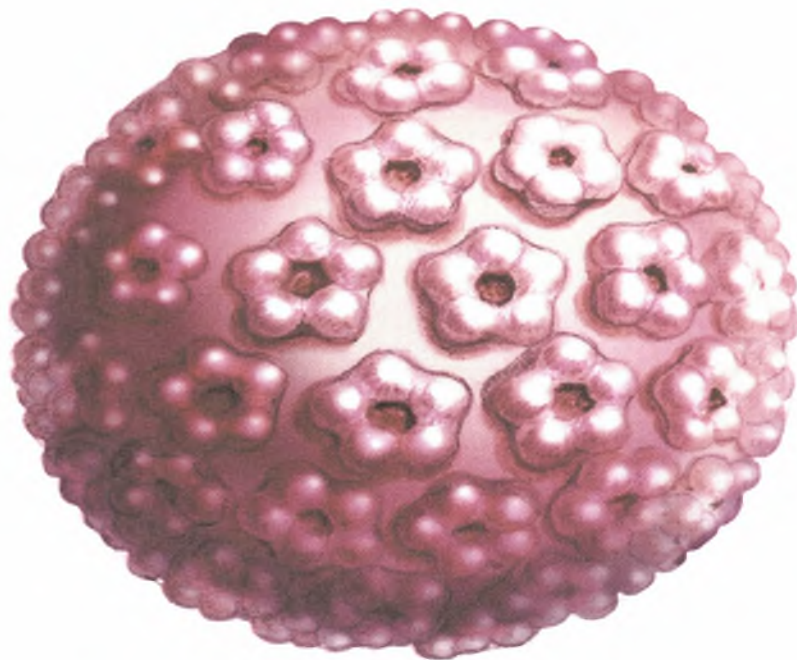


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Προσδιορισμός της κατάστασης του γονιδίου E2 του Human
Papillomavirus (HPV) -16 σε κλινικά δείγματα**



ΓΚΟΡΤΣΙΛΑΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ

Επιβλέπων: Αν. Καθηγητής Παναγιώτης Μαρκουλάτος

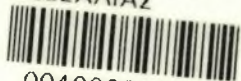
Λάρισα 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6591/1
Ημερ. Εισ.: 17-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΒΒ
2008
ΓΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087343

Στους γονείς μου, Ιωάννη και Αναστασία.

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Τριμελής Επιτροπή: Αν. καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

Καθηγητής Ζ. Μαμούρης

Λέκτορας Δ. Μόσιαλος

Ημερομηνία Κατάθεσης Πτυχιακής εργασίας: 27 – 6 – 2008

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2007 – Απρίλιος 2008 υπό την επίβλεψη του Αν. καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κύριο Ζήση Μαμούρη και Δημήτριο Μόσιαλο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή επιτροπή για τη παρούσα μελέτη, αλλά και κυρίως γιατί, μαζί με όλους τους καθηγητές του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας λειτούργησαν για μένα σαν υπόδειγμα πανεπιστημιακών δασκάλων με τις γνώσεις και το ήθος τους.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την βαθύτερη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση τις συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας όσο και για τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών. Οι γνώσεις του και οι συμβουλές του πάνω στο αντικείμενο ήταν πάρα πολύ σημαντικές για μένα και θα με ακολουθούν συνέχεια στην περαιτέρω σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την ψυχή μου τους υποψήφιους διδάκτορες Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, Δεδεψίδη Ευάγγελο και Πλιάκα Βίκυ για την βοήθεια τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους τόσο στον εργαστηριακό τομέα όσο και στο να μπορέσουν να ξεπεραστούν τα όποια εργαστηριακά προβλήματα που προέκυψαν. Το ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον που αναπτύχθηκε μεταξύ μας ήταν πάρα πολύ σημαντικό για να μπορέσω να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία με ευχαρίστηση. Το ήθος και ο χαρακτήρας που ανέδειξαν μέσα στο εργαστήριο ήταν μεγάλο «σχολείο» για μένα. Τους εκτιμώ και τους σέβομαι βαθύτατα γι' αυτό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το συνάδελφο Μάριο Ευδοκίμου για τη συμπαράσταση και την ευχάριστη συνεργασία μέσα στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον φίλο και συνάδελφο Δημήτρη Τσακογιάννη με τον οποίο πραγματοποιήσαμε το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων και χωρίς την βοήθειά ήταν πολύτιμη για τη πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Τον εκτιμώ ιδιαίτερα τόσο για την αρμονική

συνεργασία όσο και για την συμπαράσταση, υπομονή, επιμονή και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου, Ιωάννη και Αναστασία, για την συμπαράστασή τους καθώς και για τις θυσίες και τον αγώνα που έκαναν τόσα χρόνια προσφέροντάς μου όλα τα απαραίτητα αγαθά, υλικά και ψυχικά, για τη πραγματοποίηση των σπουδών μου. Η συγκεκριμένη εργασία είναι αφιερωμένη, εξολοκλήρου, σε αυτούς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Η Βιολογία των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPV).....	10
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	10
1.1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών.....	14
1.2 Δομή των Ανθρώπινων papilloma ιών (HPV).....	19
1.2.1 Δομή του καψιδίου	19
1.2.2. Γενωμική οργάνωση.....	20
1.3 Ο κύκλος ζωής των HPV.....	32
1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο	32
1.3.2 Αντιγραφή του ιικού γενόματος.....	33
1.3.3 Μεταγραφή του ιικού γενόματος.....	36
1.3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	37
1.3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	40
1.4 Εργαστηριακή διάγνωση	42
1.4.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap)	42
1.4.2 Hybrid Capture II test.....	43
1.4.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
2.1 Κλινικά Δείγματα	46
2.2 Απομόνωση DNA-RNA	46
2.3 Εκκινητικά μόρια PCR.....	47
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	50
2.4.1 Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.....	50
2.4.2 Ενίσχυση του E2 γονιδίου	50
2.5 Ενίσχυση των μεταγράφων των ιικών ογκογονιδίων - APOT assay.....	51
2.5.1 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	52
2.5.2 PCR.....	52
2.5.3 Nested PCR	53
2.6 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing)	53
2.7 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Προγράμματα βιοπληροφορικής.....	54

