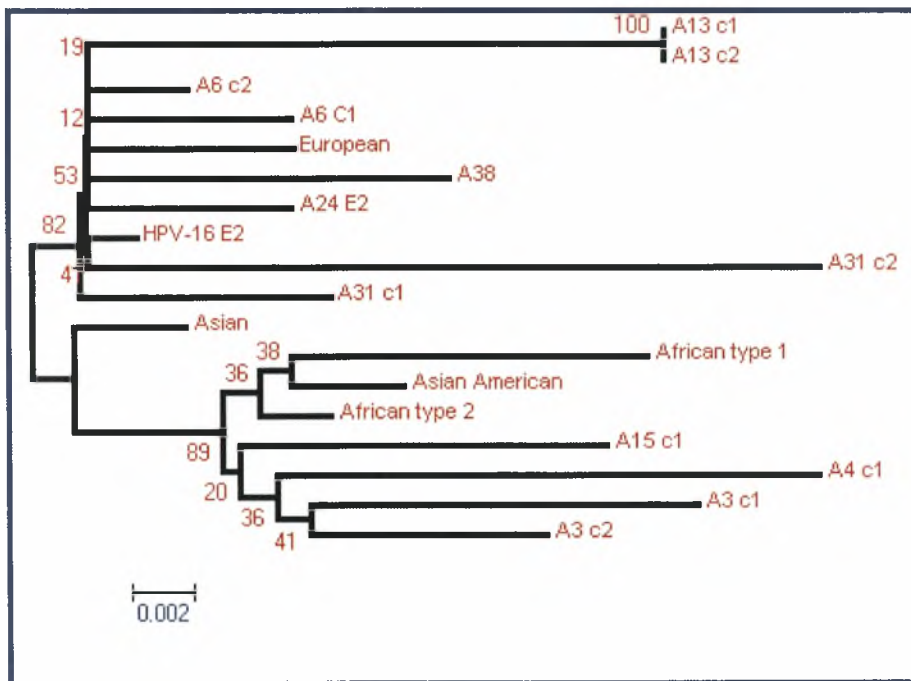


Εικόνα 17. Πένη του πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoRI με εκκινητές HPV-16/2732-3364.

8.3 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των κλινικών δειγμάτων

Οι αλληλουχίες των κλινικών δειγμάτων συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του E2 γονιδίου του πρότυπου στελέχους HPV-16 αλλά και με τις αλληλουχίες των άλλων variants HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (AF1), African type-2 (AF2)] και σχεδιάστηκαν τα εξής φυλογενετικά δένδρα με τη βοήθεια του προγράμματος Mega. Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη προκαλούν σε μεγαλύτερη συχνότητα δυσπλασίες, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

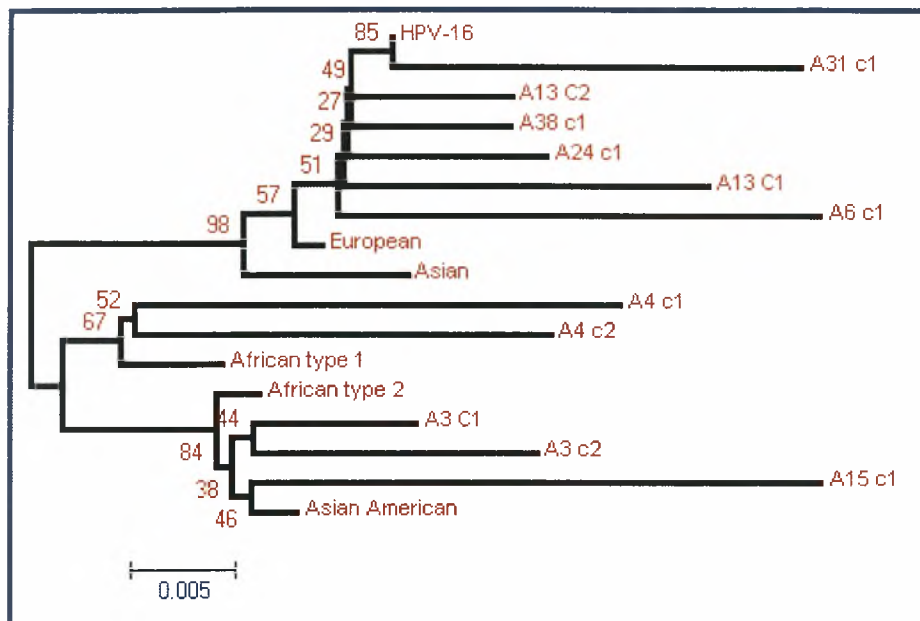
A. Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A3C1, A3C2, A4C1, A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A15C1, A31C1, A31C2, A24C1, A38C1 και των υπολοίπων variants HPV-16 για την περιοχή μήκους 632bp του E2 γονιδίου.



Εικόνα 18. Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A3C1, A3C2, A4C1, A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A15C1, A31C1, A31C2, A24C1, A38C1 και των υπολοίπων variants HPV-16 για την περιοχή μήκους 632bp του E2 γονιδίου.

Από το φυλογενετικό δένδρο παρατηρούμε πως οι κλώνοι A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A24C1, A31C1, A31C2 και A38C1 ομαδοποιούνται με το European variant ενώ οι κλώνοι A3C1, A3C2, A4C1 και A15C1 ομαδοποιούνται με το African type-2 (AF2) variant.

B. Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A3C1, A3C2, A4C1, A4C2, A6C1, A13C1, A13C2, A15C1, A31C1, A24C1, A38C1 και των υπολοίπων variants HPV-16 για την περιοχή μήκους 598bp του E2 γονιδίου.



Εικόνα 19. Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A3C1, A3C2, A4C1, A4C2, A6C1, A13C1, A13C2, A15C1, A31C1, A24C1, A38C1 και των υπολοίπων variants HPV-16 για την περιοχή μήκους 598bp του E2 γονιδίου.

Από το φυλογενετικό δένδρο παρατηρούμε πως οι κλώνοι A6C1, A13C1, A13C2, A24C1, A31C1, A38C1 ομαδοποιούνται με το European variant, οι κλώνοι A4C1 και A4C2 με το African type-1 (AF1) variant, οι κλώνοι A3C1 και A3C2 ομαδοποιούνται με το African type-2 (AF2) variant, και ο κλώνος A15C1 ομαδοποιείται με το American-Asian (AA) variant.

Από τα παραπάνω φυλογενετικά δέντρα βλέπουμε ότι ο κλώνος A4C1 στην περιοχή 632bp ομαδοποιείται με το African type-2 (AF2) variant ενώ στην περιοχή 598bp ομαδοποιείται με το African type-1 (AF1) variant. Ακόμη ο κλώνος A15C1 στην περιοχή 632bp ομαδοποιείται με το African type-2 (AF2) variant ενώ στην περιοχή 598bp ομαδοποιείται με το American-Asian (AA) variant. Η διαφορετική ομαδοποίηση των κλώνων αυτών που προέρχονται από το ίδιο κλινικό δείγμα προφανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι τα τμήματα αυτά που ενισχύθηκαν με την αντίδραση της PCR προέρχονται από διαφορετικά HPV-16 variants. Επομένως,

μπορούμε να συμπεράνουμε ότι έχουμε ταυτόχρονη μόλυνση από περισσότερα από ένα HPV-16 variants.

8.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων A24 και A38, οι οποίες ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια HPV-16/2734-3912, καθώς και οι αλληλουχίες των δειγμάτων A3, A4, A6, A13, A15 και A31, οι οποίες ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια HPV-16/2732-3364 και HPV-16/3312-3912 κλωνοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής. Επίσης συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του E2 γονιδίου του πρότυπου στελέχους HPV-16. Επίσης το ίδιο έγινε και για τα variants African type 1, African type 2, Asian, Asian American και European.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αλλαγών των αμινοξέων που προκύπτουν σε κάθε δείγμα για την περιοχή E2.

Τα δείγματα στους πίνακες για την περιοχή 632bp έχουν χρωματιστεί ανάλογα με την ομαδοποίησή τους με τα variants στο φυλογενετικό δένδρο. Τα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1 και A15C1 ομαδοποιούνται με το African type-2 (AF2)] variant και χρωματίζονται με μωβ ενώ τα δείγματα A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A24C1, A31C1, A31C2 και A38C1 ομαδοποιούνται με το European variant και χρωματίζονται με κόκκινο.

Στο φυλογενετικό δένδρο για την περιοχή 598bp χρωματίστηκαν τα δείγματα στους πίνακες ως εξής: τα δείγματα A6C1, A13C1, A13C2, A24C1, A31C1, A38C1 ομαδοποιούνται με το European variant και χρωματίζονται με κόκκινο, τα δείγματα A4C1 και A4C2 με το African type-1 (AF1) variant και χρωματίζονται με μπλε, τα δείγματα A3C1, A3C2 ομαδοποιούνται με το African type-2 (AF2) variant και χρωματίζονται με μωβ και το δείγμα A15C1 ομαδοποιείται με το American-Asian (AA) variant και χρωματίζεται με πράσινο.

Νουκλεοτιδία ORF E2 του HPV-16														
	2793	2795	2797	2803	2805	2815	2822	2838	2840	2847	2852	2859	2864	2881
Πρότυπη αλληλουχία	C	A	A	A	A	A	G	C	A	C	G	C	G	T
δείγματα														
A3 C1		K14I										H35Q		Y43H
A3 C2								H29R				H35Q		
A4 C1												H35Q	R37H	
A6 C1								D28E						
A6 C2														
A13 C1			I15L				S23I			D31E				
A13 C2			I15L				S23I			D31E				
A15 C1	D13E											H35Q		
A31 C1											W33S			
A31 C2				T17S	T17S	N21Y								
A38 C1														
A24 C1														

Νουκλεοτιδία ORF E2 του HPV-16														
	2891	2908	2918	2924	2925	2927	2942	2944	2945	2965	2968	2976	2983	2995
Πρότυπη αλληλουχία	C	A	A	A	A	T	C	G	T	C	G	A	C	A
δείγματα														
A3 C1								V64E	V64E			E74D		
A3 C2												E74D	L77I	
A4 C1										Q71*		E74D		
A6 C1											A72S			
A6 C2														
A13 C1			N55S	Q57R	Q57R		A63V							T81A
A13 C2			N55S	Q57R	Q57R		A63V							T81A
A15 C1														
A31 C1													L77V	
A31 C2		K52*						V64L	V64L					
A38 C1	A46V					V58E								
A24 C1														

