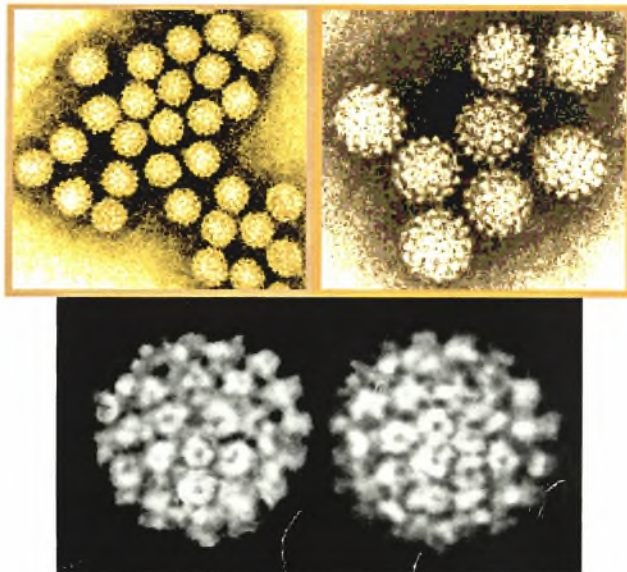


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Παπαδοπούλου Γιάννα

Human papillomavirus: μοριακή διάγνωση και
ταυτοποίηση



Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

Τριμελής επιτροπή:
Π. Μαρκουλάτος
Ζ. Μαμούρης
Κ. Σταθόπουλος

ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4729/1
Ημερ. Εισ.: 27-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087838

Τριμελής επιτροπή:

Παναγιώτης Μαρκουλάτος:

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης

Μικροβιολογίας-Ιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ζήσης Μαμούρης:

Αναπληρωτής καθηγητής Γενετικής Ζωικών

Πληθυσμών

Τμήμα βιοχημείας-βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος:

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Τμήμα βιοχημείας-βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στους γονείς μου,
Ελευθέριο και Γεωργία*

Αντί προλόγου

Το ερευνητικό-εργαστηριακό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας από τον Φεβρουάριο έως τον Οκτώβριο του 2005 υπό τη συνεχή επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Π. Μαρκουλάτου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθρων τον επιβλέπον καθηγητή μου Παναγιώτη Μαρκουλάτο γιατί με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο. Είμαι ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Τον ευχαριστώ όμως πάνω από όλα για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση, τη βοήθεια και τη συμβολή του για τη διεκπεραίωση της εργασίας μου.

Επίσης, πολλές ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορες Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και Δεδεψίδη Ευάγγελο με τους οποίους είχαμε στενή συνεργασία στο εργαστήριο σε ένα ιδιαίτερα φιλικό κλίμα, για το αληθινό ενδιαφέρον, την υπομονή, την κατανόηση, τη βοήθεια και τη στήριξη τους. Η συμβολής τους στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου ήταν καθοριστική. Να ευχαριστήσω ακόμη τη συμφοιτήτρια μου Πλιάκα Βαΐα με την οποία πραγματοποιήσαμε στο ίδιο εργαστήριο την διπλωματική, για τη συμπαράσταση της. Τέλος, οφείλω ευχαριστίες στη φίλη μου Τσακτσίρα Αικατερίνη που με στήριξε και με βοήθησε στο συντακτικό μέρος.

Περίληψη

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους παγκοσμίως. Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου, για την ανάπτυξη της τραχηλικής νεοπλασίας, είναι η μόλυνση με τον ιό Human Papillomavirus (HPV), γεγονός που προκύπτει από επίκαιρα δεδομένα επιδημιολογίας και μοριακής βιολογίας. Η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης με τον ιό είναι η σεξουαλική επαφή. Περισσότεροι από 130 διαφορετικοί HPV έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα και υποδιαιρούνται σε βλεννογονικούς και δερματικούς τύπους. Οι βλεννογονικοί τύποι διακρίνονται περαιτέρω σε 'υψηλού', 'ενδιάμεσου' και 'χαμηλού' κινδύνου βάσει της σχέσης τους με τον καρκίνο του τραχήλου. Οι 'υψηλού' και 'ενδιάμεσου' κινδύνου τύποι HPV σχετίζονται κυρίως με κακοήθεις όγκους του τραχήλου, ενώ οι 'χαμηλού' κινδύνου συνδέονται με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις και σπάνια προοδεύουν σε κακοήθεια.

Γενικά οι HPVs, μέλη της οικογένειας *Papillomaviridae*, είναι μια ετερογενής ομάδα μικρών ιών με κυκλικό δίκλωνο DNA. Το κυκλικό γένωμα είναι περίπου 8 Kbp σε μέγεθος και οργανώνεται σε οχτώ ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια: μια ανιούσα ρυθμιστική περιοχή (upstream regulatory region, URR), έξι πρώιμα γονίδια (E1, E2, και E4-E7) και δύο όψιμα γονίδια (L1 και L2).

Όπως αποδεικνύεται, γυναίκες μολυσμένες με 'υψηλού' και 'ενδιάμεσου' κινδύνου HPV τύπους, έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης τραχηλικής νεοπλασίας. Έτσι, η ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV αποδεικνύεται διαγνωστικά και προγνωστικά σημαντική. Για το σκοπό αυτό γίνονται προσπάθειες από πολλές ερευνητικές ομάδες για την καθιέρωση μιας μεθόδου, που θα μπορεί να ανιχνεύει με ακρίβεια την παρουσία HPV-DNA και θα επιτρέπει τον επακριβή προσδιορισμό του HPV τύπου. Καθώς οι HPVs είναι μια ετερογενής ομάδα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι η προτεινόμενη μεθοδολογία για την αναγνώριση και ταυτοποίηση του ιού σε απομονωμένο DNA.

Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα εργασία, τρία ευρέως χρησιμοποιούμενα PCR εκκινητικά ζεύγη εκτιμήθηκαν για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV. Τα τρία εκκινητικά ζεύγη προέρχονται από τη συντηρημένη αλληλουχία του L1 ORF. Συμπερασματικά, τα δύο εκκινητικά ζεύγη, GP5+/6+ και PGMY09/11, δίνουν περίπου ίδια ευαισθησία ανίχνευσης η οποία είναι καλύτερη από αυτή του MY09/11 εκκινητικού ζεύγους. Ενώ η ευαισθησία ανίχνευσης των δύο πρώτων μεθόδων, είναι

καλή, δεν ισχύει το ίδιο και για τη συμφωνία τους. Τα αποτελέσματα μας προτείνουν ότι για την ανίχνευση του HPV απαιτούνται περισσότερες από μια PCR για την ανίχνευση των θετικών αποτελεσμάτων. Η RFLP ανάλυση προσδιόρισε τον τύπο HPV σε τέσσερα κλινικά δείγματα (τύποι υψηλού κινδύνου HPV 16 και 51), την ύπαρξη μιγμάτων σε δύο και τέλος σε δύο δείγματα θετικά δεν προσδιορίστηκε ο τύπος καθώς αυτός θα πρέπει να είναι εκτός των 16 τύπων υψηλού, ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου οι οποίοι μελετήθηκαν.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Ταξινόμηση των papillomaviruses	2
1.3. Δομή των human papillomavirus	5
1.3.1. Οι πρωτεΐνες αντιγραφής E1 και E2	7
1.3.2. Οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7	8
1.3.3. Οι L1 και L2 καψιδιακές πρωτεΐνες	10
1.4. Ο κύκλος ζωής του HPV	11
1.4.1. Μόλυνση και έκδυση	11
1.4.2. Διατήρηση του γενώματος	12
1.4.3. Φάση πολλαπλασιασμού	13
1.4.4. Ενίσχυση του γενώματος	14
1.4.5. Ιική σύνθεση	15
1.4.6. Κυτταρική εξαλλαγή και καρκίνος του τραχήλου	15
1.5. Διάγνωση των μολύνσεων με HPVs	18
1.5.1. Κυτταρολογική εξέταση για HPV	18
1.5.2. Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση του HPV-DNA	20
1.5.3. Συστήματα που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	23
1.5.4. Ανίχνευση και ανάλυση των ενισχυμένων με PCR προϊόντων	26

2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Πλασμίδια	32
2.2. Δείγματα	32
2.3. Εκχύλιση του γενετικού υλικού	32
2.4. Εκκινητικά μόρια	33
2.5. PCR	34
2.7. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμήματος (RFLP)	35
3. Αποτελέσματα	37
3.1. Αποτελέσματα ενίσχυσης των πλασμιδίων με PGMY09/11 και GP5+/6+ PCR	37
3.2. Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων και με τα τρία εκκινητικά ζεύγη	38
3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης πολυμορφισμού των πλασμιδίων	40
3.4. Αποτελέσματα ανάλυσης πολυμορφισμού των κλινικών δειγμάτων	43
4. Συζήτηση	45
5. Βιβλιογραφία	49

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά

Οι human papillomaviruses (HPVs) (από τη λατινική λέξη *papilla* ‘θηλή ή φλύκταινα’ και την Ελληνική κατάληξη *-oma*, που ο ‘όγκος’), μέλη της οικογένειας *Papillomaviridae*, είναι μικροί δίκλωνοι DNA ιοί που μολύνουν τον δερματικό και βλεννογόνο επιθηλιακό ιστό, του άνω γεννητικού συστήματος, των χεριών ή των ποδιών (Howley P.M. 1996, de Villiers E.M. 1994, Lorincz A.T. et al., 1992). Εξαιτίας του τροπισμού τους, μπορούν να διαχωριστούν σε βλεννογονικούς και δερματικούς τύπους. Οι βλεννογονικοί HPVs, μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε ‘υψηλού’, ‘ενδιάμεσου’ και ‘χαμηλού’ κινδύνου τύπους, βάσει της βλάβης με την οποία σχετίζονται (πίνακας 1) (Schiffman M. and Castle P.E. 2003, Munoz N. et al., 2003).

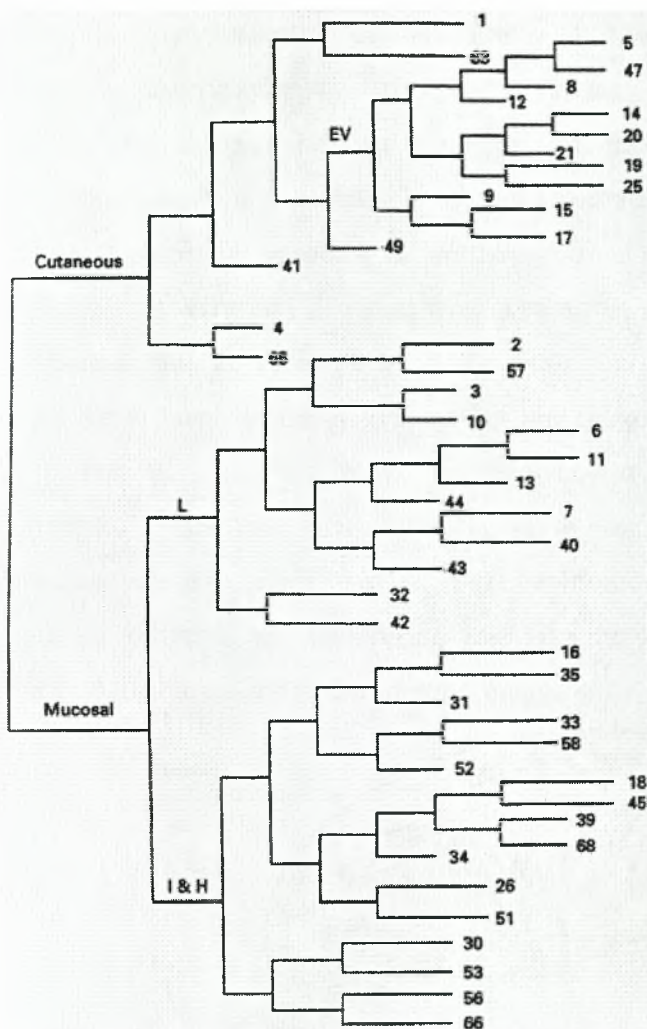
Πίνακας 1. Human papillomavirus (HPV) ομαδοποίηση σύμφωνα με τον κίνδυνο να προκαλέσουν καρκίνο ή προκαρκινικές βλάβες

HPV ομάδα	HPV τύπος
Υψηλού κινδύνου	HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 & 82
Ενδιάμεσου κινδύνου	HPV- 26, 53, & 66
Χαμηλού κινδύνου	HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 & CP6108

Δεδομένα από τον Munoz N. et al., 2003.

Οι διαφορετικοί τύποι διακρίνονται και φυλογενετικά με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του E6 γονιδίου (εικόνα 1) (Herrington C.S. 1994). Οι ‘χαμηλού κινδύνου’ τύποι, κυρίως οι HPV-6 και -11, ανιχνεύονται πιο συχνά σε γεννητικές κρεατοελιές, όπως τα οξυτενή κονδυλώματα (zur Hausen H. 2002, zur Hausen H. 1994, de Villiers E.M. 1994, Lorincz A.T. et al., 1992), ενώ οι ‘υψηλού κινδύνου’ HPV τύποι, συμπεριλαμβανομένου των HPV 16, 18, 31 και 45, έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη τραχηλικού καρκίνου, καθώς το 99% των όγκων αυτών είναι θετικοί στην ανίχνευση DNA του ιού (Walboomers J.M. et al., 1999, Munoz N. et al., 2003). Συνδέονται επίσης και με άλλες γεννητικές κακοήθειες (Monsonego J. et al., 2004, zur Hausen H. 2002, zur Hausen H. 1994, de Villiers E.M. 1994) όπως τον καρκίνο στο κεφάλι και το λαιμό (Chen R. et al., 2005, Schwarz S.M. et al., 1998, Snijders P.J.F. et al., 1996). Οι HPVs που μολύνουν το γεννητικό σύστημα, είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι και υπολογίζεται ότι περίπου τα δυο τρίτα των ατόμων, που έχουν

σεξουαλική επαφή με ένα μολυσμένο άτομο, θα μολυνθούν και τα ίδια (Koutsky L.A. 1997, Munoz, N. 2000).



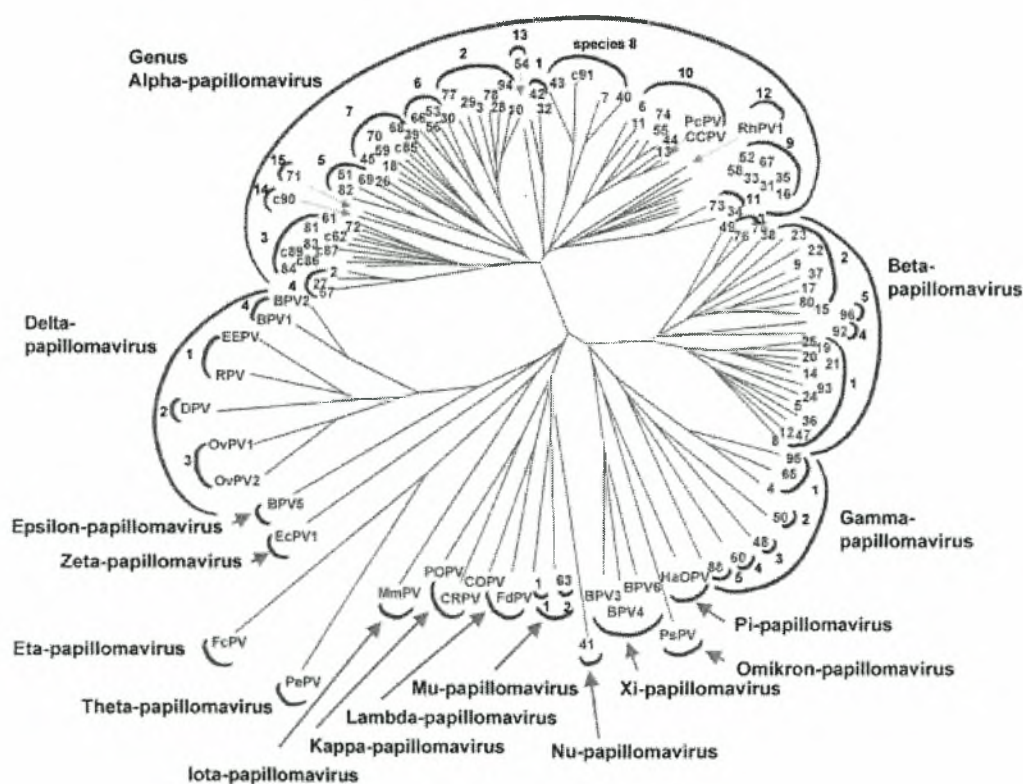
Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στην ομολογία τμήματος 384 βάσεων του E6 γονιδίου διαφορετικών HPV τύπων. EV = epidermodysplasia verruciformis L = low risk types, I & H = intermediate και high risk mucosal types,. Ο αριθμός αναφέρεται στον τύπο HPV (Herrington C.S. 1994).

1.2. Ταξινόμηση των papillomaviruses

Οι papillomaviruses είναι μια ετερογενής ομάδα ιών, που έχει βρεθεί σε περισσότερα από 20 διαφορετικά είδη θηλαστικών, καθώς και σε πτηνά και ερπετά (Bernard H.U. 2005). Συγκεκριμένα, για τους Human Papillomaviruses μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 130 τύποι με νέα μέλη να ανακαλύπτονται συνεχώς. Για το λόγο αυτό χρειάστηκε έρευνα πολλών ετών, μεγάλου αριθμού δειγμάτων, καθώς και ανεύρεση αλληλουχιών από χιλιάδες δείγματα papillomavirus, για να καθιερωθεί μια βάση δεδομένων (Myers G. et al., 1994), η οποία να μας επιτρέπει να προτείνουμε ένα σύστημα ταξινόμησης το οποίο θα εμπλουτίζεται συνεχώς καθώς νέοι papillomavirus θα ανακαλύπτονται.

Αρχικά, οι papillomaviruses είχαν συμπεριληφθεί με τους polyomaviruses σε μια οικογένεια, την *Papovaviridae* (Danos O. et al., 1982). Αυτό βασίστηκε στο παρόμοιο, χωρίς φάκελο καψίδιο και στο δίκλωνο κυκλικό DNA γονιδίωμα. Αργότερα, αναγνωρίστηκε ότι η δυο ομάδες ιών είχαν διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος, τελείως διαφορετική οργάνωση γενώματος και ελάχιστες ομοιότητες στην νουκλεοτιδική ή αμινοξική τους αλληλουχία. Τώρα αναγνωρίζονται επίσημα από την παγκόσμια επιτροπή ταξινόμησης των ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses ICTV) ως δυο ξεχωριστές οικογένειες, *Papillomaviridae* και *Polyomaviridae* (de Villiers E.M. et al., 2004).

Οι μέχρι τώρα γνωστοί ανθρώπινοι και ζωικοί papillomavirus σχηματίζουν 16 γένη (εικόνα 1.2.), τα οποία προσδιορίζονται από γράμματα της Ελληνικής αλφαβήτου (Bernard H.U. 2005). Πέντε από αυτά τα γένη αποτελούνται αποκλειστικά από HPV τύπους και papillomaviruses που ταυτοποιήθηκαν σε μερικούς πιθήκους και μαϊμούδες, ενώ όλα τα άλλα γένη περιέχουν τύπους που βρέθηκαν σε διάφορα θηλαστικά και πουλιά.



Εικόνα 2. Φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται στην αλληλουχία του L1 γονιδίου 118 τύπων papillomaviruses. Παρουσιάζονται τα γένη και τα είδη των papillomaviruses (de Villiers E.M. et al., 2004).

Το κλινικά πιο σημαντικό γένος, αναφέρετε ως Άλφα-papillomaviruses και περιέχει όλους τους HPV τύπους που συνδέονται με βλεννογονικές και γεννητικές

βλάβες (de Villiers E.M. et al., 2004, Myers G. et al., 1994). Οι ‘χαμηλού’ κινδύνου ιοί από αυτήν την ομάδα, όπως ο HPV 6 και 11, είναι τα κυρίως σεξουαλικά μεταδιδόμενα παθογόνα, τα οποία πιστεύεται ότι επηρεάζουν το 1% των σεξουαλικά ενεργών ατόμων (Brentjens M.H. et al., 2002). Μπορούν επίσης, να μολύνουν τη στοματική κοιλότητα και συνδέονται κυρίως με καλοήγη κονδυλώματα. Εν αντιθέσει, οι ‘υψηλού’ κινδύνου ιοί από το γένος Α, όπως οι HPV 16 και 18, προκαλούν αλλοίωση του βλεννογόνου, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε κάποια άτομα σε υψηλού βαθμού νεοπλασία και καρκίνο (Bosch F.X. et al., 2002, Walboomers J. et al., 1999). Ωστόσο, το γένος Άλφα εμπεριέχει και μέλη των οποίων ο αρχικός τροπισμός είναι για δερματικές περιοχές, όπως οι HPV 2 και HPV 10. Ο HPV 2 είναι η πρωταρχική αιτία των συνηθισμένων κρεατοελιών.

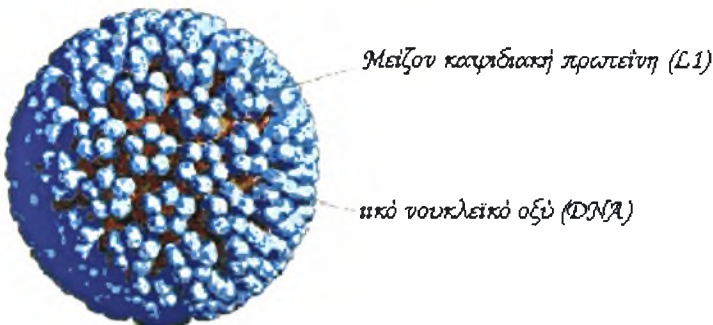
Οι βήτα-papillomaviruses εγκλείουν όλους τους HPV τύπους που συνδέονται με την κονδυλωματώδη επιδερμιδοδυσπλασία (*epidermodysplasia verruciformis*), μια δερματική νεοπλαστική ασθένεια με γενετικό υπόβαθρο (de Villiers E.M. et al., 2004, Ramoz N. et al., 2002, Myers G. et al., 1994). Στους φορείς που δεν έχουν γενετική προδιάθεση οι βήτα-, και οι συγγενείς γάμα-papillomavirus, φυσιολογικά φαίνεται να προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή στη χειρότερη των περιπτώσεων, να επάγουν μικρές καλοήθεις δερματικές νεοπλαστικές αλλοιώσεις (Ramos N. et al., 2002, Orth G. et al., 1978). Όπως για παράδειγμα, ο HPV 5 προκαλεί μη προφανείς ή ασυμπτωματικές μολύνσεις στον γενικό πληθυσμό, αλλά μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα σε ανοσοκατασταλμένα άτομα και σε άτομα που έχουν κληρονομική ανωμαλία, η οποία τους καθιστά επιδεκτικούς στις μολύνσεις από τους ιούς αυτού του είδους. Το γένος αυτό, είναι γενικά ευρέως διαδεδομένο και περιέχει πολλούς HPV τύπους, οι οποίοι δεν έχουν επισήμως περιγραφεί. Μερικοί από τους ιούς, σε αυτά τα δύο γένη, έχουν βρεθεί να σχετίζονται με καρκίνο του δέρματος σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, αλλά μια πιθανή σχέση μεταξύ μόλυνσης με HPV και κακοήθους νεοπλασίας ερευνάται.