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1 Αποτελέσματα PCR.....	55
3.1.1 PCR με τα εκκινητικά μόρια της β-γλοβουλίνης.....	55
3.1.2 PCR με τα εκκινητικά μόρια της δημοσίευσης	55
3.1.3 PCR με τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία	56
3.2 Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
5. ΒΙΒΛΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomaviruses) είναι μικροί ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Το γονιδιώμά τους αποτελείται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους 8000 βάσεων περίπου. Έχουν περιγραφεί πάνω από 100 διαφορετικοί γενότυποι HPV, οι οποίοι μολύνουν τους δερματικούς και βλεννογόνους επιθηλιακούς ιστούς του γεννητικού συστήματος και των άκρων. Μια ομάδα HPV αποτελούν την κύρια αιτία για το καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μιας και στο 99% των όγκων έχει ανιχνευθεί το DNA αυτών. Οι τύποι του ιού οι οποίοι μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του γεννητικού συστήματος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: υψηλού κινδύνου και χαμηλού κινδύνου. Οι τύποι υψηλού κινδύνου εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του γεννητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένου και του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι μολύνσεις από HPV χαμηλού κινδύνου προκαλούν μόνο καλοήγη γεννητικά θηλώματα. Οι κυριότεροι τύποι υψηλού κινδύνου είναι οι HPV-16, -18, -31, -33 και -45, ενώ οι κυριότεροι τύποι χαμηλού κινδύνου είναι οι HPV-6 και HPV-11. Οι HPV οι οποίοι προσβάλλουν το γεννητικό σύστημα είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι και πιστεύεται ότι περίπου τα 2/3 των ατόμων που έχουν σεξουαλική επαφή με ένα μολυσμένο άτομο μολύνονται και αυτά. Ωστόσο, η πλειοψηφία των μολύνσεων δεν παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα. Η μόλυνση από HPV υψηλού κινδύνου δεν περιορίζεται μόνο στο γεννητικό σύστημα, μιας και περίπου το 20% των καρκίνων του στοματοφάρυγγα περιέχουν DNA από αυτούς τους τύπους HPV.

Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ' επέκταση καρκίνο είναι οι HPV-16 και HPV-18 σε ποσοστό 50% (Bosch FX. et al 1995) και 10-25% αντίστοιχα ακολουθώντας οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%. Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά παραμένουν αρκετά υψηλά.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων τύπου 16 (HPV-16) και πιο συγκεκριμένα με την ανάλυση της κατάστασης του γονιδίου E2, με ειδικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, σε κλινικά δείγματα τα οποία είναι μολυσμένα με HPV-16. Πιο συγκεκριμένα, το γονιδιώμα του HPV-16 μπορεί να βρίσκεται σε δυο μορφές, είτε επισωματικό, είτε ενσωματωμένο στο γονιδιώμα του κυττάρου-ξενιστή. Η ενσωμάτωση αυτή γίνεται συνήθως στην περιοχή του E2 γονιδίου, με θραύση σε κάποιο σημείο του.

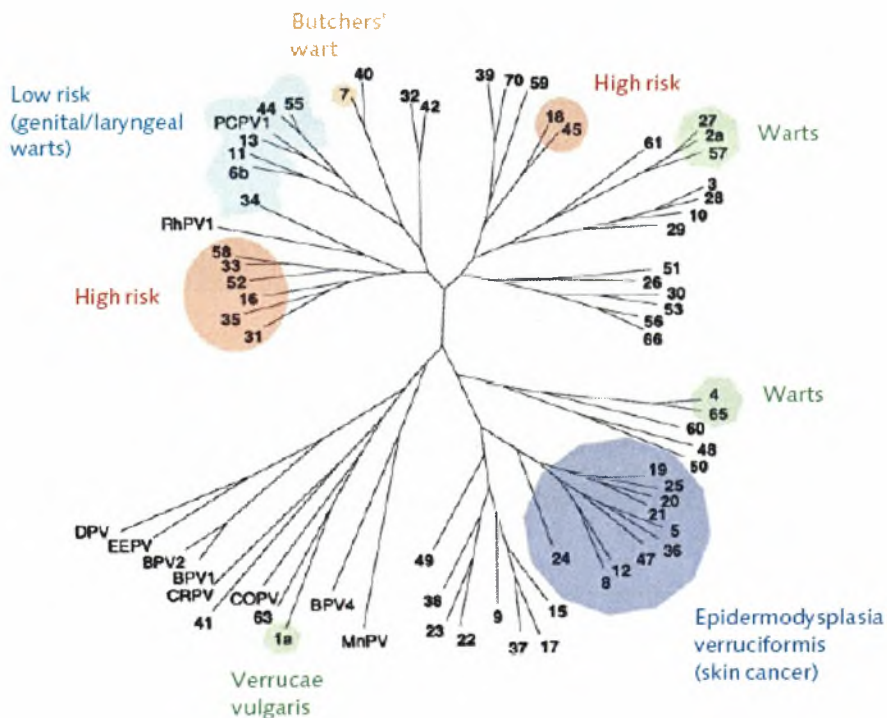
Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την φυσιολογική παραγωγή ή όχι της πρωτεΐνης E2. Η E2 πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταλλαγή των φυσιολογικών κερατινοκυττάρων σε καρκινικά, κυρίως ως ρυθμιστής της μεταγραφής των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 των HPV υψηλού κινδύνου. Επίσης πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη για το συγκεκριμένο γονίδιο των κλινικών δειγμάτων. Η μελέτη της κατάστασης του E2 γονιδίου είναι πολύ σημαντική γιατί μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης της E2 πρωτεΐνης και κυρίως πως εμπλέκεται στην μεταλλαγή των κυττάρων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Βιολογία των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPV)

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από την λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν την μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Προσβάλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη μιας σειράς βλαβών (εικόνα 1.1, πίνακας 1.1), οι οποίες εκτείνονται από τα κοινά θηλώματα μέχρι τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του πέους (zur Hausen, 1996).