Νουκλεοτιδία ORF E2 του HPV-16														
	3025	3027	3037	3052	3067	3068	3071	3077	3084	3101	3103	3108	3130	3133
Πρότυπη αλληλουχία	A	G	C	G	G	C	C	G	T	C	G	A	T	A
δείγματα														
A3 C1				E100*										
A3 C2	K91N	K91N	Q95*											
A4 C1								I110K						
A6 C1														N127H
A6 C2								G108E						
A13 C1			Q95*							T116I				
A13 C2			Q95*							T116I				
A15 C1							P106L					E115D		
A31 C1	K91Q	K91Q												
A31 C2							P106Q						C126S	
A38 C1					A105V	A105V					V115L			
A24 C1					A105T	A105T								

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16														
	3148	3158	3160	3161	3163	3181	3185	3196	3205	3211	3220	3223	3233	3234
Πρότυπη αλληλουχία	A	C	C	A	T	G	C	G	C	G	G	T	A	T
Θέση														
A3 C1		T135K	H136Y	H136Y		A143K				D153N		L157I		
A3 C2		T135I	H136Y	H136Y		A143T						L157I		
A4 C1		T135K	H136Y	H136Y		A143T				G156R			V160D	V160D
A6 C1	T132A					A143T								
A6 C2														
A13 C1					H137L									
A13 C2					H137L									
A15 C1		T135R	H136F	H136F		A143T						L157I		
A31 C1														
A31 C2								V148I	Q151*					
A38 C1														
A24 C1							S144*							

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16									
	3235	3248	3260	3269	3273	3277	3304	3341	
Πρότυπη αλληλουχία	C	G	T	A	T	G	T	C	
Θέση									
A3 C1	H161Y	R165Q							
A3 C2		R165Q							
A4 C1		R165Q							
A6 C1									
A6 C2							W184R		
A13 C1						A175T			
A13 C2						A175T			
A15 C1		R165Q		K172R					
A31 C1									
A31 C2					D173E				
A38 C1			V169E						
A24 C1								P196H	

Πίνακας 8. Συγκριτικοί πίνακες αμινοξικών αλλαγών για την περιοχή E2 του τμήματος 632bp.

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16														
	3338	3361	3364	3376	3383	3391	3409	3412	3418	3419	3421	3424	3427	3442
Πρότυπη αλληλουχία	G	A	G	C	T	C	C	G	A	C	C	A	A	
Θέση														
A3 C1		N203D		P208A			P219S	A220T						
A3 C2		N203D		P208A			P219S	A220T						
A4 C1		N203D		P208A	I210T		P219S				H223Y	T224S		
A4 C2		N203D		P208A			P219S					T224S		
A6 C1	C195*		E204K				P219S							
A13 C1	C195Y						P219S		T222A	T222A				
A13 C2						Q213*	P219S							
A15 C1		N203D		P208A					T222I	T222I				
A31 C1													K225*	
A38 C1							P219S							
A24 C1							P219S							G230S

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16														
Πρότυπη αλληλουχία	3448	3454	3455	3461	3463	3467	3475	3501	3512	3515	3516	3520	3526	3535
Πρότυπη αλληλουχία	G	A	C	C	A	T	C	C	C	C	T	T	C	C
Δεγμάματα	Αλλαγή αμινοξέων													
A3 C1	E232K	T234I	T234I								T254N			
A3 C2	E232K								T253N	T254N	K255*			
A4 C1	E232K									T254N			H258Y	S261L
A4 C2	E232I	T234S	T234S							T254N				
A6 C1										T254N		L256M		
A13 C1	E232*													
A13 C2														
A15 C1	E232K			T236M	T237S		P241S	N249K		T254N				
A31 C1	E232G					L238N	P241T							
A38 C1														
A24 C1														

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16														
Πρότυπη αλληλουχία	3544	3548	3560	3565	3568	3584	3586	3594	3604	3613	3632	3649	3683	3694
Πρότυπη αλληλουχία	A	C	C	T	A	G	C	C	A	C	G	A	C	G
Δεγμάματα	Αλλαγή αμινοξέων													
A3 C1				F271V									T310K	
A3 C2	S264G	A265V		F271V				N280K					T310K	
A4 C1			T269N	F271V									T310K	
A4 C2				F271V		G277A	R278W						T310K	
A6 C1												K299Q		
A13 C1									N284D					A314T
A13 C2														
A15 C1				F271V							G293D		T310K	
A31 C1														
A38 C1					N272I					P278S				
A24 C1														

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16														
Πρότυπη αλληλουχία	3698	3722	3728	3734	3736	3740	3743	3745	3748	3751	3758	3759	3761	3768
Πρότυπη αλληλουχία	T	G	A	A	C	A	G	G	A	G	T	T	C	T
Δεγμάματα	Αλλαγή αμινοξέων													
A3 C1		G323V												
A3 C2														
A4 C1			N325I		H328Y		A331T		V333F					
A4 C2	V315A													
A6 C1				K327I										
A13 C1											L335H	L335H		
A13 C2													T336I	
A15 C1									I332F					D338E
A31 C1						K329T								
A38 C1							S330I							
A24 C1								A331T	I332L					