Ενώ τα άλφα-, βήτα- και γάμα-papillomaviruses γένη είναι εξαιρετικά πλούσια με διάφορους τύπους, δεν βρέθηκε καμία κοντινή συσχέτιση με τους HPV-1, HPV-41 και HPV-63, οι οποίοι σχηματίζουν δυο ξεχωριστά γένη (de Villiers E.M. et al., 2004): το γένος Mu-papillomaviruses που περιέχει τους HPV-1 και HPV-63 και το γένος Nu-papillomaviruses, το οποίο περιέχει τον HPV-41. Τα δύο αυτά γένη προκαλούν κυρίως δερματικές βλάβες.

1.3. Δομή των human papillomavirus

Οι HPVs είναι μικροί ιοί με κυκλικό δίκλωνο DNA μήκους περίπου 7900 bp (Coggin J.R. and zur Hausen H. 1979). Το ικό DNA βρίσκεται μέσα στο καψίδιο, συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες και σχηματίζει σύμπλοκα παρόμοια με τη χρωματίνη (Howley P.M. 1996). Τα ιικά σωματίδια είναι χωρίς φάκελο, διαμέτρου περίπου 55-60 nm και έχουν εικοσαεδρική δομή. Το ικό καψίδιο αποτελείται από 360 αντίγραφα της L1 πρωτεΐνης και πιθανώς από 12 αντίγραφα της L2 πρωτεΐνης οργανωμένα σε 72 πενταμερείς δομές, τα καψομερίδια (Εικόνα 3.1.) (Modis Y. et al., 2002, Finch J.I and Klug A. 1965, Klug A and Finch JT. 1965).

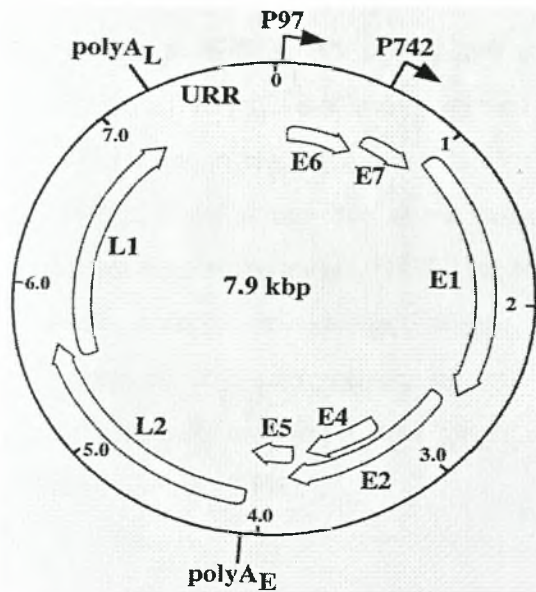
Τρισδιάστατο μοντέλο του Human Papillomavirus



Εικόνα 3.1. Τρισδιάστατη δομή του Human Papillomavirus. Ενδεικτικά υποδεικνύονται οι πενταμερείς δομές των καψομεριδίων αποτελούμενες από την L1 πρωτεΐνη και το νουκλεϊκό οξύ που βρίσκεται εντός του καψιδίου.

Το κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA κωδικοποιεί για οχτώ με δέκα γονίδια ή ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (open reading frames, ORFs), τα οποία μεταγράφονται σε πολυκιστρωνικά mRNAs από τον έναν DNA κλώνο (Εικόνα 3.2) και οι λειτουργίες τους συνοψίζονται στον πίνακα 3. Το γένομα των HPVs υψηλού κινδύνου περιέχει δύο κύριους υποκινητές. Ο πρώιμος υποκινητής ξεκινάει τη μεταγραφή πριν (upstream) το E6 ORF, ενώ ο εξαρτώμενος από την διαφοροποίηση, όψιμος υποκινητής τοποθετείται μέσα στο E7 ORF και ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης του ιού (Ozbun M. and Meyers C. 1997). Τα ιικά γονίδια μπορούν να χωριστούν σε πρώιμες και όψιμες κατηγορίες ανάλογα με τον χρόνο έκφρασής τους. Νωρίς κατά τη μόλυνση, τα πολυκιστρωνικά μετάγραφα τα οποία αρχικά κωδικοποιούν για τις E6, E7, E1 και E2, μεταγράφονται από τον πρώιμο υποκινητή (Hummel M. et al., 1992, Ozbun M.A. and Meyers C. 1998). Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του ιικού κύκλου ζωής, ενεργοποιείται ο όψιμος υποκινητής με

αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα μεταγραφής των E1, E2, E4, E5 καθώς επίσης και των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2 (Hummel M. et al., 1992).



Εικόνα 3.2. Οργάνωση του κυκλικού γονιδιώματος του HPV 31. Τα βέλη απεικονίζουν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs). Φαίνονται ο πρώιμος υποκινητής (p97) και ο εξαρτώμενος από τη διαφοροποίηση όψιμος υποκινητής (p742) όπως επίσης και τα αντίστοιχα πρώιμα και όψιμα σήματα πολυαδενυλίωσης. Η ανιούσα ρυθμιστική περιοχή (URR) κοντά στον υποκινητή p97 εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των πρώιμων γονιδίων (Laimins L. A. 1996).

Πίνακας 3. Μια σύντομη περιγραφή των λειτουργιών των human papillomavirus γονιδίων

Γονίδια	Λειτουργία
E1	Δράση DNA ελίκασης, εξαρτώμενη από ATP DNA-προσδένουσα πρωτεΐνη, δράση ΑΤΡασης. Ρόλο στην αντιγραφή και καταστολή της αντιγραφής.
E2	Ρυθμιστής της μεταγραφής και αντιγραφής του ιού. Ελέγχει την έκφραση των γονιδίων των πρώιμων περιοχών, απαραίτητη για την αποτελεσματική αντιγραφή του DNA του ιού μαζί με την E1.
E3	Καμία γνωστή λειτουργία (παρούσα μόνο στη μειονότητα των papillomavirus).
E4	Εκφράζεται ως όψιμο γονίδιο αρχικά στο διαφοροποιούμενο επιθήλιο. Ρόλο στην παραγωγική μόλυνση, συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της κερατίνης των καλλιεργούμενων επιθηλιακών κυττάρων. Ρόλο στην έξοδο του ιού.
E5	Δράση μετασχηματισμού στον HPV-16 <i>in vitro</i> . Πιθανώς διεγείρει τον πολλαπλασιασμό καλοήθων κυττάρων <i>in vivo</i> αλλά μπορεί να έχει ρόλο και στην έναρξη της καρκινογένεσης.
E6	Ρόλο στη διεργασία μετασχηματισμού μαζί με την E7. Ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης.
E7	Ιδιότητες τρανσενεργοποίησης όμοιες με τον υποκινητή E2 του αδενοϊού, επάγει τη σύνθεση του DNA σε ήρεμα κύτταρα. Ρόλο στο μετασχηματισμό κυττάρων τροκτικού σε συνεργασία με ένα ενεργό <i>ras</i> ογκογονίδιο. Η E7 προσδένει την υποφωσφορυλιωμένη δομή της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) έχοντας ως αποτέλεσμα την λειτουργική της απενεργοποίηση επιτρέποντας την πρόοδο του κυττάρου στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι E7 πρωτεΐνες από τους τύπους χαμηλού κινδύνου HPV 6 και 11 δεσμεύονται λιγότερο αποτελεσματικά από ότι οι E7 πρωτεΐνες από τους HPVs υψηλού κινδύνου (τύποι 16 και 18).
E8	Καμία γνωστή λειτουργία (παρούσα μόνο στη μειονότητα των papillomavirus)
L1	Μείζον καψιδιακή πρωτεΐνη.
L2	Μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη.

Sanclemente G. and Gill D.K. 2002

Παρά το μικρό τους μέγεθος, οι human papillomaviruses έχουν σύνθετη μοριακή βιολογία (Munger K. and Howley P.M. 2002). Εν συντομία τρία ογκογονίδια, E5, E6 και E7, ρυθμίζουν την διαδικασία του μετασχηματισμού, δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1 και E2, ρυθμίζουν την μεταγραφή και αντιγραφή του ιικού και οι δύο δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 συνθέτουν το ιικό καψίδιο και διευκολύνουν την είσοδο του ιικού DNA στο κύτταρο (Roden R.B. et al., 1994, Qi Y.M. et al., 1996, Evander M. et al., 1997). Μεταξύ των δυο αυτών περιοχών είναι η ανιούσα ρυθμιστική περιοχή (upstream regulatory region, URR), επίσης γνωστή και ως long control region (LCR). Η URR, κατέχει πολυάριθμες θέσεις πρόσδεσης για πολλούς καταστολείς και ενεργοποιητές της μεταγραφής, προποθέτοντας ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στον καθορισμό του εύρους των ξενιστών για συγκεκριμένους τύπους HPV (Gravitt P.E. and Shah K. 2004).

1.3.1. Οι πρωτεΐνες αντιγραφής E1 και E2

Οι E1 και E2 πρωτεΐνες απαιτούνται για την αντιγραφή του ιού και είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα σε όλους τους HPV τύπους (Sverdrup F. and Khan S.A. 1994, Ustav M. and Stenlund A. 1991). Η E1 πρωτεΐνη, μια 70 -80 KDa φωσφοπρωτεΐνη, είναι μια site specific DNA-binding πρωτεΐνη, η οποία κατέχει μια δραστηριότητα DNAάσης (Mohr I.J. et al., 1990). Λειτουργεί επίσης ως ATP εξαρτώμενη ελικάση του DNA για να καταλύσει το ξετύλιγμα του DNA και έχει αποδειχθεί ότι προσδέεται σε υπομονάδες της DNA πολυμεράσης άλφα/πριμάσης για να στρατολογήσει την κυτταρική μηχανή αντιγραφής στη διάθεση του ιού (Masterson P.J. et al., 1998, Hughes F.J. and Romanos M.A. 1993). Επίσης, περιέχει την περιοχή πρόσδεσης του DNA, την περιοχή πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης και μια καταλυτική περιοχή. Οι E1 και E2 είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA και για την επιτρεψιμότητα της μόλυνσης. Το κύτταρο ξενιστής παρέχει την DNA πολυμεράση και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA.

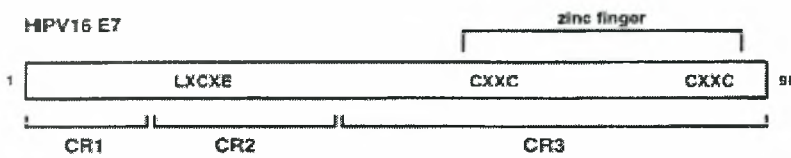
Η E2 πρωτεΐνη είναι μια φωσφοπρωτεΐνη των 50 KDa με τρεις λειτουργικές περιοχές (Kim S.S. et al., 2000). Η N-τελική περιοχή, περιέχει περίπου 220 αμινοξέα και ενεργεί ως τρανσ-ενεργοποιητής. Η C-τελική περιοχή, περιέχει περίπου 90 αμινοξέα και στη διμερή της δομή μπορεί να προσδεθεί στο DNA. Τέλος, η τρίτη περιοχή είναι ο συνδετικός κρίκος των δυο προηγούμενων περιοχών. Η E2 πρωτεΐνη προσδέεται στην URR περιοχή και αναστέλλει την μεταγραφή των E6 και E7 πρωτεϊνών. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες είναι σημαντικές για τη σύνθεση του DNA του

ιού στον ξενιστή. Η πρόσδεση της E2 πρωτεΐνης στην URR προκαλεί στερεοδομικό εμπόδιο, για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IID ή της RNA πολυμεράσης II στο TATA box και έτσι στην καταστολή των E6 και E7 (Longworth MS and Laimins LA. 2004, Tying K.S. 2000, Cripe T.P. 1987).

1.3.2. Οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7

Οι E6 πρωτεΐνες υψηλού κινδύνου αποτελούνται από περίπου 150 αμινοξέα και περιέχουν δυο περιοχές πρόσδεσης ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys (Longworth MS and Laimins LA. 2004, Cole S.T. and Danos O. 1987, Barbosa M.S. et al., 1989). Οι E6 πρωτεΐνες των HPVs υψηλού κινδύνου εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων με HPV, κερατινοκυττάρων. Μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες λειτουργίες της E6 είναι η ικανότητα της να παρεμβαίνει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της p53 (Howley P.M. et al., 1991, Hawley-Nelson P. et al., 1989). Η p53, πρωτεΐνη καταστολής όγκων, εμπλέκεται στη ρύθμιση του G₁/S και του G₂/M σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Oren M. 2003). Σε απόκριση της βλάβης του DNA ή άλλου κυτταρικού stress, η p53 ενεργοποιεί μεταγραφικά την έκφραση ποικίλων ρυθμιστών, οι οποίοι επάγουν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και/ή την απόπτωση. Η πρωτεΐνη E6, των HPVs υψηλού κινδύνου, έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζει σύμπλοκο με την E6AP (λιγάση της ουβικουιτίνης) και διευκολύνει τη γρήγορη ανακύκλωση της p53 (Werness B.A. 1990, Scheffner M. et al., 1990, Huibregtse J.M. et al., 1991). Η γρήγορη ανακύκλωση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της δυναμικής ισορροπίας της p53 και ως εκ τούτου την παρεμπόδιση της προαποπτωτικής της δράσης. Επίσης, η E6 έμμεσα μειώνει την δραστικότητα της p53 μέσω αλληλεπίδρασης της με την p300/CBP (συνενεργοποιητή της p53). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση της E6 με πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ είναι απαραίτητη για την εμφάνιση καρκίνου (Kim S.K. 1997). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε αποδόμηση των PDZ, οι οποίες παίζουν ρόλο στη σύνδεση των κυττάρων (Thomas M. et al., 2002). Μια άλλη σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου, είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης στα μολυσμένα κύτταρα (Klingelutz A.J. 1996, Stoppler H. et al., 1997, Veldman T. et al., 2001). Η E6 αυξάνει το μήκος των τελομερών στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT. Αυτή η επανενεργοποίηση της hTERT έχει ως αποτέλεσμα συνεχόμενες κυτταρικές διαιρέσεις και αθανασία των κυττάρων.

Η E7 ογκοπρωτεΐνη αποτελείται περίπου από 98 αμινοξέα και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές, τις CR1, CR2 και CR3 (Εικόνα 3.3.) (Barbosa M.S. et al., 1990, Dyson N. et al., 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο, η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο διαμεσολαβεί στην πρόσδεση της E7 στο ρετινοβλάστωμα (Rb) (Chellappan S. et al., 1992, Dyson N. et al., 1989) και η CR3 συνίσταται από δυο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου.

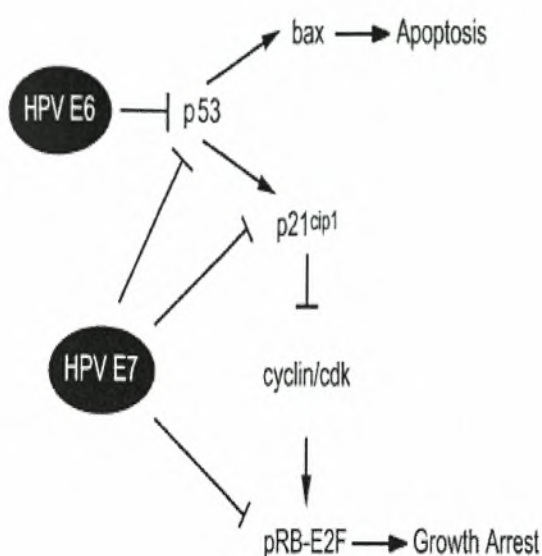


Εικόνα 3.3. Οι τρεις διατηρημένες περιοχές της E7 ογκοπρωτεΐνης του HPV 16: CR1, CR2 και CR3 (Longworth M.S. and Laimins L.A. 2004).

Μόνο το E7 γονίδιο μπορεί να καταστήσει αθάνατα τα αρχέγονα ανθρώπινα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα (κερατινοκύτταρα), ενώ η E6 ενισχύει την αποτελεσματικότητα της δράσης της E7. Αυτή η ικανότητα εξαρτάται από την πρόσδεση της E7 σε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος που εμπεριέχει την Rb, την p107 και την p130. Η υποφωσφορυλιωμένη pRb ελέγχει την μετάβαση από την G₁ στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω πρόσδεσης με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F, οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή πολλών συστατικών που εμπλέκονται στην S φάση. Στα φυσιολογικά κύτταρα, φωσφορυλίωση της Rb, από τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης, οδηγεί στην απελευθέρωση των E2F και στην μεταγραφή των γονιδίων της S φάσης. Η E7, μπορεί να υπερισχύσει του φυσιολογικού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, μέσω πρόσδεσης και αποικοδόμησης της υποφωσφορυλιωμένης pRb με έναν μηχανισμό που εμπλέκει το πρωτεόσωμα. Η πρόσδεση της E7 στην pRb οδηγεί σε μεταγραφική απορύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Nguyen D.X. et al., 2002, 1997, Boyer S.N. et al., 1996, Huang P.S. et al., 1993, Patrick D.R. et al., 1994).

Επιπλέον, η E7 αλληλεπιδρά με τάξης I απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) που ενεργούν ως μεταγραφικοί συγκαταστολείς, μειώνοντας την αναδιάταξη της χρωματίνης μέσω απακετυλίωσης των ιστονών (Longworth M.S. and Laimins L.A. 2004, Brehm A. et al., 1999). Επίσης, φαίνεται να προσδέεται σε σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης όπως και σε αναστολείς κινάσων εξαρτώμενες από κυκλίνες (cyclin-dependent kinase inhibitors CKIs) όπως η p21^{cip1} και η p27, παρεμποδίζοντας έτσι ακόμη περισσότερο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Funk J.O. et al.,

1997). Τα κυριότερα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου που διαταράσσονται από τις E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες φαίνονται στην Εικόνα 3.4.



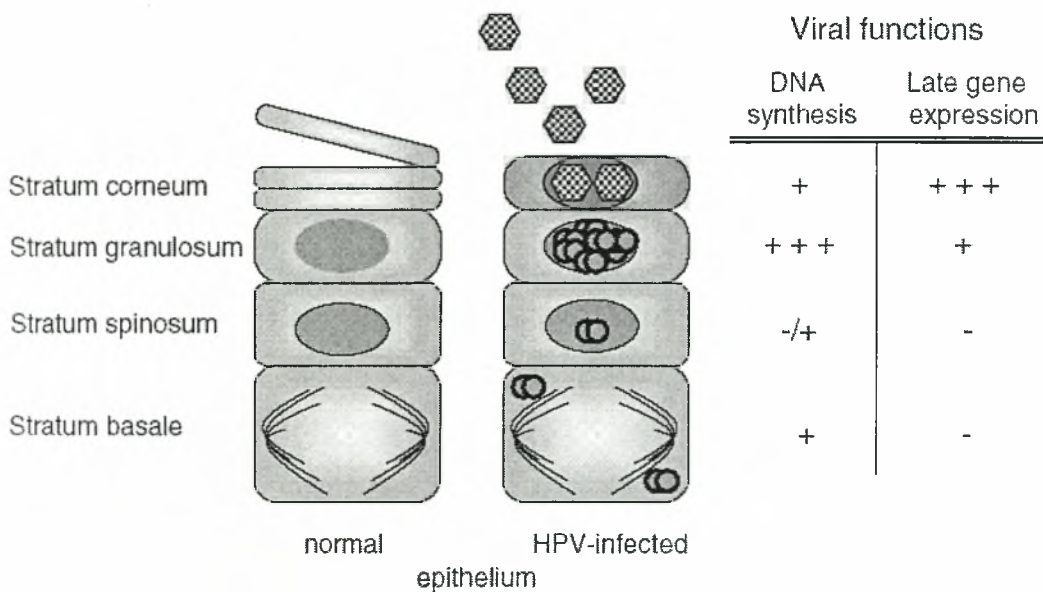
Εικόνα 3.4. Λειτουργική κατάργηση των καταστολέων όγκου p53 και pRb από τις υψηλού κινδύνου HPV E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες. Οι E6 και E7 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την p53 και pRb, αντίστοιχα, και να επάγουν την πρωτεολυτική τους αποικοδόμηση. Η HPV E7 μπορεί επίσης να εμποδίσει την μεταγραφική δραστηριότητα της p53 και μπορεί να αδρανοποιήσει τον αναστολέα cdk p21, τον κυριότερο μεσολαβητή της p53-επαγόμενης διακοπής της ανάπτυξης. Ο συνδυασμός απενεργοποίησης των μονοπατιών της p53 και της pRb παρεμβαίνει στην ακεραιότητα σημαντικών σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και στο αμυντικό πρόγραμμα κυτταρικής απόπτωσης (Münger K. and Howley P.M. 2002).

1.3.3. Οι L1 και L2 καψιδιακές πρωτεΐνες

Τα δυο όψιμα γονίδια L1 και L2 κωδικοποιούν τις μείζονες και ελάσσονες καψιδιακές πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Αυτές είναι οι δομικές πρωτεΐνες του ισωματίου και εκφράζονται προς το τέλος του ιικού κύκλου ζωής στα υψηλά διαφοροποιημένα βασικά κύτταρα (Ozbun M.A and Meyers C. 1998, Ozbun M.A and Meyers C. 1997). Μετά την αντιγραφή, τα γενώματα των HPVs πακετάρονται σαν χρωματίνη μέσα στα ιικά καψίδια, τα οποία συντίθενται από τις L1 και L2 πρωτεΐνες. Πιστεύεται, ότι εντός του HPV ισωματίου, περίπου 12 αντίγραφα της L2 συνδέονται με τα καψομερίδια διαμέσου μια περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της L2 (Becker K.A. et al., 2004, Trus B.L. et al., 1997, Swindle C.S. et al., 1999, Paintsil J. et al., 1996, Sapp M. et al., 1995). Όπως και άλλοι ιοί, τα ιικά καψίδια των HPV υποβάλλονται σε μια περαιτέρω διαδικασία ωρίμανσης, πριν απελευθερωθούν από το κύτταρο (Buck C.B. et al., 2005). Κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του ιού, οι καψιδιακές πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και πρέπει να εισέλθουν στον πυρήνα ώστε να πακετάρουν το DNA του ιού (Paintsil J. et al., 1996).