Εικόνα 1.1: Γενεαλογικό δέντρο των Papilloma ιών (PVs) στο οποίο φαίνονται και οι βλάβες που προκαλούν. Οι υψηλού κινδύνου (High risk) HPVs είναι κυρίως υπεύθυνοι για την πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

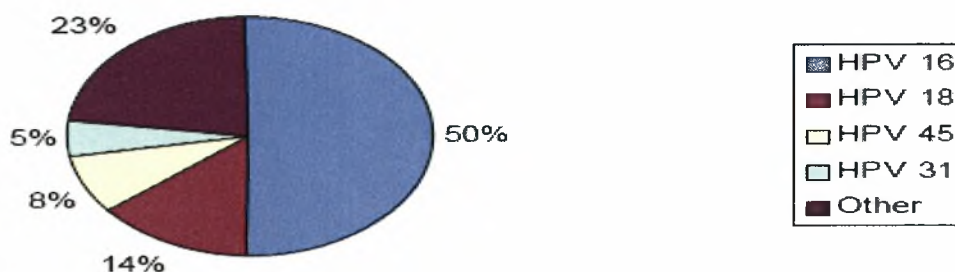
Συμπτώματα	Στέλεχος
<i>Θηλώματα του πέλματος (μυρμηγκιές)</i>	HPV-1, 2, 4, 63
<i>Επίπεδα θηλώματα</i>	HPV-3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
<i>Μωσαϊκά θηλώματα</i>	HPV-2, 27, 57
<i>Epidermodisplasia Verruciformis</i>	HPV-2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
<i>Επιδερμικές αλλοιώσεις (Μη θηλωματικές)</i>	HPV-37, 38
<i>Αναπνευστική παπιλλομάτωση</i>	HPV- 6, 11
<i>Καρκίνος των πνευμόνων</i>	HPV- 6, 11, 16, 18
<i>Κονδυλώματα στον λάρυγγα</i>	HPV-6, 11, 30
<i>Καρκίνος στον λάρυγγα</i>	HPV-16, 18
<i>Κονδυλώματα στην κοιλότητα της γνάθου</i>	HPV-16, 18
<i>Στοματική επιθηλιακή υπερπλασία</i>	HPV-13, 32
<i>Καρκίνος στο στόμα</i>	HPV-16, 18
<i>Στοματική λευκοπλακία</i>	HPV-16, 18
<i>Καρκίνος στον οισοφάγο</i>	HPV-16, 18
<i>Γιγάντια κονδυλώματα (Buschke-Lowenstein tumor)</i>	HPV-6, 11
<i>Κοινά θηλώματα</i>	HPV-1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65

Πίνακας 1.1: Διάφοροι τύποι HPV και τα συμπτώματα που προκαλούν.

Ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων με την βοήθεια ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος μόλις είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus*

εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε διάφοροι τύποι της ομάδας αυτής των ιών εντοπίστηκαν και συνδέθηκαν με την δημιουργία όγκων σε πολλά είδη μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 καθώς ανακαλύφθηκε, ότι ορισμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papillomaviruses) συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως και τον πέμπτο πιο θανατηφόρο καρκίνο στις γυναίκες (Parkin D. M. et al., 2000, Pisani P. et al., 2002). Περίπου 470.000 καινούργιες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου αναφέρονται ετησίως, με κυριότερη ηλικία ανάπτυξης κακοήθειας τα 52 χρόνια (Boring C. C. et al., 1994, Pisani P. et al., 2002). Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν βρεθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Δυτική Ευρώπη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο αριθμός των περιπτώσεων αυτού του τύπου καρκίνου ελαττώθηκε πάνω από 80% τα τελευταία χρόνια λόγω της εφαρμογής του τέστ Παπανικολάου (Pap test) ως διαγνωστική μέθοδο (Singer A. et al., 1995). Παρόλα αυτά, ετησίως περίπου 10,000 γυναίκες διαγιγνώσκονται με καρκίνο του τραχήλου ενώ 5,000 από αυτές πεθαίνουν (Parkin D. M. et al., 2000).

Περίπου το 99% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι θετικές σε HPV μόλυνση και βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ' επέκταση καρκίνο είναι οι ιοί HPV-16 (με τον οποίο ασχολείται και η παρούσα μελέτη) και HPV-18 σε ποσοστό 50% (Bosch FX. et al., 1995) και 10-25% αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5% (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Ποσοστά των τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

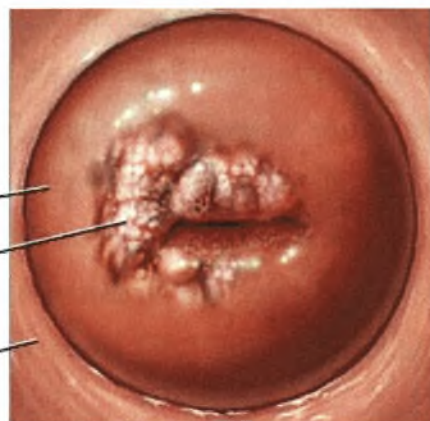
Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής. Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας. Υπάρχουν τρεις τρόποι μετάδοσης του ιού:

- a) Η σεξουαλική επαφή. Οι HPV προσβάλλουν με μεγαλύτερη συχνότητα γυναίκες που εναλλάσσουν πολλαπλούς συντρόφους.
- b) Μετάδοση από την μητέρα στο νεογέννητο.
- c) Χωρίς σεξουαλική επαφή (επαφή με ουρογενετικά εκκρίματα). (Fraisier, 1994)

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV (Zur Hausen, 2000). Μια ομάδα 30 στελεχών HPV μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα (Gillison, 2001). Οι HPV βάσει του τροπισμού τους μπορούν να διαχωριστούν σε δερματικούς και στους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες (πίνακας 1.2). Στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση 'επεκτατικού' καρκίνου συνήθως του ουρογενετικού συστήματος (εικόνα 1.3). Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk), τα μέλη της οποίας, εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz N. et al., 2003).



Τράχηλος όπως φαίνεται
στο μητροσκόπιο



Τράχηλος
Καρκινικός
ιστός
Κολπικό
τοίχωμα

Εικόνα 1.3: Καρκινική αλλοίωση
του τραχήλου της μήτρας.