Νουκλεοτίδια ORF E2 του HPV-16												
	3770	3777	3786	3789	3801	3802	3803	3806	3814	3836		
Πρόταση αλληλουχία	G	G	C	A	A	G	T	A	A	G		
Δείγματα	Αλλαγή αμινοξέων											
A3 C1		W341C	D344E		Q349H							
A3 C2		W341C	D344E					K351I				
A4 C1	S339N	W341C	D344E			V350A	V350A					
A4 C2		W341C	D344E					K351I				
A6 C1				Q345H		V350F	V350F					
A13 C1		W341*										
A13 C2												
A15 C1		W341C	D344E					K354E				
A31 C1								R351R		G361E		
A38 C1	S339I											
A24 C1												

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικοί πίνακες αμινοξικών αλλαγών για την περιοχή E2 του τμήματος 598bp.

Ακολουθούν οι συγκεντρωτικοί πίνακες στους οποίους κατηγοριοποιούνται οι μεταλλάξεις, με τις αμινοξικές αλλαγές ανάλογα με την κλινική εικόνα.

Περιοχή E2 2732 -3364			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
ΟΛΟΙ ΟΙ ΚΛΩΝΟΙ	A2925G	Q57R(A13C1,A13C2)	HG
A3C1, A3C2, A4C1, A15C1	C2859A, C3160T, G3181A, G3248A	H35Q, H136Y/H136F(A15C1), A143T/A143K(A3C1), R165Q	HG
A3C1, A3C2, A4C1, A15C1	C3158A,C3158T, C3158A, C3158G	T135K, T135I, T135K, T135R	HG
A3C1, A3C2, A4C2	A2976T	E74D	HG
A3C1, A3C2, A15C1	T3223A	L157I	HG
A3C2,A13C1,A13C2	C3037T	Q95*	HG
A13C1,A13C2	A2792T,G2822T, C2847A,A2918G, A2924G,C2942T, A2995G,C3101T, A3163T,G3277A	I15L, S23I, D31E, N55S, Q57R, A63V, T81A, T116I, I137L, A175T	HG

Πίνακας 10. Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων και αμινοξικών αλλαγών για την περιοχή E2 του ενισχυμένου τμήματος 632bp ανάλογα με την κλινική εικόνα.

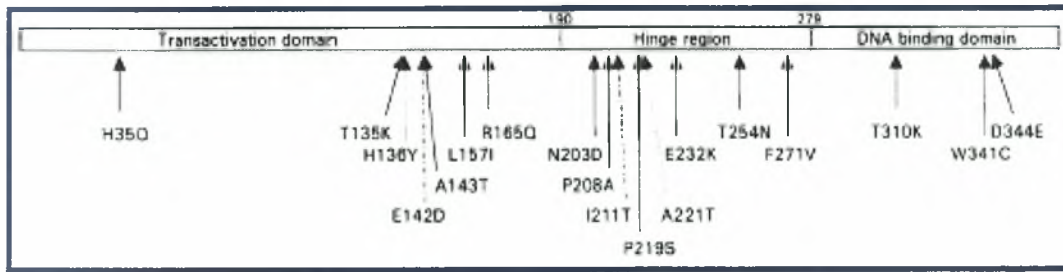
Η μετάλλαξη που παρατηρείται σε όλους τους κλώνους είναι στη θέση A2925G και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή Q57R αλλά μόνο στους κλώνους A13C1 και A13C2. Αξιοσημείωτη είναι η μετάλλαξη στη θέση C3037T που παρατηρήθηκε στους κλώνους A3C2, A13C1, A13C2 και το αποτέλεσμα της οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης. Επιπλέον παρατηρείται μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων καθώς και αμινοξικών αλλαγών στους κλώνους A13C1 και A13C2, που ομαδοποιούνται με το European variant και τα δείγματα είναι HG (CIN III). Τα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1, A15C1 (HG) που ομαδοποιούνται με το African type-2 (AF2) variant, παρουσιάζονται να έχουν κοινές μεταλλάξεις που προκαλούν αμινοξικές αλλαγές, όπου σε δύο από αυτές παρατηρείται διαφορετικό αμινοξύ. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη στη θέση C3160T προκαλεί την αμινοξική αλλαγή H136Y ενώ στο δείγμα A15C1 προκαλεί την H136F. Το ίδιο συμβαίνει και στη θέση 3158 όπου στα δείγματα A3C1 και A4C1 παρατηρείται η μετάλλαξη C3158A και η αμινοξική αλλαγή T135K, στο δείγμα A3C2 παρατηρείται η μετάλλαξη C3158T και η αμινοξική αλλαγή T135I ενώ στο δείγμα A15C1 παρατηρείται η μετάλλαξη C3158G και η αμινοξική αλλαγή T135R. Επίσης παρατηρείται στα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1 η κοινή μετάλλαξη στη θέση A2976T που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή E74D και στα δείγματα A3C1, A3C2, A15C1 παρατηρείται η κοινή μετάλλαξη στη θέση T3223A που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή L157I.