1.4. Ο κύκλος ζωής του HPV

Γενικά, οι HPVs δεν επάγουν τη λύση των κυττάρων και περαιτέρω μολύνσεις λαμβάνουν χώρα από διάχυση του ιού από τα ήδη μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα (Rodén R.B. et al., 2001). Διακρίνουμε δυο είδη κύκλου ζωής του ιού, τον παραγωγικό και τον κύκλο μετασχηματισμού. Στον παραγωγικό κύκλο, το ιικό DNA είναι σαν επίσωμα (παραγωγή ιικών σωματιδίων), ενώ στον κύκλο μετασχηματισμού το ιικό DNA ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου ξενιστή (ποικίλες κακοήθειες). Μολαταύτα, ο κύκλος αντιγραφής του ιού είναι στενά συνδεδεμένος με την διαφοροποίηση του επιθηλίου και την ωρίμανση των κερατινοκυττάρων (Davidson E.J. et al., 2002, Laimins L.A. 1996). Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο φυσιολογικό κύκλο ζωής του ιού αναλύονται παρακάτω και φαίνονται διαγραμματικά στις εικόνες 4.1. και 4.2.



Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση ανώμαλης επιθηλιακής διαφοροποίησης επαγόμενης από την μόλυνση με HPV. Συγκρίνονται το φυσιολογικό και το HPV μολυσμένο επιθήλιο και οι εξαρτώμενες από τη διαφοροποίηση ιικές λειτουργίες παρατίθενται στον κατάλογο (Fehrmann F. and Laimins L.A. 2003).

1.4.1. Μόλυνση και έκδυση

Οι HPVs μεταδίδονται από την επαφή δέρμα με δέρμα, αλλά πιο συχνά μέσω σεξουαλικής επαφής, τόσο στη γυναίκα όσο και στον άντρα (Roman A. and Fife K.H. 1989). Η έναρξη της μόλυνσης ξεκινά με πρόσβαση του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας (Galloway D.A. et al., 2003). Οι HPVs, μολύνουν τα επιθηλιακά

βλαστοκύτταρα που εντοπίζονται στη βασική στιβάδα του πλακωτού επιθηλίου. Διαμάχη υπάρχει όσον αφορά τη φύση του επιφανειακού υποδοχέα του κυττάρου, ο οποίος επιτρέπει την αρχική σύνδεση του ιού στο κύτταρο, αν και οι περισσότερες μελέτες προτείνουν μια εξάρτηση στην παρουσία της θειικής ηπαρίνης (Giroglou T. et al., 2001). Η προσρόφηση των συνδεδεμένων ιοσωματίων είναι μια αργή διαδικασία με χρόνο ημιζωής ωρών και όχι λεπτών και αυτή συμβαίνει μέσω ενδοκύτωσης με κυστίδια κλαθρίνης (Culp T.D. and Christensen N.D. 2004, Day P.M. et al., 2003, Joyce J.G. et al., 1999). Η έκδυση του papillomavirus μπορεί να διευκολυνθεί από την διάσπαση ενδοκαψομεριδιακών δισουλφιδικών δεσμών στο αναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου (Li M. et al., 1998), επιτρέποντας το ιικό DNA να μεταφερθεί στον πυρήνα.

1.4.2. Διατήρηση του γενώματος

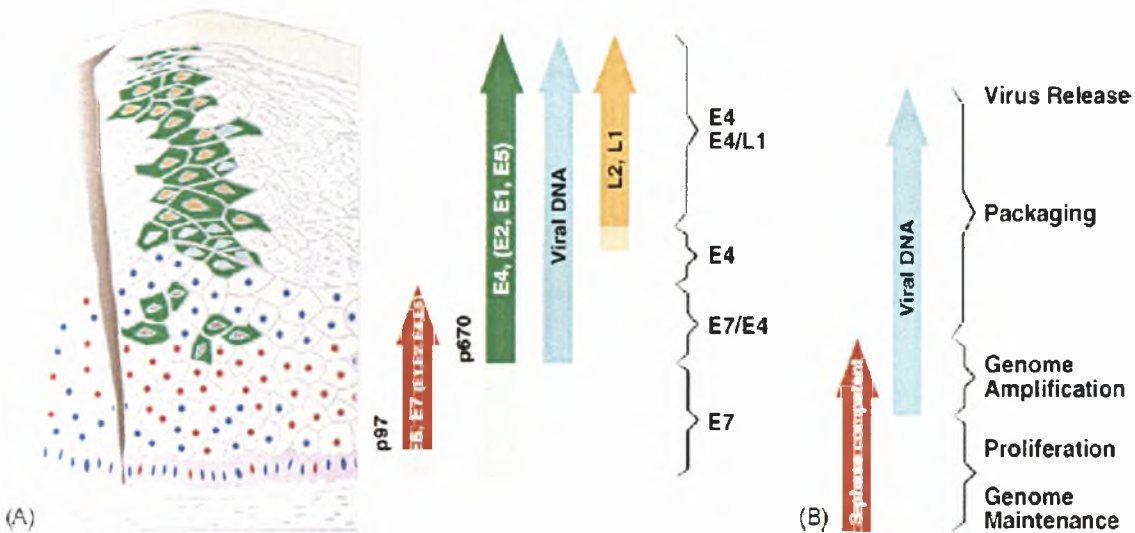
Μετά από τη μόλυνση και έκδυση του ιού, πιστεύεται ότι ο ιός διατηρεί το γένωμά του σαν ένα, χαμηλού αριθμού αντιγράφων, υπερελικωμένο κυκλικό μόριο ή επίσωμα στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Το πρότυπο έκφρασης του ιικού γενώματος, σε αυτά τα κύτταρα, δεν είναι καλά καθορισμένο, αλλά γενικά θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες E1 και E2 εκφράζονται με σκοπό να διατηρήσουν το ιικό DNA σαν επίσωμα (Wilson V.G. et al., 2002) και για να διευκολύνουν το σωστό διαχωρισμό των ιικών γενωμάτων κατά τη διαίρεση των κυττάρων (You J. et al., 2004). Η αποτυχία έκφρασης του πλήρους μήκους, της E1 πρωτεΐνης στο πλαίσιο του HPV-31 γενώματος, εμποδίζει τη διατήρηση του επισώματος και στα καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (Frattini M.G. et al., 1996). Μετά την αρχική μόλυνση ακολουθεί μια φάση πολλαπλασιασμού, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των βασικών κυττάρων που 'φυλάσσουν' ιικά επισώματα. Σε αυτά τα μολυσμένα κύτταρα, αν και η ιική σύνθεση είναι χαμηλή, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του γενώματος σε περίπου 10 με 200 αντίγραφα ανά κύτταρο, ενώ οι ιικές πρώιμες πρωτεΐνες (E6, E7, E1 και E2) εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα (De Geest K. et al., 1993, Stanley M.A. et al., 1989). Η συμβολή των E6 και E7 στον πολλαπλασιασμό των βασικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης *in vivo* είναι αβέβαιη, ενώ έχει προταθεί ότι η έκφραση του E1 (και πιθανόν και του E2) μπορεί να είναι επαρκής για τη διατήρηση των ιικών επισωμάτων (Zhang P. et al., 1999).

Sherman L. et al., 1997). Ως εκ τούτου, παρατηρείται καθυστέρηση της τελικής διαφοροποίησης. Αυτό οδηγεί στην υπερπλασία της ακανθώδους στιβάδας (σχηματισμό ιστού κρεατοελιάς) και σε κάποιες περιπτώσεις, που σχετίζονται με HPV's υψηλού κινδύνου, μπορεί τελικά να οδηγήσει και σε ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη. Εκτός από τις E6 και E7, πιστεύεται ότι οι άλλες πρώιμες ιικές πρωτεΐνες (π.χ. E1, E2, E4 και E5) εκφράζονται στην αρχή της γονιδιακής ενίσχυσης, ώστε να διασφαλίσουν τη διατήρηση του ιικού επισώματος σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων (Middleton K. et al., 2003).

1.4.4. Ενίσχυση του γενώματος

Για την παραγωγή μολυσματικών ιών, οι papillomaviruses πρέπει να ενισχύσουν τα ιικά τους γενώματα και να τα πακετάρουν σε μολυσματικά σωματίδια. Για τους ιούς του γένους Άλφα, όπως οι HPV-16, HPV-11 ή HPV-2, αυτό λαμβάνει χώρα στις ενδιάμεσες ή ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες, όπου γίνεται και η ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή (Εικόνα 5.2.). Η ανιούσα ρύθμιση του όψιμου υποκινητή, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη αντιγραφή του ιικού DNA, χωρίς άμεση επίδραση στην έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για την είσοδο στην S-φάση (Middleton K. et al., 2003). Η ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος, αρχίζει σε μια υποομάδα κυττάρων, στα πολλαπλασιαστικά διαμερίσματα και απαιτεί έκφραση όλων των πρώιμων ιικών προϊόντων των γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των E4 (Peh W.L. et al., 2004) και E5 (Fehrmann F. et al., 2003, Genther S.M. et al., 2003), των οποίων ο ρόλος στην αντιγραφή δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Η πρόσδεση της E2 στην URR είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού DNA και απαιτεί την E1 DNA ελικάση στην αρχή της αντιγραφής του ιού (Ozbun M.A. and Meyers C. 1998). Η συγκρότηση του εναρκτήριου συμπλόκου E1/E2 κατά την ιική γένεση είναι ανάλογη με το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ κυτταρικών εναρκτήριων πρωτεϊνών κατά την κυτταρική γένεση και επιτρέπει τη συνέχιση της αντιγραφής των ιικών γενωμάτων απουσία σύνθεσης κυτταρικού DNA.

Ο μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή και στην ανιούσα ρύθμιση της έκφρασης των E1/E2, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός και είναι πιθανό, αυτός ο υποκινητής να είναι ιδιόσυστατα ενεργός σε όλα τα στάδια κατά τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου. Ισχύουσα μοντέλα, προτείνουν ότι μια μέτρια αύξηση στη λειτουργία του υποκινητή κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης



Εικόνα 4.2. Οργάνωση του κύκλου ζωής κατά τη διάρκεια παραγωγικής μόλυνσης από HPV τύπους της ομάδας Άλφα. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση του δέρματος όπου φαίνεται το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων του HPV 16 καθώς τα μολυσμένα κύτταρα μεταναστεύουν προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Μετά την μόλυνση, το ιικό γένωμα διατηρείται ως χαμηλού αριθμού αντιγράφων επίσωμα. Κατά τη διάρκεια της επιθηλιακής διαφοροποίησης, ο p97 υποκινητής κατευθύνει την έκφραση των E6 και E7 γονιδίων απαραίτητων για την είσοδο στην S φάση (κόκκινο). Ο p670 υποκινητής υπάγεται σε ανιούσα ρύθμιση στις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες και οι ικές πρωτεΐνες αντιγραφής (E1, E2, E4, E5) αυξάνουν σε ποσότητα (πράσινο), διευκολύνοντας την ενίσχυση του ιικού γενώματος (μπλε). Αλλαγές στο μάτισμα του mRNA επιτρέπουν την E4 να μείνει σταθερή στις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες όπου βρίσκονται οι ικές καψιδιακές πρωτεΐνες (κίτρινο). (Β) Τα κύτταρα στις κατώτερες επιθηλιακές στιβάδες έχουν ακόμη την S φάση. Η ενίσχυση του ιικού γενώματος ξεκινά σε αυτά τα κύτταρα αλλά διακόπτεται όταν τα κύτταρα χάσουν την ικανότητα να εκφράσουν τις πρωτεΐνες της S φάσης (Doorbar J. 2005).

1.4.3. Φάση πολλαπλασιασμού

Το φυσιολογικό ανθρώπινο πλακώδες επιθήλιο αναπτύσσεται σε πολύστιβα στρώματα όπου μόνο τα κύτταρα των βασικών στιβάδων είναι ικανά να διαιρεθούν ενεργητικά (Watt F.M. 1998, Madison K.C. 2003). Μετά τη διαίρεση των βασικών κυττάρων, ένα από τα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύει προς τα πάνω και αρχίζει να υφίσταται διαφοροποίηση ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν στην βασική στιβάδα. Μετά την εγκατάλειψη της βασικής στιβάδας, τα φυσιολογικά κύτταρα αποσύρονται από τον κυτταρικό κύκλο, αρχίζει η διαφοροποίηση και ξεκινά η σύνθεση υψηλού μοριακού βάρους κερατινών. Καθώς η διαφοροποίηση προοδεύει, οι κερατίνες συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο και ο πυρηνικός φάκελος καταρρέει έτσι ώστε στα υψηλότερα επίπεδα του διαφοροποιημένου επιθηλίου, τα κύτταρα διακόπτουν την λειτουργία τους και υπάρχουν μόνο ως σάκοι γεμάτη κερατίνη.

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με HPV, ικές πρωτεΐνες E6 και E7 εμποδίζουν τη φυσιολογική έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, που συμβαίνει στα διαφοροποιούμενα κύτταρα, για να επιτρέψουν έτσι την παραγωγή ικών απογόνων (Garner-Hamrick P.A. et al., 2004, Flores E.R. et al., 2000, Stubenrauch F. and Laimins L.A. 1999,

μπορεί να οδηγήσει σε μια αύξηση των επιπέδων των E1 και E2 (όπως επίσης και στις E4 και E5) και μια επακόλουθη αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του γενώματος. Τα γενώματα που αντιγράφηκαν πρόσφατα, θα εξυπηρετήσουν ως εκμαγεία για την περαιτέρω έκφραση των E1 και E2 γονιδίων, η έκφραση των οποίων μπορεί να διευκολύνει επιπρόσθετη ενίσχυση των ικών γενωμάτων και αυτά με τη σειρά τους περαιτέρω έκφραση των E1 και E2 πρωτεϊνών αντιγραφής (Middleton K. et al., 2003).

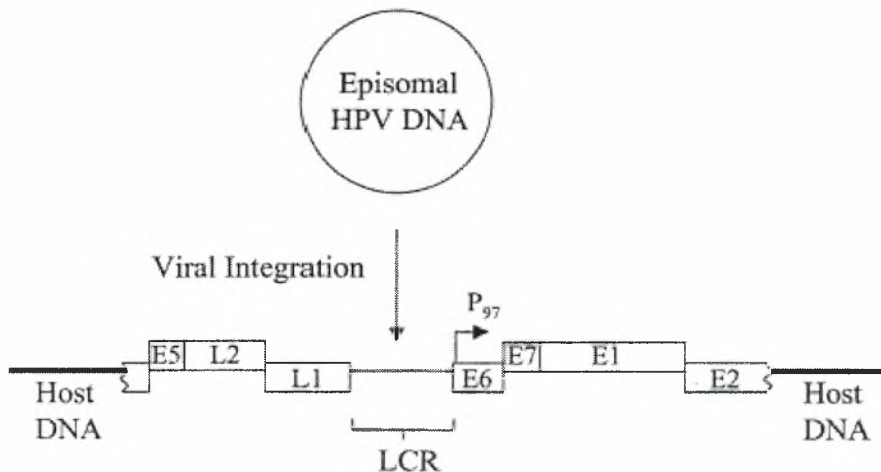
1.4.5. Ιική σύνθεση

Οι papillomaviruses κωδικοποιούν δυο δομικές πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται στις ανώτερες στιβάδες του μολυσμένου ιστού, άπαξ η ενίσχυση του ικού γενώματος έχει ολοκληρωθεί (Ozburn M.A. and Meyers C. 1998). Η L2 καψιδιακή πρωτεΐνη που, όπως και η L1, παράγεται σε μια υποομάδα κυττάρων που εκφράζουν την E4 (Doorbar J. et al., 1997). Έλλειψη της L2 δεν επιδρά στη συναρμολόγηση των ικών σωματίων, η παρουσία της όμως φαίνεται να ενισχύει το πακετάρισμα του ικού DNA (Stauffer Y. et al., 1998, Zhou J. et al., 1993) και τη μολυσματικότητα (Roden R.B. et al., 2001). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1, εκφράζεται μετά την L2 επιτρέποντας τη συναρμολόγηση μολυσματικών ικών σωματίων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (Florin L. et al., 2002). Οι papillomaviruses δεν είναι λυτικοί και δεν απελευθερώνονται μέχρι να φτάσουν τα μολυσμένα κύτταρα στην επιθηλιακή επιφάνεια (Laimins L.A. 1996, Doorbar J. 2005). Για να είναι μολυσματικός ο ιός πρέπει τελικά να διαφύγει από τα μολυσμένα επιδερμικά κύτταρα και να επιβιώσει εξωκυτταρικά πριν μολύνει και πάλι. Ακόμη, οι HPV είναι ανθεκτικοί στην αφυδάτωση (Roden R.B. et al., 1997) και η εξωκυτταρική τους επιβίωση μπορεί να ενισχυθεί εάν αποβληθούν από την επιθηλιακή επιφάνεια μέσα σε κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο (Bryan J.T. and Brown D.R. 2001).

1.4.6. Κυτταρική εξαλλαγή και καρκίνος του τραχήλου

Όταν οι HPVs συνδέονται με καλοήθεις όγκους, το ικό γένωμα αντιγράφεται ως εξωχρωμοσωμικό επίσωμα χωριστά από το DNA των κυττάρων ξενιστών (Laimins L.A. 1996, Goodman A. & Wilbur D.C. 2003). Εν αντιθέσει, στους περισσότερους κακοήθεις όγκους το ικό DNA ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (Εικόνα 4.3.) (Schwarz E. et al., 1985, Stoler M.H. et al., 1992, Park T.W. et

al., 1995). Κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσης το ιικό DNA διακόπτεται. Η διακοπή μπορεί να συμβεί σε διάφορες περιοχές του ιικού γενώματος (π.χ. E2, E4, E5, L2 ή L1) όμως συνήθως συμβαίνει στην E1/E2 περιοχή οδηγώντας στην απώλεια των περιοχών αυτών. Απώλεια του E2 γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών (Bouvard V. et al., 1994, Steger G. and Corbach S. 1997). Αυξημένη έκφραση των E6 και E7, έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων του ξενιστή και στο σχηματισμό όγκου (Doorbar J. et al., 1991, Bosch F.X. et al., 1992, Pett M.R. et al., 2004). Η ενσωμάτωση, και τοιουτοτρόπως, η απώλεια κάποιων περιοχών (π.χ. του L1 γονιδίου), είναι η σημαντικότερη αιτία των ψευδώς αρνητικά αποτελεσμάτων στην ανίχνευση του HPV (Andersson S. et al., 2003). Αυτό γιατί, τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα ανίχνευσης, βασισμένα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ενισχύουν αυτήν την περιοχή του γενώματος.

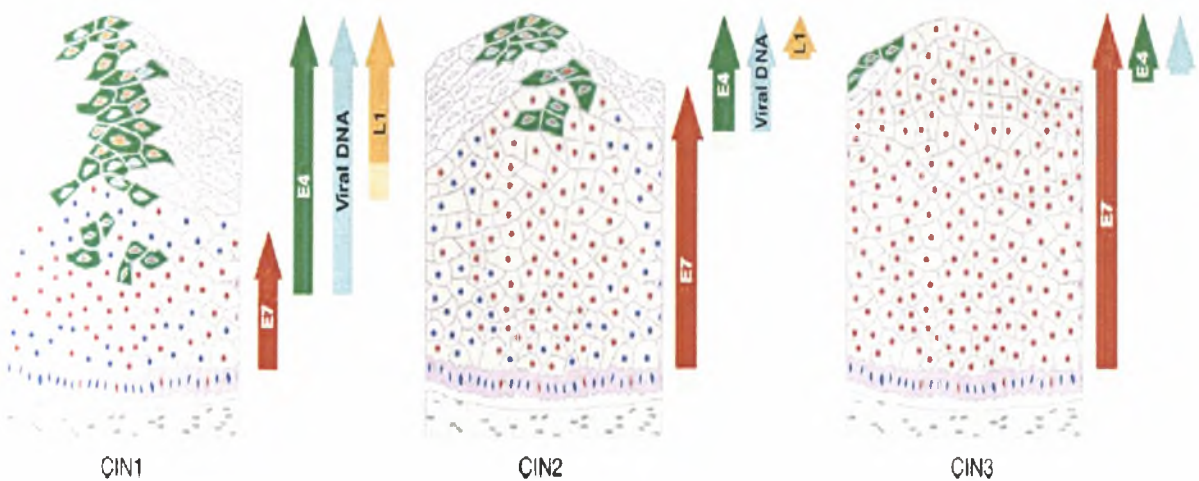


Εικόνα 4.3. Ιική ενσωμάτωση στα καρκινικά κύτταρα. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA συχνά διακόπτει το E2 ORFs. Το χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή αναπαρίσταται με έντονη γραμμή (Dell G and Gaston K. 2001).

Η ενσωμάτωση του ιού στο γενωμικό DNA του κυττάρου ξενιστή σχετίζεται με την μετάβαση από πολυκλωνική σε μονοκλωνική κατάσταση, στα CIN (cervical intraepithelial neoplasia) και αυτά τα γεγονότα παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην εξέλιξη από χαμηλού βαθμού σε υψηλού βαθμού τραχηλική νεοπλασία (Steenbergen R.D. et al., 2005, Ueda Y. et al., 2003, Gross G.E. and Barrasso R. 1997).

Η πρώτη ανιχνεύσιμη παθολογική κατάσταση είναι η τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία πρώτου βαθμού (cervical intraepithelial neoplasia grade I) CIN I. Το πρότυπο της ιικής μεταγραφής στη CIN I είναι όμοιο με της παραγωγικής μόλυνσης, με όλα τα πρώιμα γονίδια και όψιμα γονίδια να εκφράζονται στα τελικά

διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα (εικόνα 4.4.). Σε πολλές περιπτώσεις χαμηλού βαθμού CIN I, το κύτταρο θεραπεύεται από τον ιό και επιστρέφει σε μορφολογικά φυσιολογική κατάσταση.