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

Πίνακας 1.2. Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

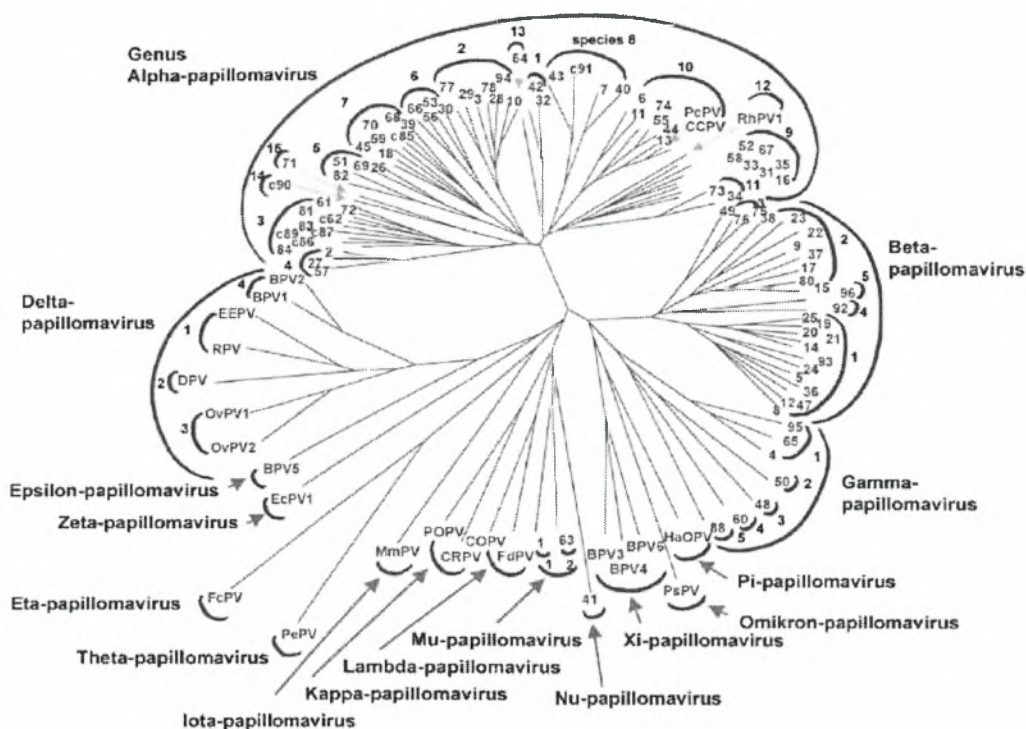
Εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας οι HPV επίσης σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους papilloma ιούς στους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου.

1.1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά είχαν ταξινομηθεί μαζί με τους polyoma ιούς και τον ιό SV40 σε μια ενιαία μεγάλη οικογένεια, την οικογένεια των Papovaviridae. Η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε σε ομοιότητες στην δομή των χωρίς

περίβλημα καψιδίων των ιών αυτών καθώς και στο γεγονός ότι διαθέτουν παρόμοιο δίκλωνο κυκλικό μορίο DNA. Αργότερα, όμως, αναγνωρίστηκε ότι οι δυο αυτές ομάδες των ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, εντελώς διαφορετική γενωμική οργάνωση και καθόλου σημαντικές ομοιότητες στις νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες τους. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο να ταξινομηθούν οι παραπάνω ιοί, από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV), σε δυο διαφορετικές διακριτές οικογένειες. Την οικογένεια των Papillomaviridae, η οποία περιλαμβάνει όλους τους ιούς των θηλωμάτων (papillomaviruses) και την οικογένεια των Polyomaviridae που περιλαμβάνει τους polyomaviruses (de Villiers E.M et al., 2004, The Papillomaviruses, 2007).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, οι papilloma ιοί ταξινομούνται βάση των διαφορών που υπάρχουν στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Το L1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (L1 ORF) είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο στους ιούς των θηλωμάτων και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται ακόμα για την ταξινόμηση νέων τύπων των ιών αυτών. Οι papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Έτσι έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του γονιδίου L1. Κάθε καινούργιος papilloma ιός που απομονώνεται αποτελεί διαφορετικό τύπο, αν η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από το γονίδιο L1 του κοντινότερου γνωστού τύπου, περισσότερο από 10%. Διαφορές μεταξύ 2% και 10% υποδηλώνουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορές λιγότερο από 2% υποδηλώνουν μια παραλλαγή (variant) (de Villiers E.M et al., 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 1.4 περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Charles E. et al., 2007, Antonson A. et al., 2006).



Εικόνα 1.4: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers E. M. et al., 2004).

1.1.2.1 Alpha-papillomavirus

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο αριθμητικά γένος από τα υπόλοιπα και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Το γένος των Alpha-papillomaviruses επίσης συμπεριλαμβάνει και τους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV όπως έχει ήδη αναφερθεί ταξινομούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (High risk). Ο HPV-16 και ο HPV-18 είναι οι κύριοι παράγοντες για την πρόκληση τραχηλικών αλλοιώσεων οι οποίες μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου ανευρίσκεται DNA ιών HPV και περίπου σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του ιού HPV-16 (Bosch et al., 2001). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται, ως

ενδιάμεσου κινδύνου (Middle risk) και χαμηλού κινδύνου (Low risk), βάση της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί χαμηλού κινδύνου εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου πολύ σπάνια, αλλά ερευνητικά και διαγνωστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος. (Doorbar J. et al., 2006).

1.1.2.2. Beta-papillomavirus

Οι τύποι HPV που προσβάλλουν το δέρμα διαχωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά γένη (Beta, Gamma, Mu και Nu-papillomaviruses). Οι ιοί αυτοί συχνά εντοπίζονται σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις.

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

1.1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV προέρχονται από τρία άλλα γένη (Gamma, Mu and Nu) και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται σε καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.3) περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu papillomavirus (Doorbar J. et al., 2006).

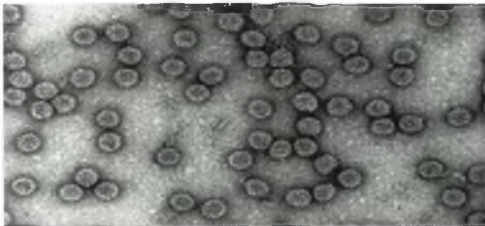
Γένος	Στέλεχος
Beta papillomavirus	HPV- 2, 5, 8, 107
Gamma Papillomavirus	HPV- 101, 103
Mu Papillomavirus	HPV- 1, 63
Nu Papillomavirus	HPV- 41

Πίνακας 1.3: Σύντομη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

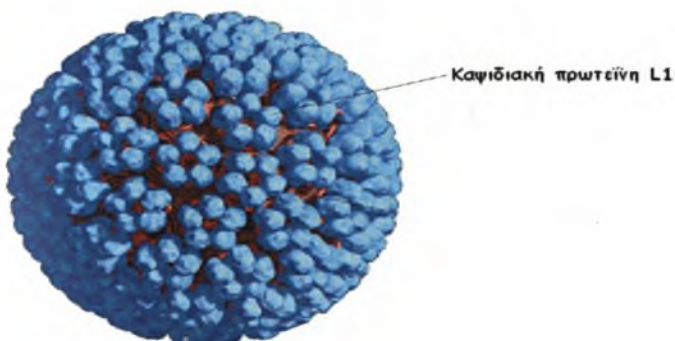
1.2 Δομή των Ανθρώπινων papilloma ιών (HPV)

1.2.1 Δομή του καψιδίου

Οι papilloma ιοί έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο 55-60 nm (Εικόνα 2.1). Η εξωτερική τους επιφάνεια αποτελείται από το καψίδιο, το οποίο συγκροτείται από 72 πενταμερή (καψομερίδια) της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (Εικόνα 2.2) (The Papillomaviruses, 2007). Η L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Luxton and Sepherd 2001, Yang R. et al., 2004). Όλα τα πενταμερή μαζί σχηματίζουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με triangulation number $T=7$. Η δεύτερη καψιδιακή πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη L2, η οποία παράγεται σε μικρότερες ποσότητες από την L1, τοποθετείται εσωτερικά του καψιδίου που σχηματίζεται από τα L1 πενταμερή. Πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται στο C-τελικό της άκρο. Κύριος ρόλος της L2 είναι το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσυντεθέμενα ιικά σωματίδια σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2 (Buck C.B. et al., 2004).