Περιοχή E2 3312-3912			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
ΟΛΟΙ ΟΙ ΚΛΩΝΟΙ εκτός A15, A31	C3409T	P219S	HG
A3C1, A3C2, A4C1, A4C2, A15C1	A3361G, C3376, C3515A, T3565G, C3683A, (T3693A), G3777T, C3786A	N203D, P208A, T254N, F271V, T310K, W341E, D344E	HG
A3C1, A3C2, A4C1	G3448A	E232K	HG
A4C2, A15C1, A31C1	G3448A	E232I, E232K, E232G	HG
A3C1, A3C2, A15C1	A3537, T3705C	Όχι μετάλλαξη	HG
A3C1, A3C2, A6C1, A15C1,	T3516C	Όχι μετάλλαξη	HG
A3C1, A3C2, A15C1	T3804G	Όχι μετάλλαξη	HG

Πίνακας 11. Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων και αμινοξικών αλλαγών για την περιοχή E2 του ενισχυμένου τμήματος 598bp ανάλογα με την κλινική εικόνα.

Η μετάλλαξη που παρατηρείται σε όλους τους κλώνους εκτός από τους A15C1 και A31C1 είναι στη θέση C3409T και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή P219S. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει εντοπιστεί σε δείγματα HG αλλά και στο δείγμα A24 που είναι LG. Τα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1, A4C2, A15C1 έχουν κοινές μεταλλάξεις, από τις οποίες μόνο μία (T3693A) δεν προκαλεί αλλαγή στο αμινοξύ. Παρατηρείται πως η μετάλλαξη στη θέση G3448A προκαλεί την αντικατάσταση ίδιας βάσης αλλά διαφορετικών αμινοξέων, δηλαδή στα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1, A15C1 προκαλεί την αμινοξική αλλαγή E232K, στο δείγμα A4C2 την E232I ενώ στο δείγμα A31C1 την E232G. Οι υπόλοιπες κοινές μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στον πίνακα δεν προκαλούν αμινοξικές αλλαγές.

Στην παρακάτω εικόνα αναγράφονται συνολικά οι αμινοξικές αλλαγές που εντοπίσαμε πάνω στην πρωτεΐνη E2.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση αμινοξικών αλλαγών.

8. Συζήτηση

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες μεταξύ 15-44 ετών. Στην Ευρώπη περισσότερες από 50.000 γυναίκες αναπτύσσουν τη νόσο κάθε χρόνο και περίπου 25.000 πεθαίνουν από αυτή. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας για να δημιουργηθεί πρέπει πρώτα να υπάρχει μόλυνση από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV). Ο ιός HPV μολύνει το δέρμα και τις βλεννογόνες επιφάνειες των ανθρώπων και ορισμένων ζώων. Κάποιες μορφές του HPV μπορούν να προκαλέσουν κονδυλώματα, ενώ κάποιες άλλες μορφές μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση, η οποία να επιφέρει προ-καρκινικές δυσπλασίες. Μια ομάδα περίπου 30-40 μορφών του HPV μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής και μολύνουν την περιοχή των γεννητικών οργάνων. Κύριος εκπρόσωπος των ιών HPV που προκαλεί αυτόν τον τύπου καρκίνου είναι ο HPV-16. Η ογκογόνος δράση των ιών HPV οφείλεται στα ογκογονίδια E6 και E7, η μεταγραφή των οποίων ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη E2.

Στην παρούσα εργασία ενισχύθηκε το γονίδιο E2 ολόκληρο και τα επιμέρους τμήματά του με έξι ζεύγη εκκινητικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε δύο ζεύγη εξωτερικών εκκινητών (HPV-16/2734-3912, HPV-16/2736-3862) και τέσσερα ζεύγη αλληλοεπικαλυπτόμενων εσωτερικών εκκινητών (HPV-16/2732-3364, HPV-16/3442-3912, HPV-16/3312-3912, HPV-16/2931-3912). Με την βοήθεια των εκκινητών αυτών πραγματοποιήθηκε PCR και Autonested PCR σε όλα τα δείγματα (7 δείγματα HG και ένα δείγμα LG). Τα προϊόντα της Autonested PCR κλωνοποιήθηκαν ώστε να διαχωριστούν τα HPV-16 variants και να προκύψουν μεμονωμένοι κλώνοι που περιέχουν DNA από ένα μόνο διακριτό στέλεχος.

Κλωνοποιήθηκαν τα δείγματα A24 και A38 με το ζεύγος εκκινητών HPV-16/2734-3912 και τα δείγματα A3, A4, A6, A13, A15, A31 με τα ζεύγη εκκινητών HPV-16/2732-3364 και HPV-16/3312-3912. Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής (Blast, Mega) και εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στην περιοχή E2 ενώ τέλος κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης είδαμε ότι το τμήμα των 632bp φέρει σε όλα τα δείγματα την μετάλλαξη στη θέση A2925G, η οποία δεν προκαλεί αμινοξική αλλαγή σε όλους τους κλώνους παρά μόνο στους A13C1 και A13C2 (HG) στη θέση Q57R (Naoufel A. et al 2008). Επιπλέον στο τμήμα αυτό εντοπίσαμε νουκλεοτιδική αλλαγή στη θέση A2976T που προκαλεί την αλλαγή E74D και βρίσκεται στους

κλώνους A3C1, A3C2, A15C1. Εντοπίσαμε τέλος την μετάλλαξη στη θέση C3037T που υπάρχει στους κλώνους A3C2, A13C1, A13C2, η οποία όμως οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης. Οι νουκλεοτιδικές αυτές αλλαγές δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία.