Εικόνα 5.4. Αλλαγές στον κύκλο ζωής του HPV 16 κατά την ανάπτυξη τραχηλικού καρκίνου. Κατά τη διάρκεια της προόδου από τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία πρώτου βαθμού (CIN1) σε CIN3, η φυσιολογική ρύθμιση του κύκλου ζωής του papillomavirus χάνεται. Τα CIN1 γενικά μοιάζουν με παραγωγικές μολύνσεις από HPV τύπους της ομάδας άλφα και εκφράζουν ιικές πρωτεΐνες του περιβλήματος στην επιθηλιακή επιφάνεια. Στις CIN2 και CIN3 κακώσεις, τα γεγονότα του κύκλου ζωής δεν αλλάζουν αλλά η έκταση έκφρασης της E7 αυξάνεται (Doorbak J. 2005).

Στα CIN II και CIN III η ιική μεταγραφή είναι πολύ διαφορετική, καθώς η έκφραση των πρώιμων γονιδίων αυξάνεται, ενώ των όψιμων γονιδίων μειώνεται ή απουσιάζει (Bosch F.X. et al., 1995, Das B.C. et al., 1992., ter Meulen J. et al., 1992, Riou G. et al., 1990, Choo K.B. 1987). Σε αυτές τις περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA διακόπτει τα γονίδια E1/E2 με τις συνέπειες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Όταν η βλάβη προοδεύει σε μεταστατικό καρκίνο μόνο η ενσωματωμένη μορφή του ιού μπορεί να ανιχνευθεί (Doorbak J. 2005). Ο ενσωματωμένος ιός δεν μπορεί πλέον να επανέλθει σε επισωματική μορφή.

Γενικά, η ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου θεωρείται μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων, όπου ο HPV είναι απαραίτητος (IARC/WHO, 1995, Park T.W. et al., 1995) αλλά από μόνος του ανεπαρκής αιτία (Walboomers J.M. et al., 1999, Steenbergen R.D. et al., 2005). Η ασθένεια, μπορεί να αναπτυχθεί μόνο όταν υπάρχει επίμονη μόλυνση από HPV στο τραχηλικό επιθήλιο. Ο καρκίνος του τραχήλου συνδέεται με τους HPV υψηλού κινδύνου και κάθε παθολογική ή δυσπλασιακή βλάβη του τραχήλου είναι εν δυνάμει κακοήθης και μπορεί, με το χρόνο, να καταλήξει σε καρκίνο.

1.5. Διάγνωση των μολύνσεων με HPVs

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

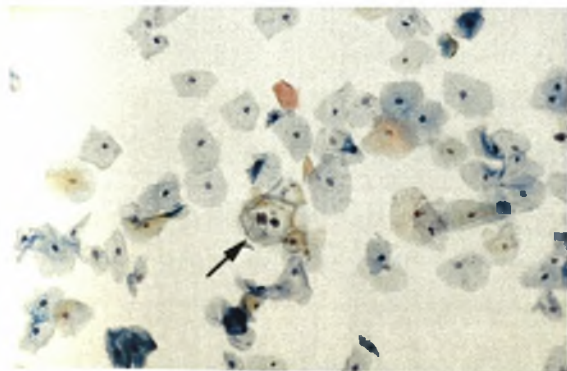
1.5.1. Κυτταρολογική εξέταση για HPV

Η βασική μέθοδος για την ανίχνευση των υψηλού κινδύνου HPV είναι η εξέταση Παπανικολάου (Pap test) (Papanicolaou G.N. 1949). Η μέθοδος ονομάστηκε έτσι από τον ερευνητή γιατρό Γεώργιο Παπανικολάου, που εισήγαγε αυτή τη μέθοδο το 1949 πριν ακόμη γίνει γνωστή η αιτία του καρκίνου του τραχήλου. Από τότε που εισήχθει η μέθοδος, το test Pap βοήθησε στη μείωση των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου και του ρυθμού θνησιμότητας περίπου στα μισά με δύο τρίτα (Kurman R.J. et al., 1994, Singer A. 1995). Το test Pap είναι ένα εργαλείο σάρωσης, το οποίο εξετάζει για μεταλλαγές στα κύτταρα της ζώνης μετασχηματισμού του τραχήλου. Συχνά αυτές οι αλλαγές προκαλούνται από τον HPV.

Η διαδικασία ωστόσο του Pap test έχει κάποιους περιορισμούς. Έχουν αναφερθεί ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ποσοστό 20 έως 30%. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα δύναται να ληφθούν από το σχηματισμό συμπαγούς μάζας των κυττάρων όταν τα κύτταρα δεν απλώνονται όμοια και σταθερά στην μικροσκοπική πλάκα. Μερικές φορές, άλλα περιεχόμενα του τραχηλικού δείγματος όπως αίμα, βακτήρια και μύκητες μολύνουν το δείγμα και εμποδίζουν την ανίχνευση ανώμαλων κυττάρων. Λάθη δειγματοληψίας είναι πιθανόν η βασική αιτία για τη μη ορθή ερμηνεία. Το μέσο επίχρισμα κυττάρων σε ένα test Pap περιέχει 50.000 με 300.000 κύτταρα που πρέπει να εξεταστούν. Εάν το δείγμα περιέχει λίγα μόνο ανώμαλα κύτταρα σε ένα πλήθος φυσιολογικών κυττάρων, τότε τα ανώμαλα κύτταρα μπορεί

εύκολα να χαθούν. Για αυτό το λόγο, έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για τη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων (Hutchinson, M.L. et al., 1994). Σε αυτές τις μεθόδους, το δείγμα συλλέγεται σε διάλυμα συντήρησης αντί να απλώνεται απευθείας στην μικροσκοπική πλάκα με το χέρι. Έτσι οι κυτταρικές δομές συντηρούνται καλύτερα διότι τα κύτταρα στερεώνονται αμέσως. Υπάρχουν δύο ενδεδειγμένες από την Food and Drug Administration (FDA) κυτταρολογικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην παρασκευή μια υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων (Austin R.M. et al., 1998, Howell L.P. et al., 1998). Αυτές είναι το PrepStain σύστημα (το άλλοτε AutoCyte PREP σύστημα) και η ThinPrep Pap smear μέθοδος.

Οι δύο αυτές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μονής στιβάδας στο πλακίδιο διαφέρουν λίγο αλλά οι γενικές αρχές είναι ίδιες. Στο PrepStain σύστημα, τραχηλικά δείγματα συλλέγονται σε διάλυμα συντήρησης βασισμένο στην αιθανόλη. Το συντηρημένο δείγμα, καθαρίζεται χρησιμοποιώντας φυγοκέντρηση με διαβάθμιση πυκνότητας, ώστε να απομακρυνθούν τα φλεγμονώδη και τα υπόλοιπα κύτταρα που δε χρησιμοποιούνται στη διάγνωση. Το καθαρό κυτταρικό δείγμα, καθιζάνει από την διαφορά βαρύτητας πάνω σε μια καλυμμένη κολλώδη μικροσκοπική πλάκα εντός ενός κύκλου διαμέτρου 13mm. Το πλακίδιο αυτοματοποιημένα βάφεται με μια τροποποιημένη χρώση Παπανικολάου, χρησιμοποιώντας ξεχωριστή χρωστική για κάθε πλακίδιο. Στην ThinPrep Pap smear μέθοδο, το δείγμα κυττάρων συλλέγεται σε διάλυμα συντήρησης ρυθμισμένο με αλκοόλη. Το συντηρημένο δείγμα, αναμειγνύεται και διασκορπίζεται ήπια με υψηλής ταχύτητας περιστροφή για να διασφαλιστεί ομοιογενής δειγματοληψία των υλικών που έχουν αφαιρεθεί από τον τράχηλο. Έπειτα χρησιμοποιείται κενό για να περάσουμε το εναιώρημα μέσω πολυανθρακικού φίλτρου. Ένας μικροεπεξεργαστής ελέγχει τον αριθμό των κυττάρων που αποτίθενται στο φίλτρο. Τα φιλτραρισμένα κύτταρα κατόπιν μεταφέρονται αυτόματα σε ένα μονόστιβο μέσω επαφής του φίλτρου με ένα γυάλινο μικροσκοπικό πλακίδιο. Μετά επιτελείται χρώση Παπανικολάου με τις τυπικές εργαστηριακές τεχνικές (εικόνα 5.1.).



Εικόνα 5.1. Εικόνα από το σύστημα ThinPrep Pap smear όπου φαίνονται τα ανώμαλα πλακώδη κύτταρα.(Burd EM 2003).

1.5.2. Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση του HPV-DNA

Συλλογή του δείγματος και απομόνωση νουκλεϊκού οξέος για HPV-DNA ανάλυση:

Οι αναλύσεις HPV-DNA μπορεί να επιτελεσθούν χρησιμοποιώντας τα ίδια δείγματα που χρησιμοποιούνται στην κυτταρολογική εξέταση (Sherman M.E. et al., 1997). Ωστόσο, τραχηλικά επιχρίσματα είναι ένα μικρό μόνο δείγμα του τραχηλικού επιθηλίου και δειγματοληπτικά σφάλματα μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της εξέτασης. Μόνο μια μερίδα του εναιωρήματος των τραχηλικών κυττάρων χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA και μόνο ένα κλάσμα αυτού χρησιμοποιείται για ειδική ανίχνευση του DNA. Για το λόγο αυτό, εάν ένα δείγμα περιέχει περιορισμένο αριθμό HPV-DNA αντιγράφων, δειγματοληπτικά σφάλματα μπορεί να παράγουν αντιφατικά αποτελέσματα ακόμη και με μια ευαίσθητη μέθοδο. Επιπλέον, το αποτέλεσμα μιας HPV-DNA μεθόδου μπορεί να ποικίλει εξαρτώμενη από τον καταμήνιο κύκλο (van Ham M.A. et al., 2002, Harper D.M. et al., 2003).

Η σταθερότητα του δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και αποθήκευσης είναι επίσης σημαντικές παράμετροι (Burd E.M. 2003). Το ιικό νουκλεϊκό οξύ πρέπει να διατηρηθεί, ώστε να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που προκαλούνται από την αποικοδόμηση του από ενδογενής ενδονουκλεάσες. Για να υπολογίσουμε την ακεραιότητα του γενωμικού DNA και την καταλληλότητά του για μοριακή ανάλυση, επαρκείς έλεγχοι, όπως η ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης, είναι κρίσιμοι. Διάφορα εμπορικά διαθέσιμα kits δειγματοληψίας, αρχικά προορισμένα για την κυτταρολογία (π.χ. PreservCyt, Cytoc Corp.) διατηρούν επαρκώς τα νουκλεϊκά οξέα για τη μοριακή διάγνωση ακόμη και μετά από μακροχρόνια αποθήκευση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Sherman M.E. et al., 1997). Μια ευρεία ποικιλία μεθόδων είναι διαθέσιμες για την εκχύλιση του DNA, η επιλογή της οποίας εξαρτάται από την προέλευση και την ποιότητα των υλικών της κλινικής δοκιμασίας και το διαγνωστικό έλεγχο που θα χρησιμοποιηθεί.

Ανίχνευση του ιικού DNA:

Η ανίχνευση του ιικού DNA θεωρείται ένα βοηθητικό εργαλείο εξέτασης στην κυτταρολογία του τραχήλου και μπορεί να αποτελέσει ένδειξη κινδύνου καρκίνου του τραχήλου. Το DNA του HPV μπορεί να ανιχνευθεί σε τραχηλικά επιχρίσματα και δείγματα βιοψίας με μοριακές μεθόδους, όπως ο “*in situ*” υβριδισμός (Sato S. et al., 1998). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση σημασμένων ανιχνευτών (probe), οι

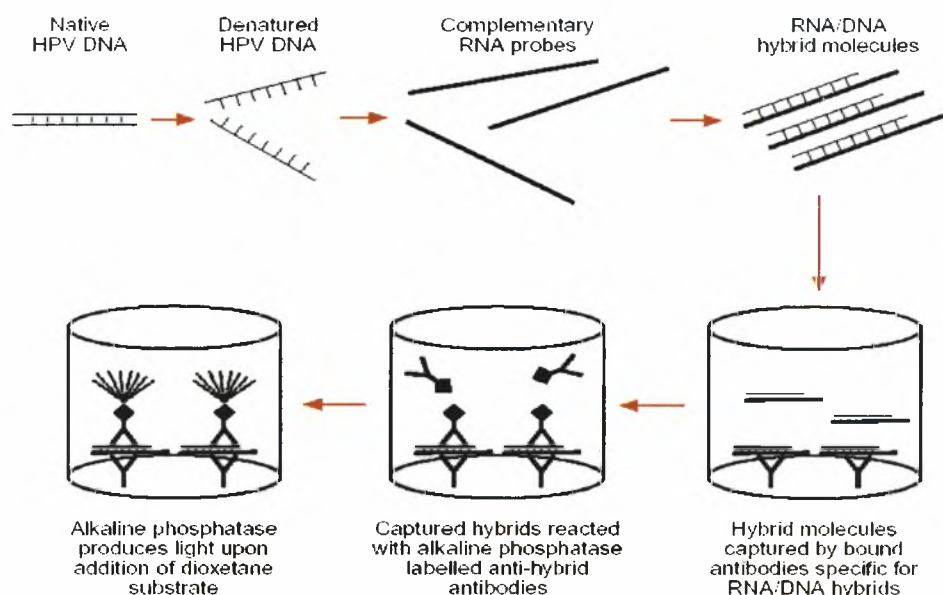
οποίοι υβριδίζονται στο ενδοκυτταρικό HPV-DNA. Εναλλακτικά, το HPV-DNA μπορεί να απομονωθεί άμεσα από κλινικά δείγματα και να ανιχνευθεί με Southern blot ή dot spot υβριδισμό. Παρόλα αυτά, τέτοιες μέθοδοι είναι επίπονες και κατά συνέπεια ανίκανες για τον έλεγχο πολλών δειγμάτων (Kuypers J.M. et al., 1993, Melchers W. et al., 1989). Ενίσχυση σήματος στον ISH (in situ hybridization) μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τυραμίδιο για την ενίσχυση του σήματος (TSA; Zehbe I. et al., 1997), αλλά το κατώφλι ανίχνευσης παραμένει χαμηλό και είναι δύσκολο να επιτευχθεί σταθερή ανίχνευση. Συνεπώς, παρά το ενδιαφέρον των κυτταρολόγων, η μέθοδος δεν έχει υιοθετηθεί σε μεγάλης κλίμακας ελέγχους για HPV. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία όπως και η ειδικότητα της ανίχνευσης DNA του HPV.

Υβριδισμός σε υγρή φάση: το Hybrid Capture II σύστημα:

Το Hybrid Capture II σύστημα, (HC2, Digene Corp., USA) είναι μια μη-ραδιενεργή μέθοδο ενίσχυσης σήματος, βασιζόμενη στον υβριδισμό σε διάλυμα συνθετικών σημασμένων RNA probes με το HPV DNA στόχο (Bozzetti M. et al., 2000, Lorincz A.T. 1996). Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα εύρος RNA ανιχνευτών, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες από 13 υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) και 5 χαμηλού κινδύνου (6, 11, 42, 43, και 44) HPV τύπους, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να παρασκευάσουν υψηλού κινδύνου και χαμηλού κινδύνου μείγματα ανιχνευτών, αντίστοιχα. Αυτά τα μείγματα πρέπει να χρησιμοποιηθούν χωριστά και δεν παρέχουν πληροφορίες για το γενότυπο που ανιχνεύθηκε, δίνοντας ένα θετικό αποτέλεσμα όταν το ιικό DNA οποιουδήποτε μέλους της ομάδας είναι παρόν. Επιπλέον, για να ανιχνεύσουμε τόσο του υψηλού όσο και του χαμηλού κινδύνου τύπους, είναι αναγκαίο να γίνουν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Αυτό αυξάνει το κόστος της διαδικασίας, και για το λόγο αυτό από την HC2 μέθοδο χρησιμοποιείται μόνο το μίγμα των υψηλού κινδύνου τύπων.

Για να διεξάγουμε το τεστ, τα κύτταρα που ελήφθησαν από τον τράχηλο υποβάλλονται λύση σε διάλυμα ώστε να ελευθερωθεί το DNA, συμπεριλαμβανομένου και οποιουδήποτε HPV-DNA το οποίο μπορεί να είναι παρόν (εικόνα 5.2.). Το DNA αποδιατάσσεται, και το μονόκλωνο ιικό DNA στόχος επωάζεται με τους RNA ανιχνευτές κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν το σχηματισμό υβριδίων RNA-DNA. Αντισώματα συνδεδεμένα στο τοίχωμα των

πηγαδιών της μικροπλάκας αναγνωρίζουν εξειδικευμένα την τρισδιάστατη δομή των υβριδίων RNA-DNA και “συλλαμβάνουν” αυτά τα μόρια. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα δεύτερη αντίδραση με αντισώματα που βρίσκονται στο διάλυμα και είναι αντί του υβριδίου τα οποία είναι συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση. Περίσσεια αντισωμάτων και μη υβριδισμένοι ανιχνευτές απομακρύνονται με πλύσιμο και τα ακινητοποιημένα υβρίδια ανιχνεύονται με προσθήκη υποστρώματος dioxetane το οποίο αντιδρά με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης με αποτέλεσμα την εμφάνιση φωτός. Το παραγόμενο φως μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός.



Εικόνα 5.2. Hybrid Capture II μέθοδος για την ανίχνευση του human papillomavirus DNA (Davies P. et al., 2001).

Αυτή η μέθοδος έχει καθιερωθεί σε πολλές χώρες, χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές μελέτες και έχει εγκριθεί από το FAD (Food and Drug Administration). Το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου είναι ισοδύναμο με περίπου 5000 αντίγραφα ιικού γενώματος, καθιστώντας τη, λιγότερο ευαίσθητη μέθοδο από την PCR (Cope J.U. et al., 1997, Smits H.L. et al., 1995). Επιπλέον διασταυρούμενες αντιδράσεις μπορεί να μειώσουν την κλινική σημασία των θετικών αποτελεσμάτων (Solomon D. et al., 2001, Vernon S.D. et al., 2000, Poljak M. et al., 2002). Παρόλα αυτά, το HC2 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κλινικές δοκιμασίες παγκοσμίως και φαίνεται να είναι μια μέθοδος ελέγχου εύρωστη και με μεγάλη αναπαραγωγισιμότητα (Castle P.E. et al., 2004a). Πρόσφατα έχουν αναφερθεί και δοκιμασίες της αυτόματης τρίτης γενιάς μεθόδου Hybrid Capture (Castle P.E. et al., 2004).

1.5.3. Συστήματα που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ενίσχυσης DNA στόχου, χρησιμοποιώντας μια θερμοκυκλική διεργασία και ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές αμφίπλευρα της περιοχής που ενδιαφερόμαστε να ενισχύσουμε, παρουσία θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Έχουν γίνει δύο προσεγγίσεις για την ανίχνευση του HPV-DNA με την PCR είναι: PCR ειδικού τύπου και PCR ευρέου φάσματος.

PCR ειδικού τύπου:

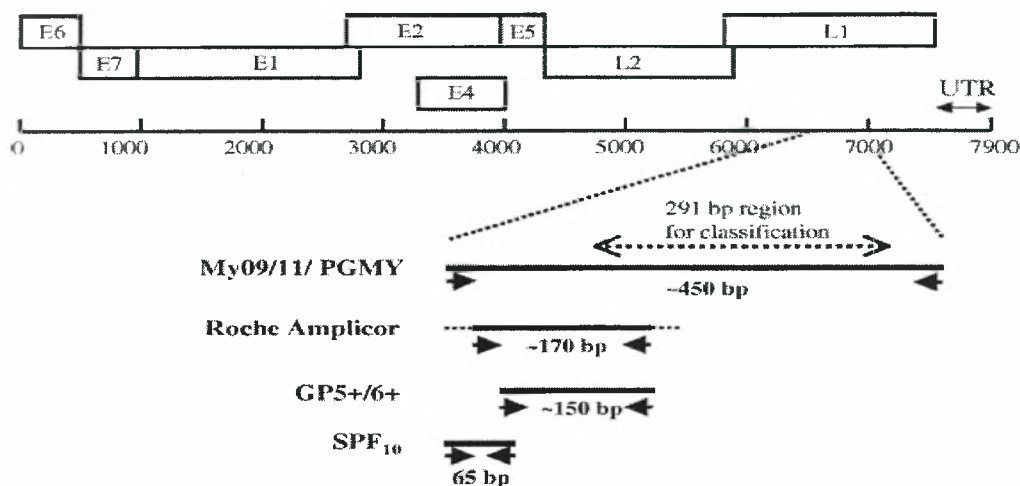
Οι PCR ειδικού τύπου βασίζονται στις αλληλουχικές ποικιλομορφίες που παρουσιάζουν τα γονίδια E6 και E7 των υπότυπων HPV. Έχουν αναπτυχθεί σαράντα ειδικού τύπου PCRs για τους HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68) οι οποίες στοχεύουν σε ένα κομμάτι περίπου 100 bp εντός του E7 ORF (Walboomers, J.M.M. et al., 1999). Εμπεριέχονται και εκκινητές για τον εσωτερικό έλεγχο ώστε να ανιχνευθούν πιθανόν ανασταλτικές ουσίες. Η αναλυτική ευαισθησία αυτών των μεθόδων είναι μεταξύ 10 και 200 αντιγράφων HPV ανά δείγμα, ανάλογα με τον HPV τύπο. Οι ειδικού τύπου PCRs γενικώς χρησιμοποιούνται στις ερευνητικές εφαρμογές εφόσον η παραγωγή είναι περιορισμένη από την ανάγκη χρήσης πολλαπλών PCR για κάθε δείγμα.

PCR ευρέου φάσματος:

Στις PCR ευρέου φάσματος οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές των HPV (Hildesheim A. et al., 1994). Καθότι το L1 γονίδιο είναι το πιο συντηρημένο τμήμα του γενώματος, αρκετά εκκινητικά ζεύγη στοχεύουν σε αυτήν την περιοχή (εικόνα 5.3.) (Hildesheim A. et al., 1994). Επίσης, έχουν περιγραφεί γενικοί εκκινητές για το E1 γονίδιο και έχουν αναφερθεί διάφοροι άλλοι ευρέου φάσματος εκκινητές, αλλά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε κλινικούς ελέγχους (Tieben L.M. et al., 1993). Τρεις διαφορετικά σχεδιασμένοι εκκινητές γενικού τύπου μπορούν να επιτύχουν ευρέου φάσματος ανίχνευση του HPV-DNA.