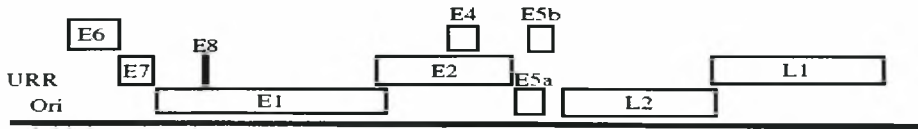
Εικόνα 2.1: Ιός των θηλωμάτων των βοοειδών (Bovine Papillomavirus, BPV). Ηλεκτρονική μικρογραφία. (The Papillomaviruses, 2007).



Εικόνα 2.2: Τρισδιάστατη απεικόνιση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV). Σ' αυτήν την εικόνα φαίνονται τα πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (Physians' Research Network).

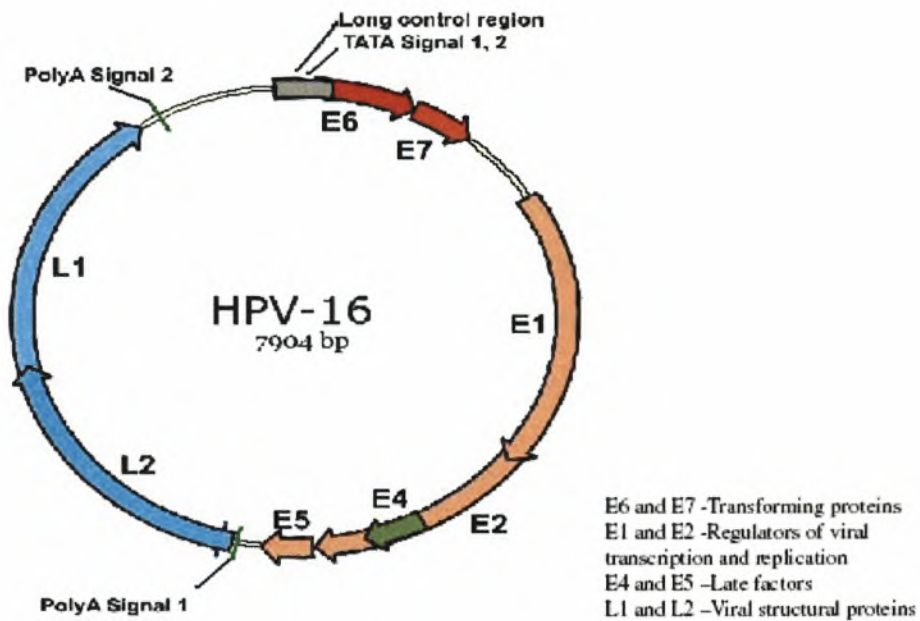
1.2.2. Γενωμική οργάνωση

Η οργάνωση του γενώματος είναι αρκετά συντηρημένη ανάμεσα στους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων και στους ιούς των θηλωμάτων των ζώων (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Γενωμική οργάνωση των PVs.

Καθένας έχει ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 7.400 με 8.200 βάσεων (εικόνα 2.4) το οποίο αντιγράφεται ως ένα εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων του ξενιστή (The Papillomavirus, 2007).



Εικόνα 2.4: Δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA του HPV-16.

Στα ιικά σωματίδια, το DNA βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια μορφή που μοιάζει με χρωματίνη (Howley P.M. et al., 1996). Το γένωμα περιλαμβάνει 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία εκφράζονται από

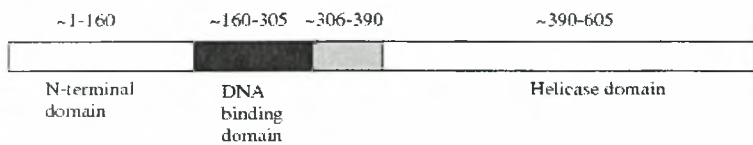
πολυκιστρονικά mRNAs που προέρχονται από την ίδια αλυσίδα DNA, και χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές, βάση των λειτουργικών και δομικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E=Early region), την όψιμη περιοχή (L=Late region) και την ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos O. et al., 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές L1 και L2 πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο. Τόσο η περιοχή E όσο και η περιοχή L ακολουθούνται από μια θέση πολυαδενυλίωσης (polyA) (The Papillomaviruses, 2007). Η έκφραση του γενώματος των HPV τύπων υψηλού κίνδυνου (high-risk) ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, ο ένας από τους οποίους βρίσκεται πάνω από το E6 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων. Για παράδειγμα, στους HPV-16 και -31 ο υποκινητής αυτός ονομάζεται p97, ενώ στον HPV-18 ονομάζεται p105. Ο υποκινητής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων, στον HPV-31 ονομάζεται p742 (Hummel N. et al., 1992) και στον HPV-16 p670 (Grassmann K. et al., 1996).

Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR, η οποία ονομάζεται και URR (upstream regulatory region), έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6 (Demeret et al., 1995, Tan S.H. et al., 2002). Η LCR περιέχει πληθώρα ρυθμιστικών στοιχείων, όπως θέσεις σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων, υποκινητές, καθώς και την θέση έναρξης της αντιγραφής του γονιδιώματος των HPVs.

1.2.2.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 (εικόνα 2.5) είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος. (Ustav and Stenlund, 1991). Παρουσιάζει μια εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης, ATPάσης και

την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α (Van G. Wilson et al., 2002).



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της πρωτεΐνης E1.