Στο τμήμα των 598bp η μετάλλαξη που εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι στη θέση C3409T που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή P219S και υπάρχει σε όλους τους κλώνους εκτός από τους A15C1 (HG) και A31C1 (HG) (Graham D.A and C.S. Herrington 2000). Στις εργασίες των ερευνητών Graham D.A και C S Herrington αναφέρεται πως η αντικατάσταση της προλίνης από τη σερίνη στη θέση P219S μπορεί να μεταβάλλει σημαντικά την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης E2. Η συχνότητα αυτής της μετάλλαξης στα variants σχετίζεται με την ανάπτυξη υψηλού βαθμού δυσπλασία αλλά και την εμφάνιση επιθετικής νόσου. Επιπλέον στο συγκεκριμένο τμήμα παρατηρήθηκαν οι μεταλλάξεις C3683A, G3777T, C3786A που οδηγούν στις αμινοξικές αλλαγές T310K, W341E, D344E αντίστοιχα και εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης της E2 πρωτεΐνης στο DNA (Graham D.A and C.S. Herrington 2000, Casas L et al 1999). Οι ερευνητές Graham D.A και C.S. Herrington 2000, Casas L. και οι συνεργάτες του αναφέρουν στις εργασίες τους πως η αμινοξική αλλαγή T310K επηρεάζει την τριτοταγή δομή της α-έλικας της N-τελικής περιοχής της πρωτεΐνης E2, η οποία μπορεί να επηρεάζει τη σύνδεσή της στο DNA.

Τέλος κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA. Για το τμήμα των 632bp παρατηρήθηκε πως τα δείγματα A6C1, A6C2, A13C1, A13C2, A24C1, A31C1, A31C2, A38C1 ομαδοποιούνται με το European variant και τα δείγματα A3C1, A3C2, A4C1, A15C1 ομαδοποιούνται με το African type 2 variant. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε από την αλληλουχία των 598 bp οι κλώνοι A4C1, A4C2 και A15C1 παρουσιάζουν απόκλιση κατά την ομαδοποίηση τους. Πιο συγκεκριμένα οι κλώνοι A4C1 και A4C2 ομαδοποιούνται με το African type 1 variant και το δείγμα A15C1 ομαδοποιείται με το Asian American variant. Αυτό προφανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι έχουμε ταυτόχρονη μόλυνση από περισσότερα από ένα HPV-16 variants.

Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι το δείγμα A24 το οποίο προέρχεται από χαμηλού βαθμού δυσπλασία φέρει μόνο το European variant σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα υψηλής αλλοίωσης τα οποία είναι μολυσμένα κυρίως από μη ευρωπαϊκά στελέχη. Όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία η μόλυνση από μη ευρωπαϊκά variants συμβάλλει με μεγαλύτερη συχνότητα στην ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού

δυσπλασίας. Παρ'όλα αυτά για να βγάλουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα θα πρέπει να μελετήσουμε περισσότερα δείγματα LG.

Συμπερασματικά παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνεται ο βαθμός αλλοίωσης το γονίδιο E2 διαρρηγνύεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε διάφορες θέσεις εντός του ανοιχτού πλαισίου αναγνώσης του. Μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου E2 συσχετίζονται με τον βαθμό της αλλοίωσης όπως η μετάλλαξη C3409T που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή P219S, η οποία εντοπίζεται σε HG και LG αλλοιώσεις. Η μετάλλαξη αυτή ίσως να αποτελεί σημαντικό δείκτη νεοπλασίας. Τέλος από τα φυλογενετικά δέντρα συμπεραίνουμε ότι τα δείγματα υψηλής αλλοίωσης (HG) έχουν υποστεί μόλυνση από περισσότερα από ένα HPV-16 variants γεγονός που ίσως να συμβάλλει στην σοβαρότητα της αλλοίωσης. Ωστόσο, θα χρειαστούν περισσότερα δείγματα να μελετηθούν έτσι ώστε να γίνει συσχέτιση των μεταλλάξεων με το βαθμό της αλλοίωσης καθώς επίσης και να συνδεθεί η σχέση των μη ευρωπαϊκών στελεχών με την σοβαρότητα της δυσπλασίας.

9. Βιβλιογραφία

1. Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272:137–150.
2. Antonsson A, McMillan NA 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
3. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805–809.
4. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley P. M., 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61: 962-971.
5. Bedell, M. A., K. H. Jones, S. R. Grossman, and L. A. Laimins. 1989. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 63:1247–1255.
6. 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.
7. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. 2006 Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer.* 118:1071–6.
8. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT 2004 Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7
9. Casas L., Galvan S.C., Ordonez R.M., Lopez N., Guido M. and Berumen J. 1999 Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the *e2* gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer:* 83, 449–455
10. Cates W Jr. 1999 Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis.* 26(Suppl.):S2–7.
11. Chang, Y. E., and L. A. Laimins. 2000. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 74:4174–4182.
12. Charles E. Wood, Zigui Chen, J. Mark Cline, Brigitte E. Miller, and Robert D. Burk 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol.* 81(12):6339-45.