Το πρώτο ζεύγος περιλαμβάνει έναν forward και έναν reverse εκκινητή, οι οποίοι στοχεύουν σε μια συντηρημένη περιοχή, αλλά είναι πλήρως συμπληρωματικοί μόνο σε έναν ή λίγους HPV γενότυπους. Για να αντισταθμιστούν οι αταίριαστες βάσεις

(mismatches) με άλλους HPV γενότυπους, η PCR επιτελείται σε χαμηλή θερμοκρασία αποδιάταξης. Το GP5+/6+ σύστημα είναι ένα παράδειγμα αυτής της προσέγγισης (Jacobs M.V. et al., 1995, 1997, de Roda Husman A.M. et al., 1999).



Εικόνα 5.3. Σχηματική αναπαράσταση του HPV-DNA γενώματος, σε γραμμική μορφή. Υποδεικνύονται οι θέσεις των πρώιμων (E) και όψιμων (L) γονιδίων καθώς και η μη κωδικοποιούμενη περιοχή (UTR) καθώς και οι θέσεις των τεσσάρων ευρέως χρησιμοποιούμενων σετ εκκινητών CPI/II (Tieben L.M. et al., 1993), MY09/11 (Manos M.M. et al., 1989, Hildesheim A. et al., 1994, Bauer H.M. 1996), GP5+/6+ (Jacobs M.V. et al., 1997, de Roda Husman A.M. et al., 1999), SPF₁₀ (Kleter B. et al., 1998) και της μεθόδου Roche Amplicor HPV με τα αντίστοιχα μεγέθη των προϊόντων που ενισχύουν. Το 291 bp κομμάτι που χρησιμοποιείται για την επίσημη ταξινόμηση των HPV γενότυπων (Chan S.Y. et al., 1995, de Villiers E.M. et al., 2004) φαίνεται στην L1 περιοχή (Molijn A. et al., 2005).

Η δεύτερη κατηγορία γενικών εκκινητών PCR περιλαμβάνει forward και reverse εκκινητές, οι οποίοι περιέχουν εκφυλισμένες βάσεις για να αντισταθμίσουν τις διαφορές που υπάρχουν στις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών. Αυτοί οι εκκινητές δεν είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αποδιάταξης. Το MY09/11 είναι ένα παράδειγμα εκφυλισμένου εκκινητικού ζεύγους (Hildesheim A. et al., 1994). Είναι γεγονός, ότι αυτό το εκκινητικό ζεύγος περιλαμβάνει ένα πολυσύνθετο μίγμα από πολλά διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια. Το μειονέκτημα αυτού του σχεδιασμού είναι ότι η σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν εκφυλισμένες βάσεις δεν μπορεί να αναπαραχθεί πολύ καλά και τα αποτελέσματα από παρτίδα σε παρτίδα ποικίλουν. Για το λόγο αυτό, κάθε νέα παρτίδα εκκινητών πρέπει να εκτιμηθεί προσεκτικά, ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης για κάθε HPV γενότυπο (Gravitt P.E. et al., 2000).

Η τρίτη επιλογή είναι να συνδυάσουμε έναν αριθμό διακριτών forward και reverse εκκινητών, που στοχεύουν στην ίδια θέση του ιικού γενώματος. Αυτοί οι εκκινητές δεν περιέχουν τυχαίους εκφυλισμούς, αλλά μπορεί να περιέχουν ινοσίνη, η οποία ταιριάζει με οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Η χρήση καθορισμένου μίγματος μη-

εκφυλισμένων εκκινητών έχει το πλεονέκτημα ότι τα νουκλεοτίδια μπορεί να συντεθούν με υψηλή ικανότητα αναπαραγωγής και η PCR επιτελείται στην άριστη θερμοκρασία αποδιάταξης. Παράδειγμα τέτοιων εκκινητικών ζευγών είναι οι PGMY εκκινητές (Gravitt P.E. et al., 2000) και οι SPF₁₀ εκκινητές (Kleter B. et al., 1998). Το PGMY σύστημα εκκινητών αναπτύχθηκε για να εξαλείψει τους περιορισμούς του MY09/11 εκφυλισμένου συστήματος εκκινητών. Οι PGMY09/11 αποτελούνται από δύο μη εκφυλισμένα μίγματα ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένοι να ενισχύουν την ίδια, 450 bp περιοχή του L1 γονιδίου όπως και οι αρχικοί MY09/11 εκκινητές. Το upstream PGMY11 μίγμα εκκινητών συντίθεται από πέντε ολιγονουκλεοτίδια, ενώ το downstream PGMY09 μίγμα περιέχει 13 εκκινητικά μόρια..

Εκτός από την επιλογή των εκκινητών, το μέγεθος του τμήματος που θα ενισχυθεί είναι επίσης σημαντικό. Γενικά, η αποδοτικότητα μιας αντίδρασης PCR μειώνεται καθώς μεγαλώνει το μέγεθος του τμήματος προς ενίσχυση. Κλινικά δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως μονιμοποίηση με φορμαλίνη και έγκλιση σε παραφίνη, έχουν κακής ποιότητας DNA. Επομένως, η απόδοση των εκκινητών που παράγουν μικρό προϊόν είναι μεγαλύτερη από εκείνων που ενισχύουν μεγαλύτερο κομμάτι (Kleter B. et al., 1998, Park T. C. et al., 2004).

PCR ειδικού τύπου έναντι PCR ευρέου φάσματος:

Ειδικού τύπου εκκινητές σχεδιασμένοι να ενισχύουν αποκλειστικά ένα μόνο γενότυπο HPV μπορεί να χρησιμοποιηθούν, αλλά για την ανίχνευση της παρουσίας του HPV-DNA για ένα μόνο δείγμα, πρέπει να επιτελεστούν χωριστά πολλαπλές, ειδικού τύπου PCR αντιδράσεις. Αυτή η μέθοδος είναι επίπονη, υψηλού κόστους και η ειδικότητα κάθε ζεύγους εκκινητών πρέπει να αξιολογηθεί. Αντίθετα, οι γενικοί PCR εκκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα γενοτύπων HPV.

Real-time PCR:

Η real-time PCR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση HPV-DNA. Οι ειδικού τύπου εκκινητές μπορεί να συνδυαστούν με φθορίζοντες ανιχνευτές για απευθείας ανίχνευση (Josefsson A.M. et al., 2000, Tucker R.A. et al., 2001, Ylitalo N. et al., 2000). Ωστόσο, το να χρησιμοποιούμε πολλαπλούς διαφορετικούς ειδικού τύπου εκκινητές, σε μια αντίδραση είναι τεχνικά δύσκολο. Ευρέου φάσματος PCR

εκκινητές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην real-time PCR (Strauss S. et al., 2000, Cubie H.A. et al., 2001), αλλά είναι λιγότερο εύχρηστοι στο να ποσοτικοποιήσουν σε σχέση με ένα ειδικού τύπου σύστημα εκκινητών. Εξαιτίας της ετερογένειας των αλληλουχιών των διαφόρων γενοτύπων του ιού, η ταυτοποίηση των PCR προϊόντων από την PCR ευρέου φάσματος απαιτεί μίγμα ανιχνευτών και εφόσον όλοι έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά υβριδισμού, η τυποποίηση είναι δύσκολη (Hart K.W. et al., 2001).

RT-PCR:

Είναι επίσης πιθανό να κοιτάξουμε για ειδικό ιικό RNA ενσωματώνοντας ένα βήμα αντίστροφης-μεταγραφής πριν την PCR. Αν και η πλειονότητα των στρατηγικών ανίχνευσης του HPV που χρησιμοποιούνται στις επιδημιολογικές μελέτες και στον κλινικό χειρισμό είναι μέχρι τώρα βασιζόμενες στο DNA, η ανίχνευση έκφρασης των ογκογονιδίων του HPV μπορεί να έχει μεγάλη κλινική αξία. Για παράδειγμα, ο Lamarca L. et al. (2002) ανέπτυξε μια real-time PCR για τα E7 μετάγραφα των HPV-16 και 18 και πρότεινε ότι μπορεί να είναι πιο ειδική για την ανίχνευση συμπτωματικών μολύνσεων. Από την άλλη, ο Wang-Johanning F. et al., 2002 περιέγραψαν μια HPV-16 E6/E7 ποσοτική real-time RT-PCR και βρήκαν ότι η έκφραση αυξάνεται αναλογικά με τη σοβαρότητα της κάκωσης.

1.5.4. Ανίχνευση και ανάλυση των ενισχυμένων με PCR προϊόντων

Το προϊόν ενίσχυσης της PCR μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα με μια τυπική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ωστόσο, επακόλουθη ανάλυση ειδική της αλληλουχίας αυξάνει πολύ τόσο την ευαισθησία όσο και την εξειδίκευση της δοκιμασίας. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον σκοπό αυτό.

PCR και ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμήματος (PCR-RFLP):

Μετά την ενίσχυση με PCR, η σύνθεση της αλληλουχίας του PCR προϊόντος μπορεί να διερευνηθεί με περιοριστικά ένζυμα (Bernard H.U. et al., 1994, Poljak M. and Seme K. 1996). Πέψεις των PCR προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγουν έναν αριθμό από τμήματα DNA διαφορετικών μεγεθών, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, αποδίδοντας ένα συγκεκριμένο πρότυπο ζωνών. Έχει αποδειχθεί ότι η RFLP ανάλυση είναι πολύτιμη στην ταυτοποίηση πολλαπλών HPV γενοτύπων όπως επίσης και στην ανίχνευση νέων HPV τύπων (Bernard H.U. et

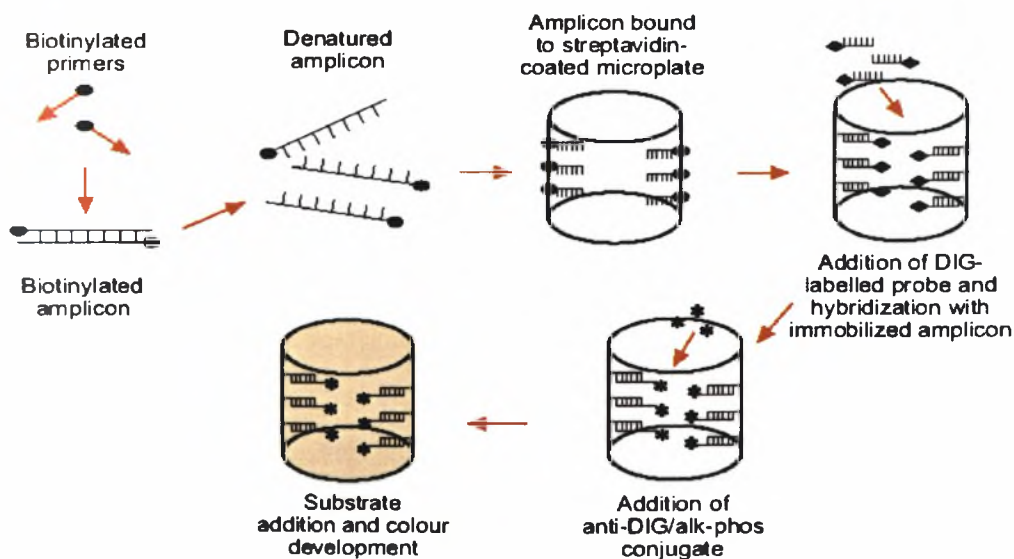
al., 1994, Lungu O, et al., 1992). Αυτή η μέθοδος είναι σχετικά απλή, αλλά χρονοβόρα. Πιο σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι η μέθοδος στηρίζεται στην ύπαρξη περιοριστικών ενζύμων ικανών να εντοπίζουν συγκεκριμένες μεταβολές. Συνεπώς, η ανίχνευση πολλαπλών γενοτύπων HPV, οι οποίοι εμφανίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο κλινικό δείγμα, με PCR-RFLP είναι συνήθως πολύπλοκη διαδικασία και η ευαισθησία, στην ανίχνευση μειωμένης γενοτύπων, περιορισμένη (Grce M. et al., 2000).

Ανάλυση υβριδισμού των PCR προϊόντων:

Ένας κοινός τρόπος για να ερευνησουμε την αλληλουχία των PCR προϊόντων είναι ο υβριδισμός με έναν ή περισσότερους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Τα προϊόντα της PCR ειδικού τύπου μπορούν να επιβεβαιωθούν με αντίστοιχους ειδικού τύπου ανιχνευτές. Η αρχική μέθοδος είναι η Southern blotting, όπου το PCR προϊόν ηλεκτροφορεύεται, μετά μεταφέρεται σε μεμβράνη και ακολούθως υβριδίζεται με σεσημασμένους ανιχνευτές (Kuypers J.M. et al., 1993). Ωστόσο, η Southern blotting είναι επίπονη και δεν είναι κατάλληλη για εφαρμογές ρουτίνας. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικά συστήματα υβριδισμού.

Υβριδισμός σε μικροπλάκα:

Για να αυξήσουμε την παραγωγή μιας διαγνωστικής δοκιμασίας, υβριδισμοί με ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές μπορεί να διεκπεραιωθούν σε μικροπλάκα (εικόνα 5.4.) (Jacobs M.V. et al., 1997, Kornegay J.R. et al., 2001).



Εικόνα 5.4. Υβριδισμός σε μικρο-πλάκα για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR. DIG=digoxigenin (Davies P. et al., 2001).

Σήμανση με βιοτίνη ενός εκ των δυο εκκινητών προκαλεί σήμανση του PCR προϊόντος το οποίο μετά συλλαμβάνεται μέσα σε πηγαδάκια μικρόπλάκας καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται κάτω από αλκαλικές συνθήκες και ο μη-συνδεδεμένος κλώνος απομακρύνεται με πλύσιμο. Σημασμένος με διγοξιγενίνη DNA ανιχνευτής (DIG-labelled) προστίθεται και υβριδίζεται με τον συνδεδεμένο κλώνο. Τα υβρίδια μπορούν να ανιχνευθούν με μια αντίδραση πρόσδεσης του συζευγμένου προϊόντος με το υπόστρωμα. Κατά την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται ένα σύμπλεγμα αντί-DIG/αλκαλικής φωσφατάσης, το οποίο προσδένεται στο σημασμένο DIG υβρίδιο του ανιχνευτή, ακινητοποιώντας έτσι την φωσφατάση μέσα στο πηγαδάκι και αυτό μόνο όταν ο ανιχνευτής υβριδίζεται με την συμπληρωματική DNA αλληλουχία. Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει μια έγχρωμη αντίδραση μετά από προσθήκη υποστρώματος. Η ένταση του χρώματος μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλο όργανο ανάγνωσης.

Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR:

Γρήγορες μέθοδοι αλληλούχισης των PCR προϊόντων είναι επίσης πλέον διαθέσιμες, επιτρέποντας την εφαρμογή της σε κλινικές αναλύσεις ρουτίνας (Arens M. 2001). Ωστόσο, ο καθορισμός της αλληλουχίας δεν είναι εφικτός όταν το κλινικό δείγμα περιέχει πολλαπλούς γενότυπους HPV. Οι αλληλουχίες, που αντιπροσωπεύουν μια μειοψηφία ειδών στο σύνολο των προϊόντων της PCR, μπορεί να παραμείνουν μη ανιχνεύσιμες. Αυτό μπορεί να υποτιμήσει την επικράτηση των μολύνσεων από πολλαπλούς γενότυπους HPV, με σημαντικές συνέπειες στον εμβολιασμό ή στις επακόλουθες μελέτες (Kleter B. et al., 1999).

Ο γονότυπος μπορεί να συναχθεί από μια αλληλουχία HPV με δυο μεθόδους. Πρώτον, η αλληλουχία μπορεί να συγκριθεί με μια βάση δεδομένων βάσει της ομολογίας της. Εκτεταμένες βάσεις δεδομένων είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο και η πρόσβαση είναι ελεύθερη στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Το λογισμικό BLAST (Altschul S.F. et al., 1990), επιτρέπει γρήγορες έρευνες για την εύρεση ομόλογων αλληλουχιών σε μια συνεχώς ανανεώσιμη βάση δεδομένων. Δεύτερον, μπορούν να πραγματοποιηθούν φυλογενετικές αναλύσεις. Η καινούρια αλληλουχία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια πολλαπλή ομοπαράθεση με μια σειρά από γνωστές HPV αλληλουχίες αντιπροσωπευτικές των διαφόρων HPV γενότυπων. Βασιζόμενοι στην ομοπαράθεση της αλληλουχίας, μπορούμε να κατασκευάσουμε φυλογενετικό δέντρο, δίνοντας έτσι μια γραφική αναπαράσταση των εξελικτικών

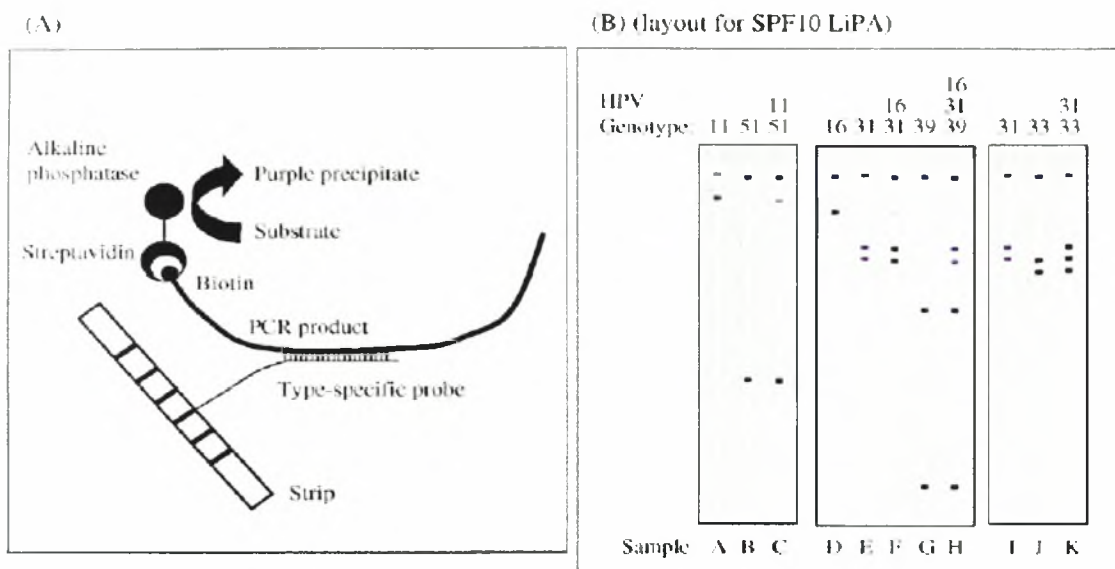
σχέσεων μεταξύ της αλληλουχίας που ανιχνεύσαμε με αλληλουχίες που έχουν ήδη αναφερθεί και να συνάγουμε τον γενότυπο. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η επίσημη ταξινόμηση των γενοτύπων είναι ολοκληρωτικά βασισμένη στην ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας του ιικού γενώματος, ενώ η ταυτοποίηση του γενότυπου κλινικών δειγμάτων συντελείται με ανάλυση ενός περιορισμένου, αλλά αντιπροσωπευτικού τμήματος του γενώματος.

Αντίστροφος υβριδισμός:

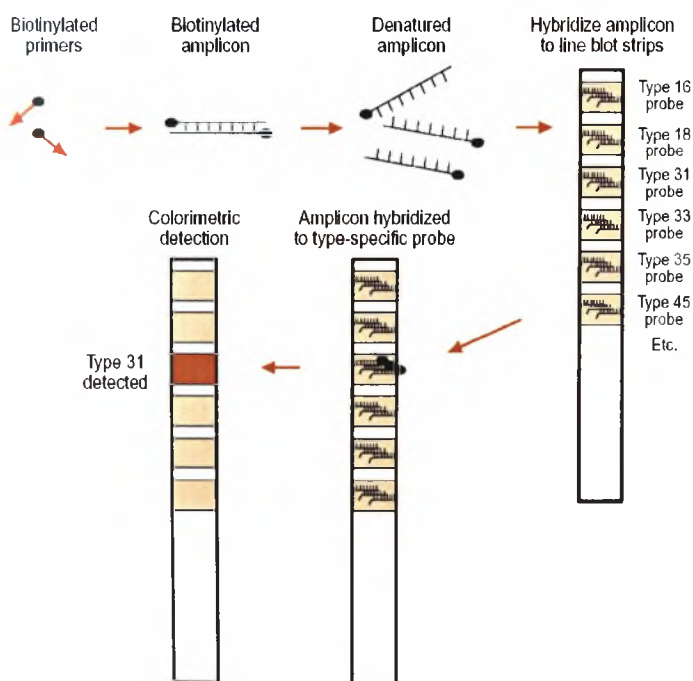
Ο αντίστροφος υβριδισμός αποτελεί ένα ελκυστικό εργαλείο για ταυτόχρονο υβριδισμό του PCR προϊόντος με πολλαπλούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει ακινητοποίηση πολλαπλών DNA ανιχνευτών σε μια στερεή φάση και προσθήκη του PCR προϊόντος στην υγρή φάση. Μετά τον υβριδισμό ακολουθεί ένα στάδιο ανίχνευσης.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνολογία αντίστροφου υβριδισμού είναι η line probe assay (LiPA) ή line blot assay (LBA) ή linear array (LA) (Quint W.G. et al., 2001, Kleter B. et al., 1999, Melchers W. et al., 1999, Gravitt P.E. et al., 1998, Coutlée F. et al., 1997). Οι μέθοδος αυτή βασίζεται στον υβριδισμό του ενισχυμένου με PCR προϊόντος με ειδικούς DNA ανιχνευτές οι οποίοι έχουν ακινητοποιηθεί σε ταινίες νάιλον ή νιτροκυτταρίνης (Εικόνα 5.5. και 5.6.). Για να μπορούμε να διακρίνουμε τον τύπο του ιού, ανιχνευτές για συγκεκριμένους HPV τύπους προσδένονται στην ταινία σε ευδιάκριτες παράλληλες γραμμές και σε καθορισμένες θέσεις έτσι ώστε υβριδισμός του προϊόντος στη συγκεκριμένη γραμμή να ταυτοποιεί τον τύπο. Σε αυτήν την μέθοδο το προϊόν της PCR παράγεται, χρησιμοποιώντας συνήθως βιοτινυλιωμένους εκκινητές. Το δίκλωνο PCR προϊόν αποδιατάσσεται υπό αλκαλικές συνθήκες και προστίθεται στην ταινία σε συνθήκες που επιτρέπουν τον ειδικό υβριδισμό του με τους ακινητοποιημένους ανιχνευτές. Μετά τον υβριδισμό και το πλύσιμο της ταινίας, τα υβρίδια μπορούν να ανιχνευθούν με την προσθήκη αλκαλικής φωσφατάσης συνδεδεμένης με στρεπταβιδίνη. Η στρεπταβιδίνη προσδένεται στη βιοτίνη και ακινητοποιεί την αλκαλική φωσφατάση στην περιοχή όπου έχει συμβεί υβριδισμός. Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρώματος μετά από προσθήκη υποστρώματος και έτσι έχουμε τη δημιουργία έγχρωμης γραμμής όπου έχει συμβεί υβριδισμός του PCR προϊόντος με ένα συγκεκριμένο ανιχνευτή. Μετρώντας τη θέση της έγχρωμης γραμμής, συγκρίσει με μία καθιερωμένη γραμμή αναφοράς είναι εφικτός ο προσδιορισμός του τύπου. Αυτή

η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση πολλαπλών γενοτύπων HPV σε ένα μόνο βήμα και χρειάζεται ένα περιορισμένο μόνο ποσό του PCR προϊόντος. Ένα παράδειγμα της HPV LiPA φαίνεται στην εικόνα 5.5.