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

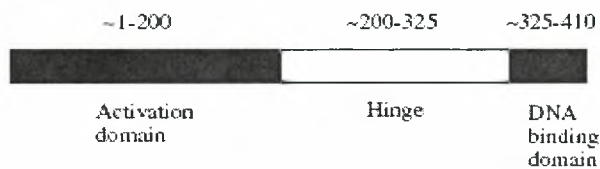
Παρουσία ATP η E1 προσδέεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε AT προκαλώντας δομικές αλλαγές (Shawn E. Holt and Van G. Wilson, 1995). Σαν πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους. Πρώτον δρα σαν πρωτεΐνη πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον δρα σαν ελικάση με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει την θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρά η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et al., 1995).

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

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

1.2.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 (εικόνα 2.6) έχει μέγεθος περίπου 50 kDa και είναι διμερής. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αντιγραφή του ιικού DNA όσο και στην ρύθμιση της μεταγραφής (Laimins L. A. et al., 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: το καρβοξυ-τελικό άκρο, το οποίο διαθέτει μια διμερή δομή β-βαρελιού και είναι αυτό που συνδέεται στο DNA (Hedge R. S. et al., 1992), μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία ονομάζεται περιοχή-αρθρός (hinge region), και το αμινο-τελικό άκρο το οποίο έχει δομή α-έλικας πλούσιας σε γλουταμίνη (Antson A. A. et al., 2000, Harris S. F. et al., 1999) και αποτελεί μια περιοχή ενεργοποίησης, όταν το καρβοξυ-τελικό άκρο αλληλεπιδρά με την E1 (Chen G. et al., 2000).



Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της πρωτεΐνης E2.

Τα διμερή E2 συνδέονται σε συντηρημένες παλινδρομικές αλληλουχίες (ACCN₆GGT) που ονομάζονται περιοχές σύνδεσης της E2 (E2 binding sites, E2BSs) (Laimins L. A. et al., 1998). Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες περιοχές στην LCR και τρεις από αυτές περιβάλλουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής (Howley P. M. et al., 1996). Με τον τρόπο αυτό η E2 βοηθά την E1 να συνδεθεί στην θέση έναρξης της αντιγραφής.

Επίσης επιδρά στην ρύθμιση της μεταγραφής, κυρίως των E6 και E7 γονιδίων, δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al., 1987). Πιο συγκεκριμένα, η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η E2 συνδέεται σε απομακρυσμένες από τον υποκινητή του E6 γονιδίου περιοχές, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων (Sp1, TFIID) και την έκφραση των E6 και E7 γονιδίων. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις η E2 δρα ως καταστολέας της μεταγραφής καθώς προσδένεται σε E2BSs

οι οποίες επικαλύπτουν τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1 και του TFIID (Demeret C. et al., 1997, Dostatni N. et al., 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνδεσης των παραπάνω κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων και κατ' επέκταση την καταστολή της μεταγραφής. Κατά κανόνα, η ενσωμάτωση του γονιδιώματος των HPV στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή γίνεται στην περιοχή του γονιδίου E2 του ιικού γενώματος. Δηλαδή, κατά την ενσωμάτωση παρατηρείται διάσπαση του γονιδίου E2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της παραγωγής της πρωτεΐνης E2 και κατ' επέκταση την μη σωστή ρύθμιση και την αυξημένη παραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Αυτό το γεγονός φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή η μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 ελέγχεται από την E2 (Bechtold et al., 2003).

1.2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

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

Η E1[^]E4 είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της αντιγραφής του ιικού γενώματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού (Wilson R. et al., 2005) ενώ άλλες μελέτες εμπλέκουν την E1[^]E2 ως ρυθμιστή της όψιμης και της πρώιμης φάσης της ζωής των HPV. Παρόλα αυτά όμως η λειτουργία της E1[^]E4 μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών (Fang L. et al., 2006).

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

απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του.

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

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

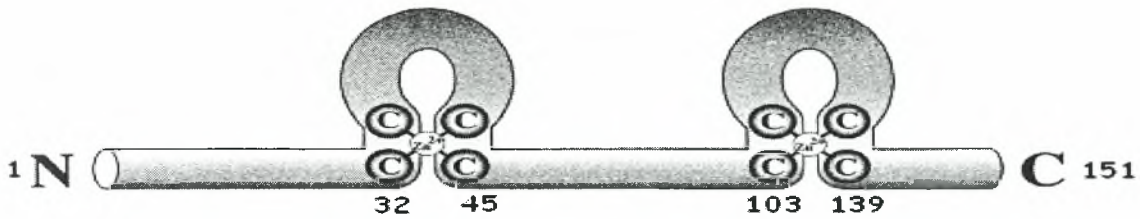
1.2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 των HPVs υψηλού κινδύνου έχει βρεθεί, μαζί με τις πρωτεΐνες E6 και E7, ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση. Η E5 είναι μια υψηλά υδρόφοβη μεμβρανοσυνδεόμενη πρωτεΐνη. Αποτελείται από 83 αμινοξέα και αλληλεπιδρά τόσο με το σύστημα Golgi, όσο και με το ενδοπλασματικό δίκτυο και την πυρηνική μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al., 1993).

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

1.2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνες, τόσο στους χαμηλού κινδύνου όσο και στους υψηλού κινδύνου ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων, έχουν μέγεθος περίπου 150 αμινοξέων και περιέχουν στο μόριό τους δυο περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου οι οποίες διαθέτουν το μοτίβο Cys-X-X-Cys (εικόνα 2.7) (zur Hausen H. et al., 2002).

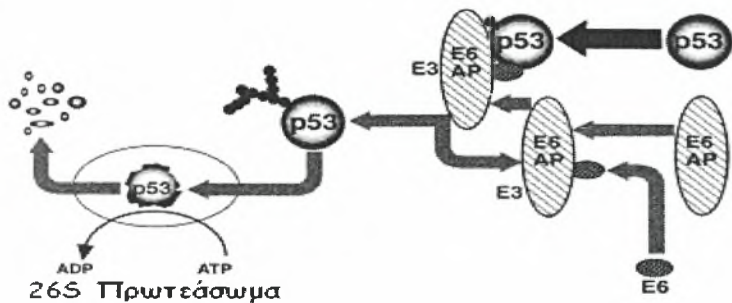


Εικόνα 2.7: Η πρωτεΐνη E6 του HPV 16 στην οποία φαίνονται οι δυο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου.