13. Chen, G., and A. Stenlund. 2000. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol.* 74:1506–1512.
14. Chen Z, Terai M, Fu L, et al. 2005 Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol.*79:7014–23.
15. Classon, M., and N. Dyson. 2001. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 264:135–147.
16. Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* 274:2696–2705.
17. Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67:6170–6178.
18. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* (5):275-82
19. Craven, S. E., and D. S. Bredt. 1998. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93:495–498.
20. Crusius, K., E. Auvinen, and A. Alonso. 1997. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15:1437–1444.
21. Danos O, Katinka M, Yaniv M 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*;1:231–236
22. Davies, R., R. Hicks, T. Crook, J. Morris, and K. Vousden. 1993. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* 67:2521–2528.
23. Davy, C. E., D. J. Jackson, Q. Wang, K. Raj, P. J. Masterson, N. F. Fenner, S. Southern, S. Cuthill, J. B. Millar, and J. Doorbar. 2002. Identification of a G2 arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 76:9806–9818.
24. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (39):14252-7.
25. Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71:9343–9349.

26. Demeret C, M Le Moal, M Yaniv, and F Thierry 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.*:4777-84
27. De Schryver A, Meheus A. 1990. Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bull World Health Organ.*68:639–54.
28. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27.
29. Dixon, E. P., G. L. Pahl, W. J. Rocque, J. A. Barnes, D. C. Lobe, M. H. Hanlon, K. A. Alexander, S. F. Chao, K. Lindley, and W. C. Phelps. 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270:345–357
30. Doorbar J 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541).
31. Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824–827.
32. Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv.1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 5:1657– 1671.
33. Dowhanick, J. J., A. A. McBride, and P. M. Howley. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 69:7791–7799.
34. Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934–937.
35. Edmonds, C., and K. H. Vousden. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 63:2650–2656.
36. Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. Stenlund, and L. Joshua-Tor. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol. Cell* 6:149–158.
37. Flores, E., B. L. Allen-Hoffman, D. Lee, and P. F. Lambert. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622–6631.
38. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. 2002 .Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* (19):10009-14

39. Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid, and D. A. Galloway. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68:5698–5705.
40. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12398–12402.
41. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799–804.
42. 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.
43. Gomperts, S. N. 1996. Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* 84:659–662.
44. Goodwin, E. C., E. Yang, C. J. Lee, H. W. Lee, D. DiMaio, and E. S. Hwang. 2000. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10978–10983.
45. Graham D.A and C S Herrington. 2000. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *J Clin Pathol: Mol Pathol*;53:201–206
46. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Ifner T 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49
47. Greenberg, R. A., R. C. O'Hagan, H. Deng, Q. Xiao, S. R. Hann, R. R. Adams, S. Lichtsteiner, L. Chin, G. B. Morin, and R. A. DePinho. 1999. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18:1219–1226.
48. Gerberding JL. 2004. Report to Congress: prevention of genital human papillomavirus infection. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention,.
49. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. 2002. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 186:462–9.
50. Harris, S. F., and M. R. Botchan. 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284:1673–1677.
51. Haverkos H.W. 2004. Viruses, chemicals and co-carcinogenesis, *Oncogene* 23 6492–6499.

52. Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8:3905–3910.
53. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler. 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505–512.
54. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.*338:423–8.
55. Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* (9):4431-9
56. Hoory Talia, Archana Monie, Patti Gravitt, T.-C. Wu. 2008. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus, [*J Formos Med Assoc*;107(3):198–217]
57. Howley P.M 1996 *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.
58. Howley, P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication, p.947–978. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
59. Howley PM, Lowy DR. 2007. Papillomaviruses. *In*: Knipe DM, Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, :2299–354
60. Hubbert, N. L., S. A. Sedman, and J. T. Schiller. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 66:6237–6241.
61. Hughes, F. J., and M. A. Romanos. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 21:5817–5823.
62. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10:4129–4135.
63. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13:775–784.
64. Jiang M. and J. Milner. 2002. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference, *Oncogene* 21 6041–6048.

65. Jones, D. L., R. M. Alani, and K. Munger. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11:2101–2111.
66. Kao, W. H., S. L. Beaudenon, A. L. Talis, J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J. Virol.* 74:6408–6417.
67. Kesis, T. D., R. J. Slebos, W. G. Nelson, M. B. Kastan, B. S. Plunkett, S. M. Han, A. T. Lorincz, L. Hedrick, and K. R. Cho. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3988–3992.
68. Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama, and M. Ishibashi. 1997. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11612–11616.
69. Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, and A. J. Klingelutz. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84–88.
70. Klingelutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79–82.
71. Klumpp, D. J., and L. A. Laimins. 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 257:239–246.
72. Ko, L., and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054–1072.
73. Koutsky L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection [review]. *Am J Med*;102:3–8
74. Krebs H. Premalignant lesions of the cervix. 1994. In: Copeland L, ed. *Textbook of Gynecology*. Philadelphia: WB Saunders, :959–87.
75. Kurman R, Solomon D. 1994. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. New York: Springer-Verlag, *Gynecol Pathol* 2004;23:366–72.
76. Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Itoh, M. Yutsudo, H. Ariga, and M. Inoue. 2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28:669–677.
77. Laimins, L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201–223. In D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