Εικόνα 5.5. Σχηματική αναπαράσταση και παράδειγμα αντίστροφου υβριδισμού της HPV line probe μεθόδου. (A) Το ενισχυμένο προϊόν της PCR αποδιατάσσεται και υβριδίζεται με τους ανιχνευτές που είναι ακινητοποιημένοι σε παράλληλες γραμμές στην ταινία. Μετά από αυστηρό πλύσιμο, τα υβρίδια ανιχνεύονται με έγχρωμη αντίδραση η οποία επιτυγχάνεται με την αλκαλική φωσφατάση συνδεδεμένης με στρεπταβιδίνη και ένα υπόστρωμα. (B) Πρότυπα υβριδισμού, τα οποία μπορούν να ερμηνευτούν οπτικά μετά από ομοπαράθεση με μια ταινία αναφοράς με τις θέσεις των ανιχνευτών, από δείγματα που περιέχουν μονούς ή πολλαπλούς HPV τύπους (Molijn A. et al., 2005).



Εικόνα 5.6. Line-blot υβριδισμός για τον προσδιορισμό του ειδικού τύπου προϊόντος της PCR (Davies P. et al., 2001).

Εναλλακτικές μέθοδοι αντίστροφου υβριδισμού για τους HPV και την ταυτοποίηση του γενότυπου είναι η line blot ανάλυση χρησιμοποιώντας τους PGMY

εκκινητές (Lazcano-Ponce E. et al., Gravitt P.E. et al., 2001, 2001, Vernon S.D. et al., 2000, Gravitt P.E. et al., 1998, Coutlée F. et al., 1999) και αντίστροφη line blot για τους GP5+/6+ (van den Brule A.J. et al., 2002). Οι μέθοδοι αντίστροφου υβριδισμού είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανίχνευση ειδικού τύπου μολύνσεων και πολλαπλούς γενότυπους.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Πλασμίδια

Χρησιμοποιήθηκαν 8 πλασμίδια που περιείχαν το L1 γονίδιο 8 διαφορετικών τύπων HPV. Αυτά ήταν για τους HPV 6, 16, 18, 31, 33, 39, 42 και 66. Τα πλασμίδια ήταν ευγενική προσφορά του Dr. M. Favre, Unité des Papillomavirus Institut Pasteur Paris.

2.2. Δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν 43 δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα τα οποία προσφέρθηκαν από την Δρ. Ε. Πανοτοπούλου, Τμήμα Ιολογίας ΚΟΕΠΣ Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΑΟΝΑ "ΑΓ. ΣΑΒΒΑΣ". Τα δείγματα συλλέχθηκαν μεταξύ του 2003 και 2005 σε υγρό μέσο ThinPrep και διατηρήθηκαν στους -20°C . Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Ονομασίες κλινικών δειγμάτων

Δείγματα				
659	691	721	743	793
665	696	725	745	795
666	700	727	746	796
667	706	730	747	868
673	709	731	748	879
674	710	732	751	885
675	712	736	752	899
676	715	738	757	
689	717	739	759	

2.3. Εκχύλιση του γενετικού υλικού

Αρχικά, 1 ml από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 rcf για 5 min στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο εναπομείναν ίζημα ακολούθησε η εκχύλιση του DNA σύμφωνα με τον Casas I. et al., 1996. Στο ίζημα προστέθηκαν με καλή ανάδευση 20 $\mu\text{g}/\text{tube}$ γλυκογόνου και 600 μl Lysis Buffer (GuSCN: 4 M, N-lauroyl sarcosine 0,5%, Dithiothreitol (DDT) 1 mM, Κιτρικό Νάτριο 25 mM) και επώαστηκε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστέθηκαν 800 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) έγινε καλή ανάδευση και επώαση στους -20°C για 20 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rcf για 10 min στους 4°C , απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 1 ml 70% παγωμένης

αιθανόλης, καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση για 10 min στις 14000 rcf στους 4 °C. Τελικά, το ίζημα διαλύεται με καλή ανάδευση σε 100 µl ddH₂O (RNase DNase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

2.4. Εκκινητικά μόρια

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ενίσχυση PCR με τρία διαφορετικά εκκινητικά ζεύγη: το GP5+ και GP6+, το εκφυλισμένο ζεύγος MY09 και MY11, και το μίγμα εκκινητών PGMY09 και PGMY11 των οποίων οι αλληλουχίες περιγράφονται στον Πίνακα 2.1. Όλοι οι εκκινητές τοποθετούνται εντός της L1 περιοχής του HPV γενώματος. Οι MY09/11 και οι PGMY09/11 ενισχύουν το ίδιο, περίπου 450 βάσεων, τμήμα ενώ οι GP5+/6+ ενισχύουν ένα κομμάτι 140 περίπου βάσεων εντός του προηγούμενου τμήματος.

Πίνακας 2. Περιγραφή εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Εκκινητές	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3') ^a	Μέγεθος (bp) ^c	References
GP5+ GP6+	Sense Antisense	TTTGGTTACTGTGGTAGATAC Y AC GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	140	Jacobs et al., 1995
MY09 MY11	Sense Antisense	CGTCCMARRGGAWACTGATC GCMAGGGWCTATAAYAATGG	450	Manos et al., 1989
PGMY11-A PGMY11-B PGMY11-C PGMY11-D	Sense Sense Sense Sense	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG		
PGMY11-E PGMY09-F PGMY09-G PGMY09-H PGMY09-I ^b PGMY09-J PGMY09-K PGMY09-L PGMY09-M PGMY09-N PGMY09-P ^b PGMY09-Q PGMY09-R HMB01	Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense Antisense	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC G CCA AGG GGA AAC TGA TC CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC G CCC AAC GGA AAC TGA TC CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT	450	Gravitt et al. 2000

^a μεταβλητή νουκλεοτιδική θέση είναι με έντονο χρώμα και σημαίνει M = A ή C, R = A ή G, W = A ή T, Y = C ή T.

^b PGMY09-I και PGMY09-P είναι 18 bp σε μέγεθος.

^c το μέγεθος του προϊόντος της PCR ποικίλει σε κάθε τύπο HPV.

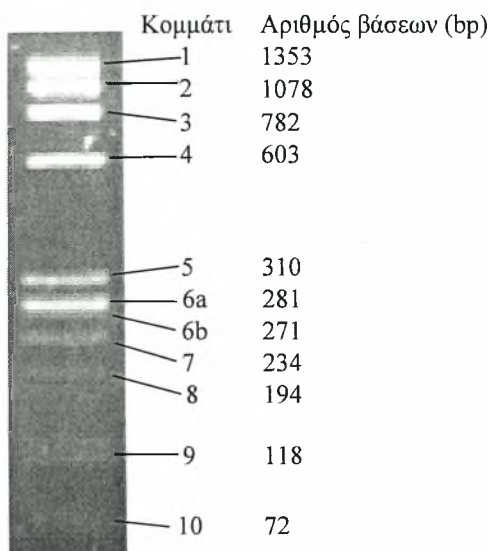
2.5. PCR

Για την επιβεβαίωση της ακεραιότητας του DNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR ενός housekeeping γονιδίου (β-γλοβουλίνη) από όλα τα δείγματα (Resnick R.M., et al., 1990). Έτσι πραγματοποιήθηκε αρχικά μια PCR με τους εκκινητές της β-γλοβουλίνης GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') και PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') για να καθοριστεί η παρουσία κυτταρικού DNA (Vahey M.T., et al., 1995) και συγχρόνως η ύπαρξη αναστολέων της PCR.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μίγμα περιείχε 10X PCR buffer, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 3 mM για τους εκκινητές PGMY09/11, 4 mM για το ζεύγος GP5+/6+ και 6 mM για το MY09/11, 2U DNATaq Polymerase (Promega Corporation Madison WI, USA), 1 μl από κάθε εκκινητικό μόριο (50 pmol) και 3 μl από το εκχυλισμένο DNA. Όσον αφορά τους εκκινητές PGMY παρασκευάστηκαν δύο μίγματα εκκινητών ένα sense (Pool A) και ένα antisense (Pool B) 25 pmol οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία sense-antisense 2:5. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε στο Eppendorf Master Cycler για 40 κύκλους με τις ακόλουθες παραμέτρους: βήμα αποδιάταξης για 50 s στους 95 °C, βήμα υβριδοποίησης για 30 s στους 45 °C (GP5+/6+ και PGMY) ή 55 °C για 60 s (MY09/11), βήμα επιμήκυνσης για 60 s στους 72 °C. Ο τελευταίος κύκλος επεκτάθηκε για 15 min στους 78 °C για να διεκπεραιωθεί η ολοκλήρωση των προϊόντων του γονιδιακού πολλαπλασιασμού της PCR.

Κάθε PCR περιείχε έναν αρνητικό μάρτυρα από DNA κυττάρων απομονωμένο από κυτταροκαλλιέργεια (π.χ. Vero, MRC5, Rd) και ένα θετικό μάρτυρα, συνήθως κάποιο πλασμίδιο.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 200V. Για να καθορίσουμε το μέγεθος των ζωνών, τα προϊόντα έτρεξαν έναντι μάρτυρα μοριακού βάρους \varnothing X 174 RF DNA/HaeIII Digest του οποίου τα τμήματα έχουν τα παρακάτω μεγέθη:



Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στο πήκτωμα της αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.7. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμήματος (RFLP)

Για να διασφαλιστεί ότι το πρότυπο πέψης είναι μοναδικό για κάθε HPV τύπο, πήραμε από την βάση δεδομένων NCBI Genbank τις αλληλουχίες των παρακάτω HPV τύπων: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 54, 58, 59 και 66. Με τη χρήση του Gene Runner βρέθηκαν οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών στο L1 γονίδιο για να προσδιοριστεί η ακριβής αλληλουχία του τμήματος που ενισχύεται, για κάθε προαναφερθέν τύπο, επιλέχθηκαν τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στις πέψεις και προσδιορίστηκαν θεωρητικά τα τμήματα των πέσεων που αναμένονται για κάθε τύπο. Για να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια της μεθόδου η ανάλυση RFLP έγινε τόσο στα πλασμίδια όσο και στα δείγματα.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το: *Rsa I* (Takara Biotechnology, Japan), *Hae III* (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) *Hinf I* (Takara Bio Inc, Japan) και *BstO I* (Promega Corporation Madison WI, USA). Τα προϊόντα των PGMY09/11 και GP5+/6+ PCR κόπηκαν με τα ένζυμα που φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3. Ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις τρεις διαφορετικές πέψεις των PCR προϊόντων.

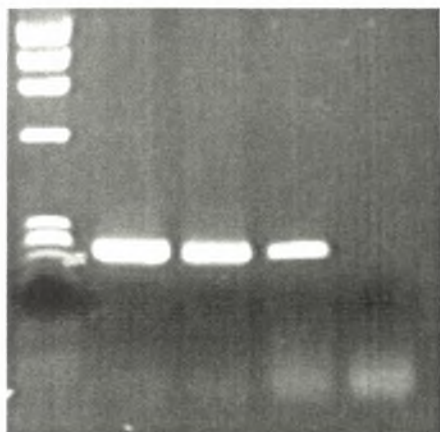
Προϊόν PCR	Ένζυμο περιορισμού		
PGMY09/11	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>
GP5+/6+	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>BstO I</i>

Η πέψη του PGMY09/11-PCR προϊόντος πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl ενώ του GP5+/6+-PCR προϊόντος έγινε σε τελικό όγκο 28 μl. Το μίγμα της πέψης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα του εκάστοτε ενζύμου και 20 U από κάθε ένζυμο εκτός του *BstO I* που ήταν 10 U, το *Rsa I* περιείχε επιπλέον και 2 μl 0,1% BSA ενώ το *BstO I* 0,2μl 10μg/μl acetylated BSA. Για την πέψη του προϊόντος της PGMY09/11-PCR χρησιμοποιήθηκαν 3-10 μl, ανάλογα με την απόδοση της ενίσχυσης ενώ για το προϊόν της GP5+/6+-PCR 20 μl. Προστέθηκε ddH₂O μέχρι του τελικού όγκου. Κατόπιν τα μίγματα επωάστηκαν για 2 h στους 37 °C εκτός του *BstO I* το οποίο επωάστηκε για 2 h στους 60 °C. Για να σταματήσουμε την αντίδραση προσθέσαμε 5 μl Loading Buffer. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (MetaPhor FMC BioProducts, Rockland, Maine USA), ενώ η οπτική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο ακριβής προσδιορισμός του μήκους τμήματος των προϊόντων πέψης έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος GelPro3.2 Analyser.

3. Αποτελέσματα

Τα κλινικά δείγματα αρχικά εξετάστηκαν για την παρουσία DNA με τους εκκινητές της β-γλοβουλίνης. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση β-γλοβουλίνης. Στην εικόνα 1. φαίνονται ενδεικτικά αποτελέσματα της PCR με γλοβουλίνη.

M 1 2 3 4

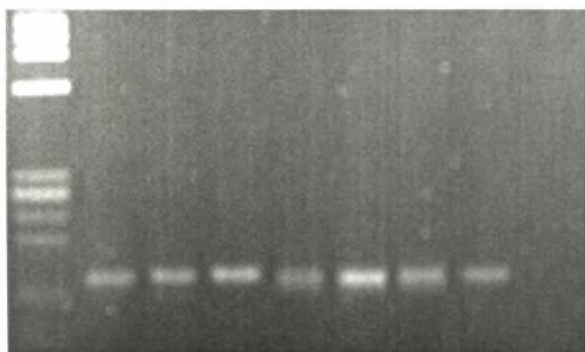


Εικόνα 1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης τμημάτων που ενισχύθηκαν με PCR για την γλοβουλίνη. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους με 1, 2, 3 τα κλινικά δείγματα 665, 669, 666 και με 4 ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

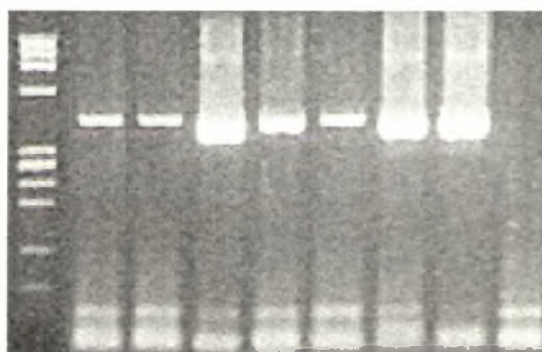
3.1. Αποτελέσματα ενίσχυσης των πλασμιδίων με PGMY09/11 και GP5+/6+ PCR

Τα 8 πλασμίδια υποβλήθηκαν σε PCR με τα ζεύγη εκκινητών PGMY09/11 και GP5+/6+ και πήραμε την ακόλουθη εικόνα. (εικόνα 2.)

M 1 2 3 4 5 6 7 8



(α)

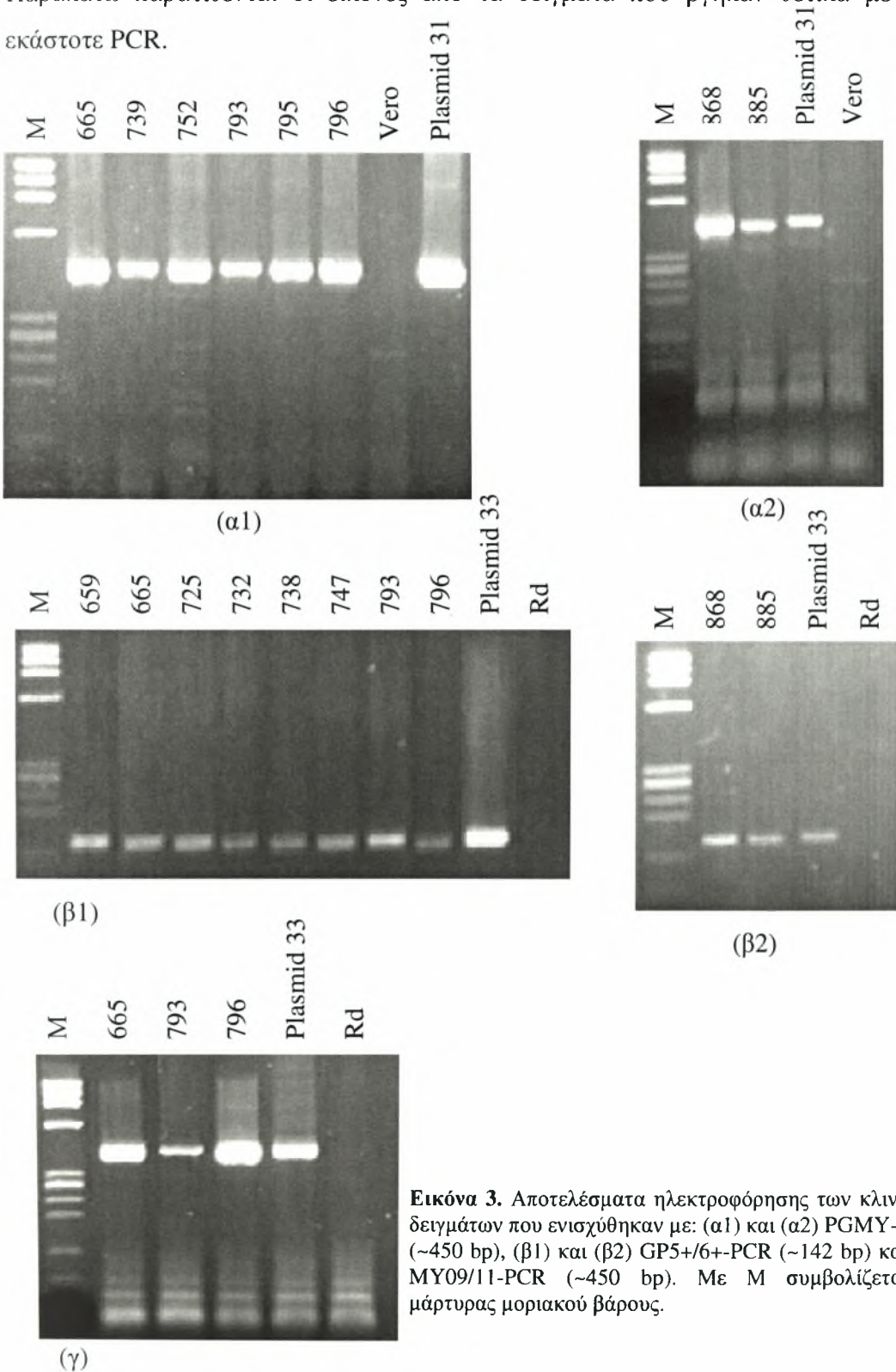


(β)

Εικόνα 2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης τμημάτων που ενισχύθηκαν με PCR. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους με 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 τα πλασμίδια που φέρουν το L1 γονίδιο για τα πλασμίδια 6, 16, 18, 31, 33, 42 και 66 αντίστοιχα και με 8 ο αρνητικός μάρτυρας Rd. (α) GP5+/6+ (~142 bp) και (β) PGMY09/11 (~450 bp).

3.2. Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων και με τα τρία εκκινητικά ζεύγη

Τα 43 κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR και με τα τρία εκκινητικά ζεύγη. Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες από τα δείγματα που βγήκαν θετικά με την εκάστοτε PCR.



Εικόνα 3. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν με: (α1) και (α2) PGMY-PCR (~450 bp), (β1) και (β2) GP5+/6+-PCR (~142 bp) και (γ) MY09/11-PCR (~450 bp). Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 1. Παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε δείγμα τα αποτελέσματα PCR με τα εκκινητικά μόρια PC04/GH20, PGMY09/11, GP5+/GP6+ και MY09/11

Δείγμα	PC04/GH20	PGMY09/11	GP5/GP6	MY09/11
659	+	-	+	-
665	+	+	+	+
666	+	-	-	-
667	+	-	-	-
673	+	-	-	-
674	+	-	-	-
675	+	-	-	-
676	+	-	-	-
689	+	-	-	-
691	+	-	-	-
696	+	-	-	-
700	+	-	-	-
706	+	-	-	-
709	+	-	-	-
710	+	-	-	-
712	+	-	-	-
715	+	-	-	-
717	+	-	-	-
721	+	-	-	-
725	+	-	+	-
727	+	-	-	-
730	+	-	-	-
731	+	-	-	-
732	+	-	+	-
736	+	-	-	-
738	+	-	+	-
739	+	+	-	-
743	+	-	-	-
745	+	-	-	-
746	+	-	-	-
747	+	-	+	-
748	+	-	-	-
751	+	-	-	-
752	+	+	-	-
757	+	-	-	-
759	+	-	-	-
793	+	+	+	+
795	+	+	-	-
796	+	+	+	+
868	+	+	+	*
879	+	-	-	*
885	+	+	+	*
899	+	-	-	*

* Στα δείγματα δεν έγινε PCR MY09/11

+ Θετικό αποτέλεσμα

- Αρνητικό αποτέλεσμα

3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης πολυμορφισμού των πλασμιδίων

Για να βρούμε τα πρότυπα από τα κοψίματα των πλασμιδίων χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Gene Runner. Τα αποτελέσματα που θεωρητικά περιμένουμε από τις πέψεις των PCR προϊόντων PGMY09/11 και GP5+/6+ φαίνονται στους πίνακες 2 και 3. αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Πρότυπα πέψεις των κυριότερων HPV που ενισχύθηκαν με PGMY09/11.