Η E6 των τύπων υψηλού κινδύνου εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και τον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων. Είναι μια από τις ογκοπρωτεΐνες των ιών αυτών και μαζί με την πρωτεΐνη E7 προκαλούν αθανασία και εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων. Η E6 επιφέρει αρκετές σημαντικές αλλαγές στα κύτταρα του ξενιστή μέσω αλληλεπίδρασής της με μια πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της E6 προκαλεί υπερπολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, απώλεια της διαφοροποίησης στα επιθηλιακά στρώματα και ανάπτυξη ήπιων και κακοήθων όγκων μέσω αναστολής της απόπτωσης, αλλαγής του μεταγραφικού μηχανισμού, καταστροφής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων (ένα σημαντικό στάδιο στην δημιουργία κακοήθειας) και αύξησης του χρόνου ζωής των κυττάρων.

Μια από τις κύριες λειτουργίες της E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53*, δηλαδή την πρωτεΐνη *p53*, η οποία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και λειτουργεί ως καταστολέας όγκων (Werness et al., 1990). Αναλύσεις ανθρώπινων όγκων έχουν δείξει ότι το γονίδιο *p53* είναι ένα από τα πιο κοινά μεταλλαγμένα γονίδια (Vogelstein et al., 1990). Καταστάσεις κυτταρικού στρες όπως για παράδειγμα υπεριώδης ακτινοβολία, υποξία ή μόλυνση από ιό προκαλούν αύξηση της κυτταρικής *p53*. Η αύξηση αυτή με την σειρά της επάγει την παραγωγή του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (CdK), δηλαδή του *p21*. Μ' αυτόν τον τρόπο σταματάει ο κυτταρικός κύκλος (στην φάση G1) και το κύτταρο έχει χρόνο να διορθώσει

τις, προκαλούμενες από το στρες, βλάβες στο DNA (Ko L. et al., 1996, Kuebritz et al., 1992). Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S. E. et al., 2005). Η E6 προκαλεί αποδόμηση της p53 μέσω ουβικιτινίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η E6 συνδέεται με μια άλλη κυτταρική πρωτεΐνη, την E6AP η οποία λειτουργεί ως μια E3 ουβικιτινική λιγάση (Huibregtse et al., 1993, Scheffner et al., 1993). Το σύμπλοκο E6-E6AP προκαλεί ουβικιτινίωση της p53 και στην συνέχεια την αποδόμηση της από το 26S πρωτεάσωμα (εικόνα 2.8) (Hubbert N. L. et al., 1992, Huibregtse J. M. et al., 1993). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επίσης, η E6 μπορεί να αναστείλει την p53 μέσω της σύνδεσής της με το p300/CBP, ο οποίος είναι ένας συνενεργοποιητής της p53 (Lechner M. S. et al., 1994, Zimmermann H. et al., 1999).



Εικόνα 2.8: Αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 μέσω της δράσης της πρωτεΐνης E6 των HPVs (Thomas M. et al., 1999).

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για την δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Klingelutz et al., 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων έτσι ώστε να αυξάνεται η σταθερότητα τους και να αποφεύγεται η σμίκρυνσή τους κατά την αντιγραφή. Η απώλεια της τελομεράσης οδηγεί στην προοδευτική σμίκρυνσή του τελομερικού DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων κατά την διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα την γήρανσή τους και τελικά τον θάνατό τους (Harley et al 1990). Η τελομεράση είναι ενεργοποιημένη τουλάχιστον στο 90% των καρκινικών κυττάρων αλλά απουσιάζει από τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα (Kim N. W. et al., 1994). Η E6 επάγει την έκφραση της hTERT, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της τελομεράσης, την διατήρηση μεγάλων τελομερικών άκρων κατά την διαίρεση των κυττάρων με άμεση συνέπεια την αναστολή της γήρανσής τους και την απόκτηση αθανασίας (Artandi S.E. et al., 2005).

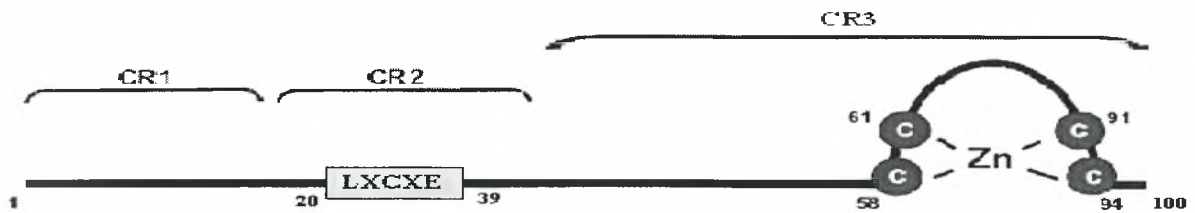
Τέλος, η E6 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσης τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου (εικόνα 2.9). Η αποδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας σε πειράματα με ποντίκια (Nguyen et al., 2003).



Εικόνα 2.9: Η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη E6 των HPV υψηλού κινδύνου αποδόμηση των πρωτεϊνών PDZ.