78. Lechner, M. S., and L. A. Laimins. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 68:4262–4273.
79. Lee, S. S., B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Banks, and R. T. Javier. 2000. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* 74:9680–9693.
80. Lee, S. S., R. S. Weiss, and R. T. Javier. 1997. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6670–6675.
81. Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091–2104.
82. Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C. P. Mansur, V. Band, and E. J. Androphy. 1999. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* 73:7297–7307.
83. Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 273:30704–30712.
84. Longworth M.S. and L.A. Laimins. 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, *microbiology and molecular biology reviews*, June, p. 362–372
85. Lu, J. Z., Y. N. Sun, R. C. Rose, W. Bonnez, and D. J. McCance. 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J. Virol.* 67:7131–7139.
86. Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:382–387.
87. Mahdavi A, Monk BJ. 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
88. Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1:194–202.
89. Martin, L. G., G. W. Demers, and D. A. Galloway. 1998. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J. Virol.* 72:975–985.

90. Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, and M. A. Romanos. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* 72:7407–7419.
91. Modis Y., B.L. Trus and S.C. Harrison. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid, *Embo J* 21 4754–4762.
92. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S et al. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*;285:2995–3002.
93. Muller, F., T. Giroglou, and M. Sapp. 1997. Characterization of the DNAbindingactivity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J. Gen. Virol.* 78:911–915.
94. Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubb, P. M. Howley, and R. Schlegel. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4417–4421.
95. Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D. 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer *N Engl J Med.*348(6):518-27.
96. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*;348:518–27.
97. Nakagawa, S., and J. M. Huibregtse. 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.*20:8244–8253.
98. Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, and T. R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955–959.
99. Naoufel A., Brazete J., Hankins C., Money D., Fontaine J., Koushik A., Rachlis A., Pourceaux K., Ferenczy A., Franco E. and Francois Coutlé'e. 2008. Influence of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of General Virology* 89, 1716–1728
100. Narisawa-Saito Mako and Tohru Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins, 2007, Virology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan
101. Narechania A., M. Terai, Z. Chen, R. DeSalle and R.D. Burk. 2004. Lack of the canonical pRB-binding domain in the E7 ORF of artiodactyl papillomaviruses is associated with the development of fibropapillomas, *J Gen Virol* 85 1243–1250

102. Persson G., K. Andersson and I. Krantz. 1996. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture, *Acta Obstet Gynecol Scand* 75 287–290.
103. Pfister H. 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer, *J Natl Cancer Inst Monogr* 52–56.
104. Remm, M., A. Remm, and M. Ustav. 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J. Virol.* 73:3062–3070.
105. Richart RM, Barron BA. 1969 A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*;105: 386–93.
106. Riley, R. R., S. Duensing, T. Brake, K. Munger, P. F. Lambert, and J. M. Arbeit. 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 63:4862–4871.
107. Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH, 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.* (10):6432-45.
108. Rodriguez, M. I., M. E. Finbow, and A. Alonso. 2000. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19:3727–3732.
109. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. 2005. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*;337:76–84.
110. Schneider-Gadicke, A., and E. Schwarz. 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5:2285–2292.
111. Sedman, J., and A. Stenlund. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72:6893–6897.
112. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J et al. 2003. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*;168:421–5.
113. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses *J Virol.* (24):13125-35
114. Steger, G., and S. Corbach. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 71:50–58.

115. Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67:4521–4532.
116. Stubenrauch, F., H. B. Lim, and L. A. Laimins. 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 72:1071–1077.
117. Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216:219–222.
118. Terai M., R. DeSalle and R.D. Burk.2002. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus, *J Virol* 76 10020–10023.
119. Thompson, D. A., G. Belinsky, T. H. Chang, D. L. Jones, R. Schlegel, and K. Munger. 1997. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 15:3025–3035.
120. Tommasino, M., J. P. Adamczewski, F. Carlotti, C. F. Barth, R. Manetti, M. Contorni, F. Cavalieri, T. Hunt, and L. Crawford. 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8:195–202.
121. Wang, J., L. Y. Xie, S. Allan, D. Beach, and G. J. Hannon. 1998. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12:1769–1774.
122. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004;36:6–10.
123. Weintraub, S. J., K. N. Chow, R. X. Luo, S. H. Zhang, S. He, and D. C. Dean. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 375: 812–815.
124. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*;157:218–26.
125. Wright TJ, Kurman R, Ferenczy A. 1994. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman R, ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York: Springer-Verlag;:229–77.
126. Wu, K. J., C. Grandori, M. Amacker, N. Simon-Vermot, A. Polack, J. Lingner, and R. Dalla-Favera. 1999. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 21:220–224.

127. Yang, L., I. Mohr, E. Fouts, D. A. Lim, M. Nohaile, and M. Botchan. 1993. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5086–5090.
128. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):668-73
129. Yoshioka, N., H. Inoue, K. Nakanishi, K. Oka, M. Yutsudo, A. Yamashita, A. Hakura, and H. Nojima. 2000. Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. *J. Virol.* 74:1008–1013.
130. Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz, and P. Jansen-Durr. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13:2323–2330.
131. Zheng Zhi-Ming and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302
132. Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard, and M. J. O'Connor. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 73:6209–6219.
133. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342–350.