HPV	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>
6	161, 149, 72, 67	234, 215	217, 124, 108
11	216, 136, 72, 26	234, 216	217, 125, 108
16	310, 72, 70
18	135, 125, 85, 72, 38
31	378, 72	237, 213	328, 122
33	236, 102, 72, 39	234, 215	...
35	177, 159, 72, 42	...	261, 181, 8
39	260, 123, 72	355, 100	...
42	242, 135, 72	234, 215	...
45	338, 72, 45
51	381, 72	...	379, 74
52	258, 183, 8
54	138, 125, 117, 72	234, 218	217, 127, 108
58	306, 111, 32	235, 214	...
59	399, 56
66

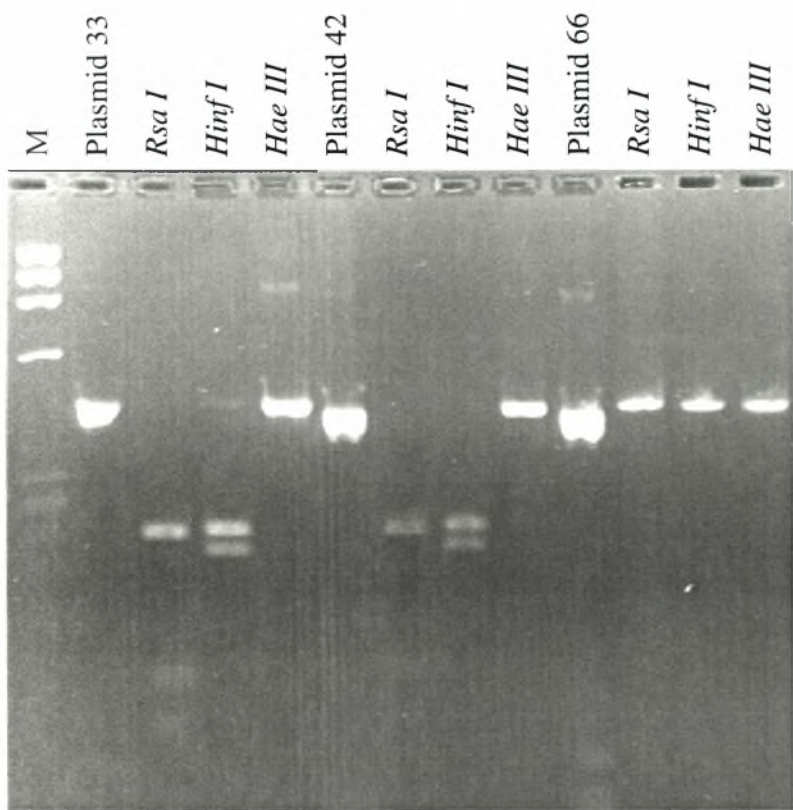
(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο

Πίνακας 3. Πρότυπα πέψεις διαφόρων τύπων HPV που ενισχύθηκαν με GP5+/6+.

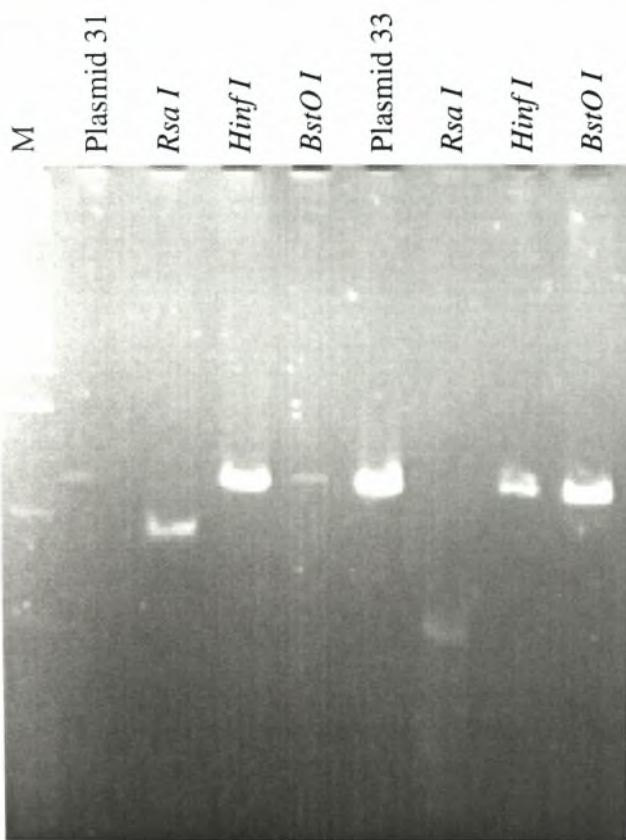
HPV	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>BstO I</i>
6	67, 42, 30
11	109, 30
16	70, 42, 30
18	77, 38, 30	71, 74	...
31	112, 30
33	70, 39, 30
35	70, 42, 30
39	115, 30	108, 37	87, 58
42	109, 30
45	70, 45, 30
51	112, 30
52
54	109, 30
58	69, 38, 32
59
66

(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο

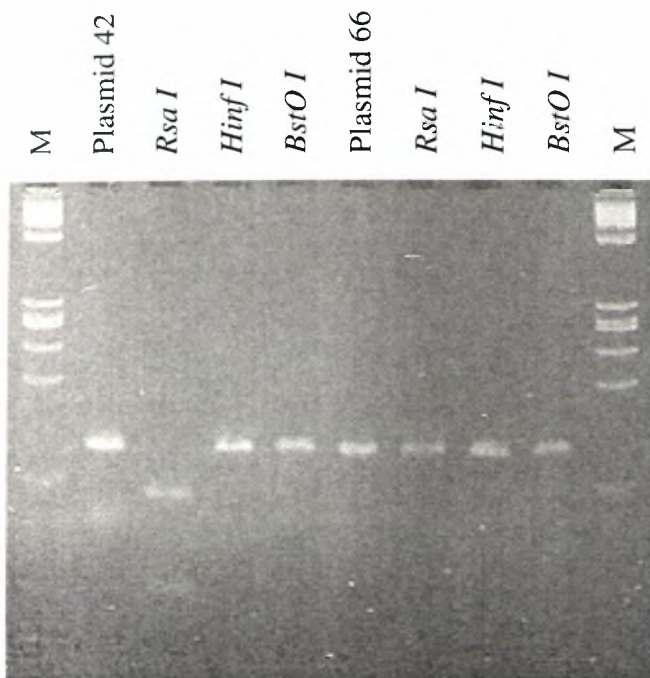
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης 7 πλασμιδίων που ενισχύθηκαν με PGMV09/11-PCR και 4 που ενισχύθηκαν με GP5+/6+ PCR.



(A)



(B)



Εικόνα 4. Στην εικόνα (Α) φαίνονται οι πέψεις των πλασμιδίων 33, 42 και 66 της PGMY-PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *Rsa I*, *Hinf I* και *Hae III* ενώ στις εικόνες (Β) και (Γ) οι πέψεις των πλασμιδίων 31, 33, 42 και 66 που ενισχύθηκαν με GP5+/6+ PCR και κόπηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *Rsa I*, *Hinf I* και *BstO I*. Με Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

(Γ)

Τα πρότυπα που πήραμε από τις πέψεις των πλασμιδίων φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 4. Πρότυπο πέψης των πλασμιδίων που ενισχύθηκαν με PGMY09/11-PCR

HPV	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>
6	161, 149, 72, 67	234, 215	217, 124, 108
16	310, 72, 70
18	135, 125, 85, 72, 38
31	378, 72	...	328, 122
33	236, 102, 72, 39	234, 215	...
39	260, 123, 72	355, 100	...
42	242, 135, 72	235, 215	...
66

(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο

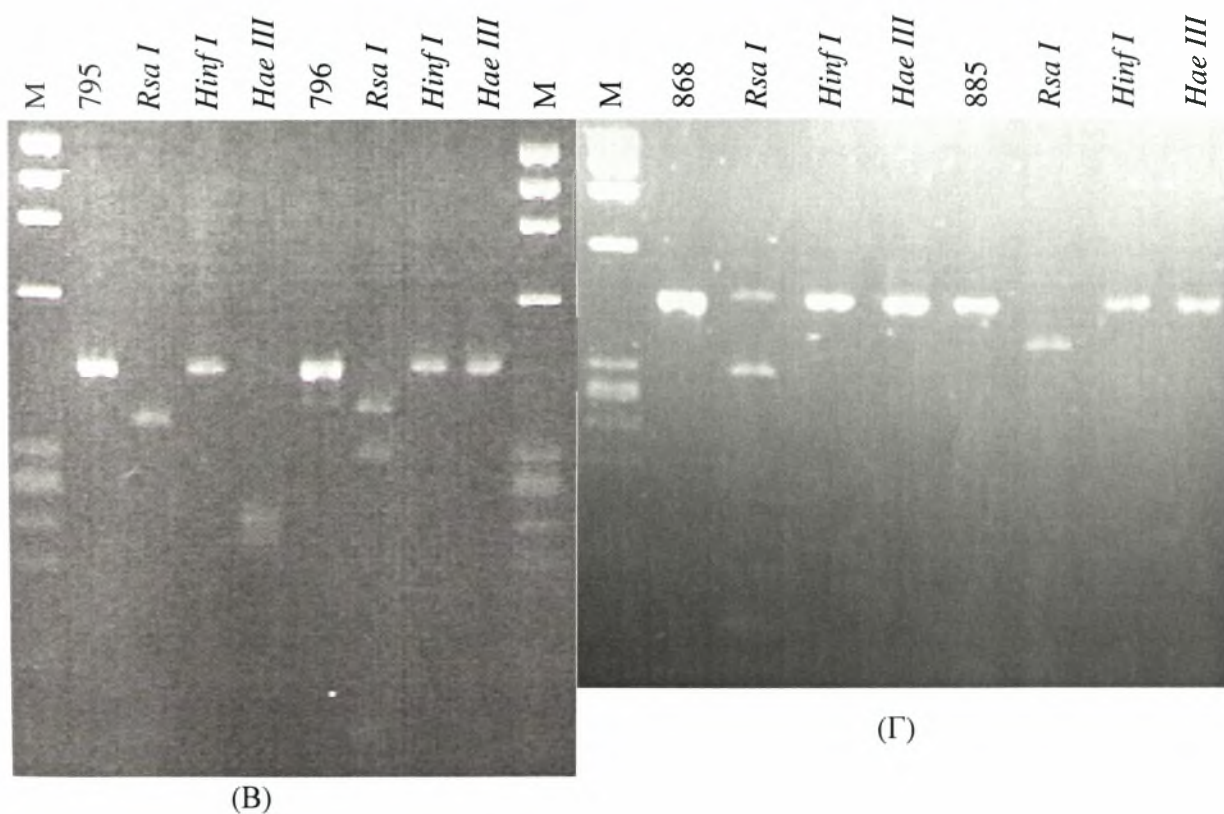
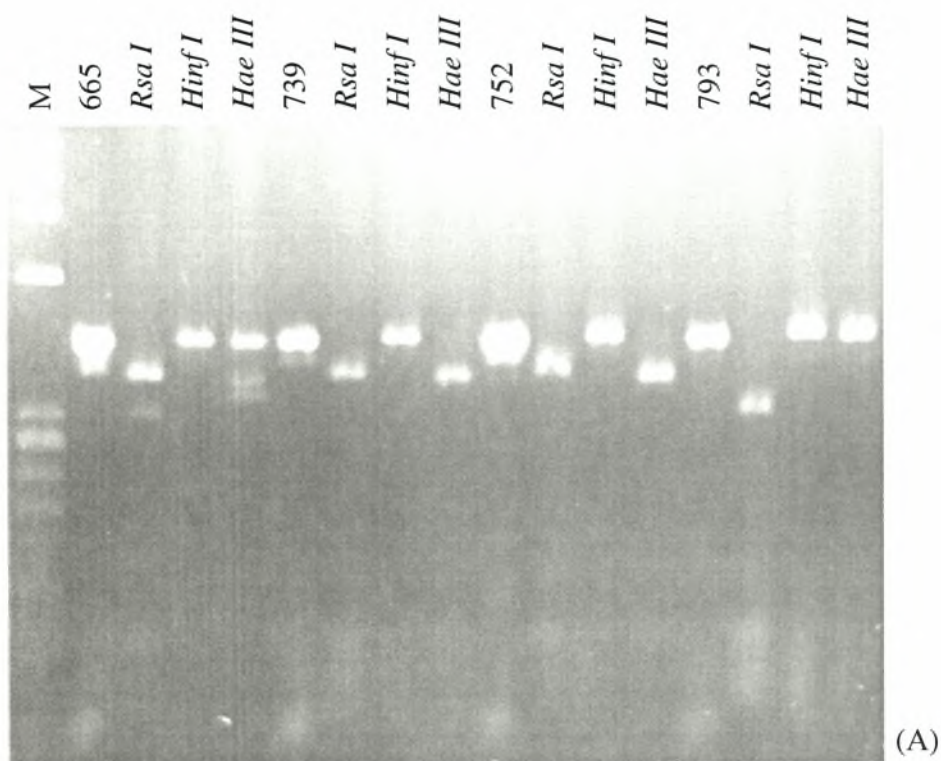
Πίνακας 5. Πρότυπο πέψης των πλασμιδίων που ενισχύθηκαν με GP5+/6+-PCR

HPV	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>BstO I</i>
31	112, 30
33	70, 39, 30
39	115, 30	108, 37	87, 58
42	109, 30
66

(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο

3.4. Αποτελέσματα ανάλυσης πολυμορφισμού των κλινικών δειγμάτων

Τα αποτελέσματα των πέψεων που πραγματοποιήθηκαν στα 8 δείγματα που βγήκαν θετικά με την PGMY09/11-PCR φαίνονται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 5. Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων PGMY09/11-PCR με *Rsa I*, *Hinf I* και *Hae III* των κλινικών δειγμάτων. Με Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Πέψεις του GP5+/6+ προϊόντος πραγματοποιήθηκαν μόνο στα κλινικά δείγματα 868 και 885 λόγω μικρής ποσότητας του PCR προϊόντος των υπόλοιπων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα των πέψεων των κλινικών δειγμάτων συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα πέψεων κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν με PGMY09/11

Δείγματα	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>	Τύπος HPV
665	378, 309, 137, 76	445, 215, 109	445, 372, 350	Μίγμα
739	386, 85	...	371, 78	51
752	384, 85	...	371, 78	51
793	318, 73, 70	16
795	356, 76	...	240, 200	-
796	385, 312, 80, 72	Μίγμα
868	310, 70, 72	16
885	385, 70	-

(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο

(-) Άγνωστος τύπος

Πίνακας 7. Μήκος τμημάτων κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν με GP5+/6+-PCR.

Δείγμα	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>BstO I</i>	HPV τύπος
868	70, 42, 30	16
885	-

(...) Το προϊόν δεν κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο.

(-) Άγνωστος τύπος.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία, έγινε σύγκριση τριών διαφορετικών εκκινητικών συστημάτων PCR ώστε να προσδιοριστεί η ευαισθησία τους στην ανίχνευση των HPV. Σκοπός αυτής της σύγκρισης ήταν η εύρεση της μεθόδου που θα είναι ικανή να ανιχνεύει όλα τα θετικά δείγματα και να μπορεί να εφαρμοστεί σε διαγνωστικό επίπεδο. Τα εκκινητικά ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: το εκφυλισμένο μίγμα εκκινητών MY09/11 (Manos M.M. et al., 1989), το μίγμα εκκινητών PGMY09/11 (Gravitt P.E. et al., 2000), και το GP5+/6+ εκκινητικό ζεύγος (Jacobs M.V. et al., 1997, de Roda Husman A.M. et al., 1999) το οποίο περιέχει ινοσίνες. Για την ταυτοποίηση των διαφορετικών τύπων HPV χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους τμήματος (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Η ανάλυση RFLP, αναπτύχθηκε έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ογκογόνων τύπων HPV, όπως και κάποιων τύπων ενδιάμεσου και χαμηλού κινδύνου. Η μέθοδος αυτή αν και επίπονη, χρησιμοποιήθηκε λόγω της ικανότητας να ταυτοποιεί άμεσα τους HPV υψηλού κινδύνου, να διακρίνει τα μίγματα (Broker T.R. et al., 2001) όπως επίσης και άγνωστους ή νέους τύπους (Bernard H.U. et al., 1994, Chen S. et al., 1994, Lungu O. et al., 1992). Η πιο σίγουρη ωστόσο, μέθοδος για ταυτοποίηση των διαφόρων HPV τύπων είναι η αλληλούχιση. Το μειονεκτήματα όμως της αλληλούχισης είναι το υψηλό κόστος της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα της PCR ανάλυσης δείχνουν ότι υπάρχει διαφορετική αναλυτική ευαισθησία ανάμεσα στα τρία εκκινητικά ζεύγη. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 με την PGMY09/11-PCR, από τα 43 δείγματα, βρήκαμε 8 θετικά δείγματα εκ των οποίων τρία δεν βρέθηκαν θετικά με την GP5+/6+-PCR. Αντίστοιχα, με την GP5+/6+-PCR παίρνουμε 10 θετικά δείγματα εκ των οποίων τα 5 δεν ανιχνεύονται από την PGMY09/11-PCR. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι δύο μέθοδοι έχουν παρόμοια ευαισθησία αλλά παρουσιάζουν διαφορετική συμφωνία, δηλαδή τα θετικά δείγματα που ανιχνεύονται με τα GP5+/6+ δεν είναι τα ίδια με αυτά των PGMY09/11. Έτσι, παρόλο που η GP5+/6+-PCR ανιχνεύει περισσότερα θετικά δείγματα δεν είναι επαρκής από μόνη της για την ανίχνευση όλων των θετικών δειγμάτων.

Από την άλλη, η MY09/11-PCR βρέθηκε λιγότερο ευαίσθητη από τα άλλα δύο συστήματα ενίσχυσης, δίνοντας από τα 39 δείγματα που εξετάστηκαν 3 μόνο θετικά,

τα οποία όμως έχουν βρεθεί θετικά και με τις δυο προηγούμενες μεθόδους, δίνοντας έτσι μια συμφωνία 100%. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που σύγκριναν την αναλυτική ευαισθησία του MY09/11 συστήματος ενίσχυσης τόσο με το PGMY09/11 όσο και με το GP5+/6+ (Remmerbach T.W. et al., 2004, Coutlée F. et al., 2002, Gravitt P.E., et al., 2000). Ο λόγος της ανεπαρκούς ευαισθησίας της MY09/11-PCR μπορεί να οφείλεται στον εκφυλισμό των εκκινητών. Οι εισαγωγές των νουκλεοτιδίων, με βάση τη θέση εκφυλισμού, είναι μια τυχαία και μη αναπαραγόμενη διαδικασία. Διαφορές από παρτίδα σε παρτίδα, ανάμεσα στις χωριστές συνθέσεις των MY09/11 εκκινητών δεν διασφαλίζει ισότιμη αντιπροσώπευση όλων των εκκινητών (Gravitt P.E., et al., 2000).

Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι με συνδυασμό του PGMY09/11 και του GP5+/6+ εκκινητικού συστήματος μπορούμε να έχουμε μια καλή αναλυτική ευαισθησία. Με το συνδυασμό των δύο αυτών μεθόδων είναι δυνατόν να προσδιοριστούν όλα τα θετικά δείγματα. Για περαιτέρω επιβεβαίωση αυτής της θεωρίας, λόγω των λίγων θετικών αποτελεσμάτων, είναι αναγκαία περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Έτσι, θα είναι εφικτός ο ακριβής υπολογισμός της ευαισθησίας της κάθε μεθόδου. Όσον αφορά τους MY09/11 εκκινητές, η χρησιμότητα εφαρμογής τους είναι αμφίβολη (Gravitt P.E., et al., 1998, Harnish D.G. et al., 1999, Qu W. et al., 1997).

Για την RFLP ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *Rsa I*, *Hinf I*, *BstO I* και *Hae III*. Τα ένζυμα αυτά επιλέχθηκαν διότι επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των HPV τύπων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα πρότυπα που δίνει η RFLP ανάλυση είναι ίδια με αυτά που βρήκαμε θεωρητικά, με τη βοήθεια του προγράμματος Gene Runner, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των πλασμιδίων που διαθέταμε. Οι πέψεις έγιναν στα προϊόντα των PGMY09/11 και GP5+/6+ PCR, καθώς το MY09/11 εκκινητικό ζεύγος ενισχύει το ίδιο ακριβώς τμήμα με τους PGMY09/11 εκκινητές. Τα πρότυπα πέψης των πλασμιδίων συνέπιπταν τελικά με αυτά που αναμέναμε. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η πέψη του GP5+/6+ ενισχυμένου προϊόντος έγινε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των πέψεων των προϊόντων PGMY09/11.

Από τα αποτελέσματα των πέψεων, που πραγματοποιήθηκαν στα 8 θετικά κλινικά δείγματα της PGMY09/11-PCR, ταυτοποιήθηκαν πιθανοί HPV τύποι σε 6 από τα 8 δείγματα. Δύο δείγματα έδωσαν πρότυπο που δε συνέπιπτε με κάποιο από τα πρότυπα

που υπολογίστηκαν, ενώ δύο δείγματα έδωσαν πρότυπα τα οποία φανέρωναν την ενδεχόμενη ύπαρξη μιγμάτων.

Συγκεκριμένα, στα δείγματα 739 και 752, που δίνουν τα ίδια πρότυπα πέψεων, ο πιθανός τύπος είναι ο HPV 51. Στα 793 και 867 ταυτοποιήθηκε ο HPV 16. Τα δείγματα 795 και 885, δίνουν πρότυπα πέψης που δε συμπίπτουν με κανένα από τα πρότυπα των HPV που μελετήσαμε. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς υπάρχουν πάνω από 130 τύποι HPV και εμείς έχουμε υπολογίσει τα πρότυπα ορισμένων μόνο τύπων, κυρίως υψηλού κινδύνου. Στα δείγματα 665 και 796, που πιθανόν υπάρχει μίγμα ιών, η ταυτοποίηση των τύπων είναι δύσκολη. Στο δείγμα 796, το άθροισμα των τμημάτων της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *Rsa I* ήταν περίπου 900 bp, υποδηλώνοντας διπλή μόλυνση. Από το μήκος των τμημάτων μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο ένας πιθανός τύπος είναι ο HPV 16, ενώ ο άλλος τύπος δε μπορεί να προσδιοριστεί και αυτό γιατί δεν υπάρχει κανένα παρόμοιο πρότυπο. Στο δείγμα 665, η ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν πιο περίπλοκη. Το πρότυπο πέψης του ενζύμου *Hae III* μας προιδεάζει για την ύπαρξη τριπλής μόλυνσης, μιας και η πέψη δίνει δύο τμήματα ~350 bp και ~372 bp και άκοπο προϊόν (~445bp). Υπάρχει βέβαια και η πιθανότητα το άκοπο προϊόν να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση του DNA, ενδεχόμενο το οποίο επιβεβαιώνεται στην πέψη με το *Rsa I*. Για να είναι δυνατή η ταυτοποίηση των τύπων, καθώς και η εξακρίβωση διπλής ή τριπλής μόλυνσης πρέπει να γίνουν πέψεις και με άλλα περιοριστικά ένζυμα ή να γίνει πέψη και του GP5+/6+ PCR προϊόντος, διαφορετικά η διεξαγωγή αποτελέσματος δεν είναι εφικτή.

Η αξία της πέψης του GP5+/6+ PCR προϊόντος, ως μεθόδου επιβεβαίωσης για την ταυτοποίηση των δειγμάτων, φαίνεται και από τις πέψεις των δειγμάτων 868 και 885. Στα δύο αυτά δείγματα, εκτός από πέψη του PGMY09/11 προϊόντος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση RFLP και στο προϊόν της GP5+/6+ PCR. Το γεγονός αυτό βοήθησε στην επαλήθευση της ταυτοποίησης του HPV 16, στην περίπτωση του δείγματος 868. Η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου αυτής και σε άλλα κλινικά δείγματα, όπως στην περίπτωση του 665 και 796 θα βοηθούσε στην ταυτοποίηση των HPV τύπων.

Συμπερασματικά, από τα τρία συστήματα εκκινητών που περιγράφηκαν σε αυτήν την εργασία, τα εκκινητικά συστήματα PGMY09/11 και GP5+/6+ παρουσίασαν αρκετά καλή ευαισθησία όμως μειωμένη συμφωνία. Ενώ, το MY09/11 σύστημα εκκινητών έδωσε 100% συμφωνία με τα άλλα δύο συστήματα αλλά καθόλου καλή ευαισθησία. Για μια κλινική εφαρμογή είναι αναγκαία η παράλληλη χρήση των δύο

PCR μεθόδων, PGMY09/11 και GP5+/6+. Η χρήση της RFLP ανάλυσης, δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα ταυτοποιώντας, τους δύο υψηλού κινδύνου τύπους HPV 16 και HPV 51. Επίσης, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η αναγνώριση μιγμάτων HPV όπως στην περίπτωση των δειγμάτων 665 και 796. Τα αποτελέσματα αυτά, αποδεικνύουν την ικανότητα της RFLP ανάλυσης να ταυτοποιεί τους πιο γνωστούς τύπους HPV, όπως επίσης και να διακρίνει τις μονές από τις πολλαπλές μολύνσεις. Η PCR-RFLP ανάλυση είναι τελικά μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για την ταυτοποίηση του HPV DNA σε κλινικά δείγματα.

5. Βιβλιογραφία

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990 Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403–10.
2. Andersson S, Larson B, Hjerpe A, Silfversward C, Sallstrom J, Wilander E and Rylander E. 2003. Adenocarcinoma of the uterine cervix: the presence of human papillomavirus and the method of detection. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82: 960-5.
3. Arens M. 2001. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *J Clin Virol.* 22: 11–29.
4. Austin RM and Ramzy I. 1998. Increased detection of epithelial cell abnormalities by liquid-based gynecologic cytology preparations. A review of accumulated data. *Acta Cytol.* 42: 178-84. Review
5. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR and Vousden KH. 1990. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 9: 153-60.
6. Barbosa MS, Lowy DR and Schiller JT. 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol.* 63: 1404–1407.
7. Becker KA, Florin L, Sapp C, Maul GG and Sapp M. 2004. Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol.* 78: 1121–8.
8. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM and Wheeler CM. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by Polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077–1085.
9. Bernard HU. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 32S: S1–S6.
10. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ and Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55: 244-65. Review.

11. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R and Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 87: 796-802.
12. Bosch FX, Muñoz N, Shah KV, and Meheus A. *Int J Cancer.* 1992. Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. 52: 171-173.
13. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A and Banks L. 1994. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology.* 203: 73-80.
14. Boyer SN, Wazer DE and Band V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 56: 4620-4624.
15. Bozzetti M, Nonnenmacher B, Mielzinska II, Villa L, Lorincz A, Breitenbach VV and Prolla J. 2000. Comparison between hybrid capture II and polymerase chain reaction results among women at low risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol.* 10: 466.
16. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ and Kouzarides T. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18: 2449-58.
17. Brentjens MH, Yeung-Yue KA, Lee PC and Tyring SK. 2002. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin.* 20: 315-31. Review.
18. Bryan JT and Brown DR. 2001. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology.* 281: 35-42.
19. Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR and Schiller JT. 2005. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol.* 79: 2839-46.
20. Burd EM. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 16: 1-17. Review.
21. Casas I, Powell L, Klapper PE and Cleator GM. 1995. New method for the detection of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol. Methods.* 53: 25-36

22. Castle PE, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, et al. 2004. Hybrid Capture 3 (HC3) measurements of HPV16, HPV18 and oncogenic cocktail HPV. In: Proceedings of the 21st International Papillomavirus Conference. p. 386
23. Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, Schiffman M and Peyton CL. 2004. Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol.* 22: 238–45.
24. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC and Nevins JR. 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15: 4549-53.
25. Chen S, Tabrizi SN, Fairley CK, Borg AJ and Garland SM. 1994. Simultaneous detection and typing strategy for human papillomaviruses based on PCR and restriction endonuclease mapping. *Biotechniques.* 17: 138–142.
26. Choo KB, Pan CC and Han SH. 1987. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology.* 161: 259-61.
27. Coggin JR and zur Hausen H. 1979. Papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.* 39: 545-546.
28. Cole S.T. and Danos O. 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol.* 193: 599-608.
29. Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, Glass AG, Greer C, Buckland J, Helgesen K, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ and Liaw KL. 1997. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol.* 35: 2262-5.
30. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H and Franco E. 2002. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol.* 40: 902-7.

31. Coutlée F, Gravitt P, Richardson H, Hankins C, Franco E, Lapointe N and Voyer H. 1999. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. The Canadian Women's HIV study group. *J Clin Microbiol.* 37: 1852-7.
32. Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D and Franco E. 1997. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin. Diagn Virol.* 8: 123–141.
33. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG 3rd, Durst M, Gissmann L, Roman A and Turek LP. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6: 3745-53.
34. Cubie HA, Seagar AL, McGoogan E, Whitehead J, Brass A, Arends MJ and Whitley MW. 2001. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Pathol.* 54: 24-9.
35. Culp TD, and Christensen ND. 2004. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology.* 319: 152–61.
36. Danos O, Katinka M and Yaniv M. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1: 231–236.
37. Das BC, Gopalkrishna V, Sharma JK, Roy M and Luthra UK. 1992. Human papillomavirus DNA in urine of women with preneoplastic and neoplastic cervical lesions. *Lancet.* 340: 1417-8.
38. Davidson E.J., Kitchener HC and Stern PL. 2002. The use of vaccines in the prevention and treatment of cervical cancer. *Clin Oncol. (R Coll Radiol).* 14: 193–200. Review
39. Davies P, Kornegay J and Iftner T. 2001. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 15: 677-700. Review.
40. Day PM, Lowy DR and Schiller JT. 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 307: 1–11.
41. De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA and Wilbanks GD. 1993. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol.* 49: 303-10.

42. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ and Snijders PJ. 1999. Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol.* 37: 3545–55.
43. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324: 17–27.
44. de Villiers EM. 1994. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186: 1-12.
45. Dell G and Gaston K. 2001. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci.* 58: 1923-42. Review.
46. Dillner J. 1999. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol.* 9: 423–30.
47. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C and Crawford L. 1991. Specific interaction between HPV 16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 352: 824-827.
48. Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Napthine S, Sterling J, Winter G and Griffin H. 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology.* 238: 40-52.
49. Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 32 Suppl 1: S7-15. Review.
50. Dyson N, Guida P, Munger K and Harlow E. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol.* 66: 6893-902.
51. Dyson N, Howley PM, Munger K and Harlow E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243: 934-937.
52. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 71: 2449-56.
53. Fehrmann F and Laimins LA. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 22: 5201-7. Review.

54. Fehrman F, Klumpp DJ and Laimins LA. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.* 77: 2819–31.
55. Finch JI and Klug A. 1965. The structure of viruses of the papillomavirus type III. structure of rabbit papillomavirus. *J Mol Biol.* 13: 1–12.
56. Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D and Lambert PF. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.* 74: 6622–31.
57. Florin L, Sapp C, Streeck RE and Sapp M. 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* 76: 10009–14.
58. Frattini MG, Lim HB and Laimins LA. 1996. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 3062–7.
59. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B and Galloway DA. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV16 E7 oncoprotein. *Genes and Development.* 11: 2090–100.
60. Galloway DA. 2003. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Lancet Infect Dis.* 3: 469–475.
61. Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, Chow LT, Broker TR and Fisher C. 2004. Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. *J Virol.* 78: 9041–50.
62. Genter SM, Sterling S, Duensing S, Munger K, Sattler C and Lambert PF. 2003. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.* 77: 2832–42.
63. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE and Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75: 1565–70.
64. Goodman A and Wilbur DC. 2003. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med.* 349: 1555–64.

65. Gravitt PE and Shah KV. The biology of human papillomavirus infections. In: Rohan TE, Shah KV, editors. *Cervical cancer: from etiology to prevention*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2004: 81–99.
66. Gravitt PE, Lacey JV Jr, Brinton LA, Barnes WA, Kornegay JR, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Zaino R and Hildesheim A. 2001. Evaluation of self-collected cervicovaginal cell samples for human papillomavirus testing by polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10: 95-100.
67. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR and Apple RJ. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 38: 357-61.
68. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ and Wheeler CM. 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 36: 3020-7.
69. Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozencic J and Pavelic K. 2000. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res*. 20: 2097–102.
70. Gross GE and Barrasso R. editors. *Human papillomavirus infection: a clinical atlas*. Berlin: Ullstein Mosby. 1997.
71. Harnish DG, Belland L, M, Scheid EE and. Rohan TE. 1999. Evaluation of human papillomavirus consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. 13: 9–21.
72. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, Belloni DR and Cole BF. 2003. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *Ann Fam Med*. 1: 221–7.
73. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, Belloni DR and Cole BF. 2003. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *Ann Fam Med*. 1: 221-7.
74. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK and Gelder CM. 2001. Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 39: 3204-12.
75. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, and Schiller JT. 1989. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J*. 8: 3905-3910.

76. Herrington CS. 1994. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. *J Clin Pathol.* 47: 1066-1072
77. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 169: 235-40.
78. Howell LP, Davis RL, Belk TI, Agdigos R and Lowe J. 1998. The AutoCyte preparation system for gynecologic cytology. *Acta Cytol.* 42: 171-177.
79. Howley PM, Scheffner M and Munger K. 1991. Oncoproteins encoded by the cancer-associated papillomavirus target the products of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. *Quant Biol.* 56: 149-155.
80. Howley PM. Editor. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA. 1996. 947-978.
81. Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, Miles L, Garsky VM, Oliff A and Heimbrook DC. 1993. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol.* 13: 953-60.
82. Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10: 4129-4135.
83. Hummel M, Hudson, J.B and Laimins L. 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66: 6070- 6080.
84. Hutchinson ML, Isenstein LM, Goodman A, Hurley AA, Douglass KL, Mui KK, Patten FW and Zahniser DJ. 1994. Homogeneous sampling accounts for increased diagnostic accuracy using the ThinPrep Processor. *Am J Clin Pathol.* 101: 215-219.
85. IARC/WHO. 1995. Papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation
86. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ and Walboomers JM. 1995. Group specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 33: 901-5.

87. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ and Walboomers JM. 1997. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 35: 791–5.
88. Joyce JG, Tung LS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU and Keller PM. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 274: 5810-5822
89. Kim SK. 1997. Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 853–859.
90. Kim SS, Tam JK, Wang AF and Hegde RS. 2000. The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins. *J Biol Chem.* 275: 31245-54.
91. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M and Quint W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 37: 2508-17.
92. Kleter B, van Doorn L-J, ter Shegert J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B and Quint W. 1998. Novel short fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 153: 1731-1738.
93. Klingelhutz AJ, Foster SA and McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 380: 79–82.
94. Klug A and Finch JT. 1965. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type: human wart viruses. *J Mol Biol.* 11: 403–423.
95. Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Richardson H and Coutlée F. Canadian Women's HIV Study Group. 2001. Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol.* 39: 3530-6.

96. Koutsky LA. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 102: 3–8.
97. Kurman RJ, Henson DE, Herbst AL, Noller KL and Schiffman MH. 1994. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA.* 271: 1866-9.
98. Kuypers JM, Critchlow CW, Gravitt PE, Vernon DA, Sayer JB, Manos MM and Kiviat NB. 1993. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *J Clin Microbiol.* 31: 1003-6.
99. Laimins LA. 1996. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Semin Virol.* 7: 305–13.
100. Lamarca L, Deeds J, Ginzinger D, Perry J, Padmanabha S and Smith-McCune K. 2002. Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn.* 4: 97-102.
101. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernandez P, Salmeron J and Hernandez M. 2001. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 91: 412-20.
102. Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK and Garcea RL. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol.* 72: 2160–7.
103. Longworth MS and Laimins LA. 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 78: 3533–3541.
104. Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W and Kurman RJ. 1992. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 79: 328-337.
105. Lörincz AT. 1996. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res.* 22: 629–36.

106. Lungu O, Wright TC Jr and Silverstein S. 1992. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes*. 6: 145-52.
107. Madison KC. 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 121: 231-41.
108. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ and Broker TR. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells*. 7: 209-214.
109. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP and Romanos MA. 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: 7407-19.
110. Matsukura T and Sugase M. 1990. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology*. 177: 833-6.
111. Melchers W, van den Brule A, Walboomers J, de Bruin M, Burger M, Herbrink P, Meijer C, Lindeman J and Quint W. 1989. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and southern-blot analysis. *J Med Virol*. 27: 329-35.
112. Melchers WJ, Bakkers JM, Wang J, de Wilde PC, Boonstra H, Quint WG and Hanselaar AG. 1999. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. Clinical evaluation and follow-up. *Am J Pathol*. 155: 1473-8.
113. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N and Doorbar J. 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 77: 10186-201.
114. Modis Y, Trus BL and Harrison SC. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 21: 4754-62.
115. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P and Botchan MR. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*. 250: 1694-9.

116. Molijn A, Kleter B, Quint W and van Doorn LJ. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 32 Suppl 1: S43-51. Review.
117. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, Sankaranarayanan R, Schiller J, Singer A, Wright TC Jr, Kinney W, Meijer CJ, Linder J, McGoogan E and Meijer C. 2004. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer.* 108: 329-33.
118. Munger K and Howley PM. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89: 213– 228.
119. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ and Meijer CJ. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348: 518-27.
120. Munoz. N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19: 1–5.
121. Myers G, Bernard H-U, Delius H, Favre M, Icenogel J, Van Ranst M, Wheeler C. editors. Human papillomaviruses a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 1st ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, Los Alamos National Laboratory. 1994.
122. Nguyen D, Westbrook TF and McCance DJ. 2002. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol.* 76: 619–632.
123. Oren M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10: 431–442.
124. Orth G, Favre M, Jablonska S, Bryklak K and Croissant O. 1978. Viral sequences related to the human papillomavirus in genital warts. *Nature.* 275: 334-336.
125. Ozbun M and Meyers C. 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol.* 71: 5161–5172.
126. Ozbun MA and Meyers C. 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology.* 248: 218–230.

127. Painsil J, Muller M, Picken M, Gissmann L and Zhou J. 1996. Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology*. 223: 238-44.
128. Papanicolaou GN. 1949. A survey of actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann. Intern. Med.* 31: 661–674
129. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, Namkoong SE and Park JS. 2004. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol.* 23: 119-25.
130. Park TW, Fujiwara H and Wright TC. 1995. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*. 76: 1902-1913.
131. Patrick DR, Oliff A and Heimbrook DC. 1994. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem.* 269: 6842–6850.
132. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X and Doorbar J. 2004. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol.* 78: 2142-51.
133. Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA and Coleman N. 2004. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* 64: 1359-68.
134. Poljak M and Seme K. 1996. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods.* 56: 231-8.
135. Poljak MR, Marin IJ, Seme K and Vince A. 2002. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol.* 25 : 89–97.
136. Qi YM, Peng SW, Hengst K, Evander M, Park DS, Zhou J and Frazer IH. 1996. Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology*. 216: 35-45.
137. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS and Burk RD. 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol.* 35: 1304-10.
138. Quint WG, Scholte VG, Van Doorn LJ, Kleeter B, Smits PHM and Lindeman J. 2001. Comparative analysis of human papillomavirus. infections in cervical

- scrapes and biopsy specimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. *J. Pathol.* 194: 51–58.
139. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G and Favre M. 2002. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet.* 32: 579–81.
140. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K and Liebert UG. 2004. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol.* 30: 302–8.
141. Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V and Orth G. 1990. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet.* 335: 1171–4.
142. Roden RB, Day PM, Bronzo BK, Yutzy WH 4th, Yang Y, Lowy DR and Schiller JT. 2001. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol.* 75: 10493–7.
143. Roden RB, Lowy DR and Schiller JT. 1997. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis.* 176: 1076–9.
144. Roman A and Fife KH. 1989. Human papillomaviruses: Are we ready to type? *Clin Microbiol Reviews.* 2: 166–174.
145. Sanclemente G and Gill DK. 2002. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *JEADV.* 16: 231–240.
146. Sapp M, Volpers C, Muller M and Streeck RE. 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol.* 76: 2407–12.
147. Sato S, Maruta J, Konno R and Yajima A. 1998. In situ detection of HPV in a cervical smear with in situ hybridization. *Acta Cytol.* 42: 1483–5.
148. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63: 1129–36.
149. Schiffman M and Castle PE. 2003. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 127: 930–934.
150. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A and zur Hausen H. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 314: 111–4.

151. Schwarz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madelaine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK and Galloway DA. 1998. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 90: 1626–1636.
152. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stoppler MC, Koval D and Schlegel R. 1997. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology.* 237: 296–306.
153. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, Herrero R, Hutchinson ML, Bratti C, Zahniser D, Morales J, Hildesheim A, Helgesen K, Kelly D, Alfaro M, Mena F, Balmaceda I, Mango L and Greenberg M. 1997. Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer.* 81: 89-97.
154. Singer A. 1995. Cervical cancer screening: state of the art. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 9: 39-64. Review.
155. Smits H.L., Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, Vonk J, van der Velden J, ten Kate FJ, et al. Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. *J Clin Microbiol* 1995;33:2631–6.
156. Snijders PJF, Scholes AGM, Hart AC, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, Meijer CJLM, Walboomers JMM and Field JK. 1996. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 66: 464-469.
157. Solomon D, Schiffman M and Tarone R. ALTS Study group. 2001. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 93: 293-9.
158. Stanley MA, Browne HM, Appleby M and Minson AC. 1989. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer.* 43: 672–6.
159. Stauffer Y, Raj K, Masternak K and Beard P. 1998. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol.* 283: 529–36.
160. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ and Meijer CJ. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.* 32 Suppl 1: S25-33. Review.

161. Steger G and Corbach S. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 71: 50–58
162. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT and Broker TR. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol.* 23:1 17-28.
163. Stoppler H, Hartmann DP, Sherman L and Schlegel R. 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J Biol Chem.* 272: 13332-7.
164. Strauss S, Desselberger U and Gray JJ. 2000. Detection of genital and cutaneous human papillomavirus types: differences in the sensitivity of generic PCRs, and consequences for clinical virological diagnosis. *Br J Biomed Sci.* 57: 221–5.
165. Stubenrauch F and Laimins LA. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 9: 379–386
166. Sverdrup F and Khan SA. 1994. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol:* 68: 505–509.
167. Swindle CS, Zou N, Van Tine BA, Shaw GM, Engler JA and Chow LT. 1999. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol.* 73: 1001–9.
168. ter Meulen J, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Chang-Claude J, Mtiro H, Mhina M, Kashaija P, Ockert S, Yu X, et al. 1992. Human papillomavirus (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania, east Africa. *Int J Cancer.* 51: 515-21.
169. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L and Banks L. 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene.* 21: 5088-96.
170. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck JN, Berkhout RJ, Vermeer BJ, Jebbink MF and Smits HL. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods.* 42: 265-79.

171. Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP. 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 4: 413-20.
172. Tyring K.S. 2000. Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol.* 43: S18-26
173. Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Ozaki K, Yoshizaki T, Kanao H, Ueno Y, Nakashima R, Shroyer KR and Murata Y. 2003. Monoclonal expansion with integration of high-risk type human papillomavirus is an essential step for cervical carcinogenesis: association of clonal status and human papillomavirus infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. *Lab Invest.* 83: 1517-1527.
174. Ustav M and Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* 10: 449-457
175. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ and Snijders PJ. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 40: 779-87.
176. van Ham MA, Melchers WJ, Hanselaar AG, Bekkers RL, Boonstra H and Massuger LF. 2002. Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br J Cancer.* 87: 373-6.
177. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC and Schlegel R. 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 75: 4467-72.
178. Vernon, S D, Unger E R and Williams D. 2000. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol.* 38: 651-655.
179. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer JC and Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189: 12-19.
180. Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR and Johanning GL. 2002. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in

- residual material from ThinPrep papanicolaou tests using realtime polymerase chain reaction analysis. *Cancer*. 94: 2199–210.
181. Watt FM. 1998. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 353: 831-7. Review.
 182. Werness B.A. Levine AJ, and Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. 248:76-79.
 183. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 24: 275-90. Review.
 184. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K and Howley PM. 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*. 117: 349-60.
 185. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kranberger C, Hainfield JF and Tubbs R. 1997. Sensitive in situ hybridization with catalysed reporter deposition, streptavidin-nanogold and silver acetate auto metallography: detection of single copy human papillomavirus. *Am J Pathol*. 150: 1553–61.
 186. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T and Steinberg BM. 1999. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*. 263: 388-94.
 187. Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY and Frazer IH. 1993. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol*. 74: 763-8.
 188. zur Hausen H. 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Biochem*. 48: 427–447. Review.
 189. zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2: 342–50. Review.