1.2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

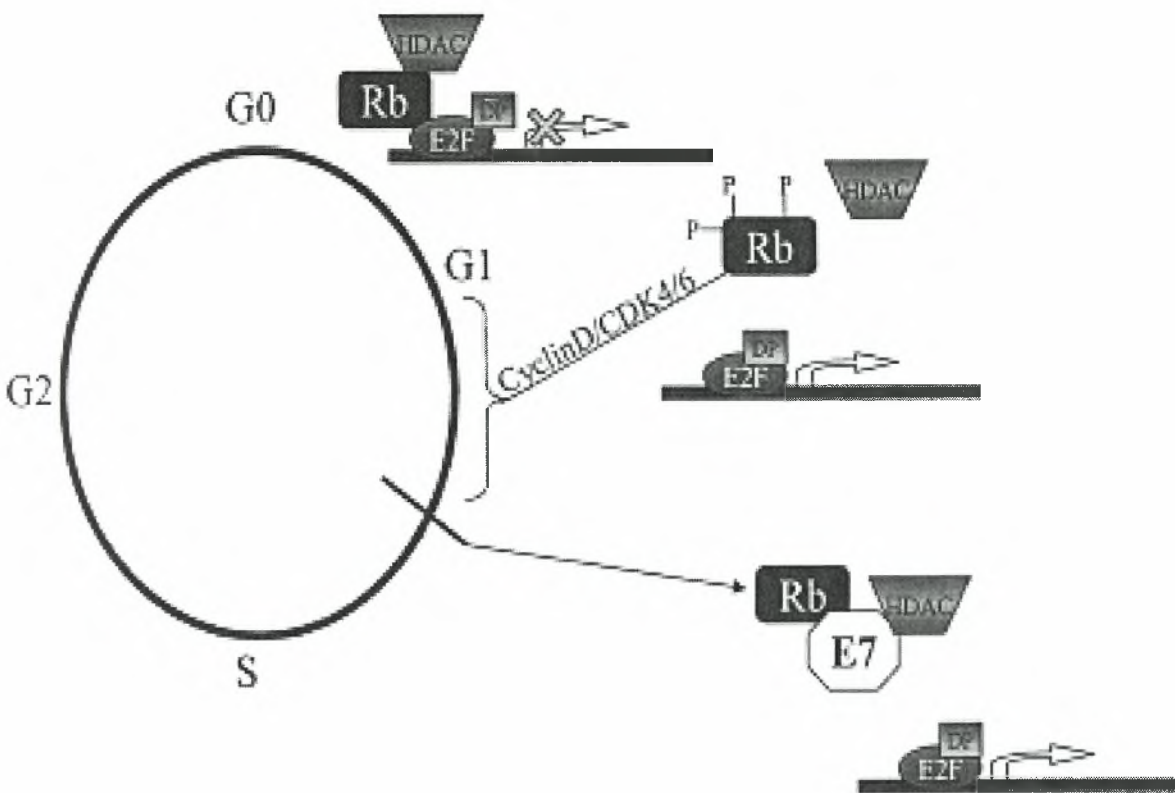
Η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για την αθανασία όσο και για την παθογένεια του ιού είναι η E7. Οι E7 πρωτεΐνες, τόσο των τύπων υψηλού όσο και των τύπων χαμηλού κινδύνου, εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και έχουν μέγεθος περίπου 100 αμινοξέα (Munger K. et al., 1989, Riley R. et al., 2003). Η κυριότερη λειτουργία της E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb, p107, p130), οι οποίες λειτουργούν ως καταστολείς όγκων (Dyson N. et al., 1989). Η E7 διαθέτει θέσεις φωσφορυλίωσης από την καζεϊνική κινάση II στα κατάλοιπα σερίνης 31 και 32 (Chakrabarti O. et al., 2003). Χωρίζεται σε τρεις περιοχές: την CR1, η οποία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και περιέχει τα κατάλοιπα 1-20, την CR2 που περιέχει ένα μοτίβο LXCXE στο οποίο προσδένεται η Rb πρωτεΐνη και περιέχει τα αμινοξέα 21-39 και είναι αρκετά συντηρημένη σε όλους τους τύπους υψηλού κινδύνου και τέλος την περιοχή CR3 η οποία περιέχει δυο μοτίβα 'δάχτυλα' ψευδαργύρου, περιλαμβάνει τα αμινοξέα 40-100 και βρίσκεται στο C-τελικό άκρο (εικόνα 2.10) (Dyson N. et al., 1989). Οι περιοχές CR1 και CR2 έχουν μεγάλη αμινοξική ομολογία με τις περιοχές CR1 και CR2 του αδενοϊού E1A οι οποίες προσδένουν κι αυτές τις πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος (Phelps P. et al., 1988).



Εικόνα 2.10: Η πρωτεΐνη E7. Στην εικόνα αυτή φαίνονται οι τρεις περιοχές της πρωτεΐνης.

Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1 με συνέπεια να ενεργοποιείται και να επάγει η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA (Dyson N. et al., 1998). Η πρωτεΐνη E7 δεσμεύει την αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου E2F/DP1 και κατ' επέκταση τον συνεχή πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Επίσης, η E7 αλληλεπιδρά και με την απακετυλάση των ιστονών (histone deacetylase, HDAC) (Brehm A. et al., 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η συνεργασία της με την pRb στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν μολυνθεί από HPV, η Rb προσδένει τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές που εξαρτώνται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Οι HDACs αφαιρούν ακετυλομάδες από πλούσιες σε λυσίνη αμινοτελικές ουρές ιστονών οι οποίες συγκροτούν τα νουκλεοσώματα. Επιπροσθέτως, μπορούν να απακετυλιώσουν απευθείας τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους και κατ' επέκταση την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Marks P. et al., 2001). Η E7 συνδέει ταυτόχρονα την Rb και την HDAC, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στον υπερπολλαπλασιασμό και την αθανασία των μολυσμένων κυττάρων (Liu Y. et al., 1999). Όλα τα παραπάνω αναπαριστώνται στην εικόνα 2.11.

Τέλος, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. (Funk J.O et al., 1997). Στον πίνακα 2.1 αναγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες όλων των πρωτεϊνών του ιού.



Εικόνα 2.11: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από της πρωτεΐνες Rb, HDAC και το μεταγραφικό σύμπλοκο E2F/DP-1, καθώς και πως επηρεάζεται από την δράση της E7.

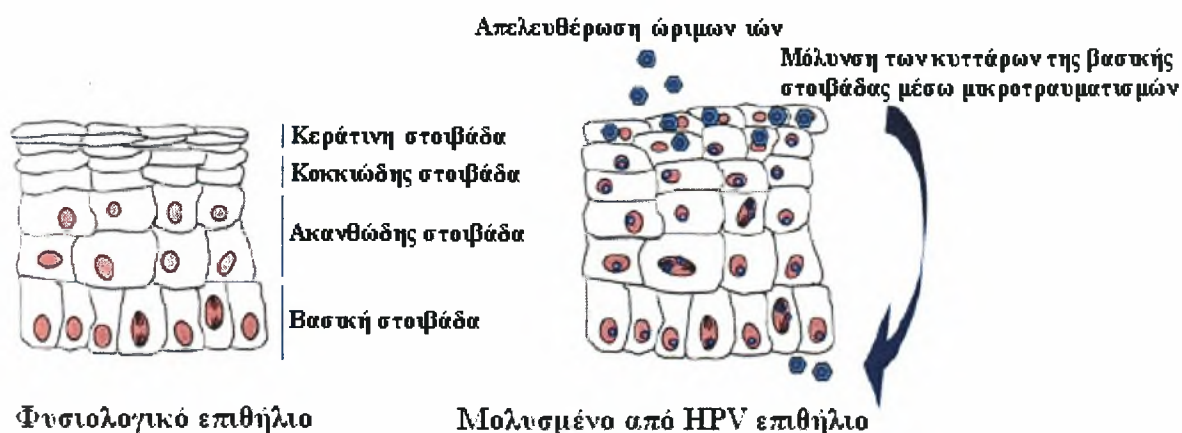
Γονίδιο:	Λειτουργία
E1	Αντιγραφή του DNA, διατήρηση επισώματος, μεταγραφική καταστολή .
E2	Αντιγραφή του DNA (με την E1), έλεγχος μεταγραφής.
E3	Άγνωστη λειτουργία (έχει βρεθεί μόνο στον ιό BPV1).
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1 ^{E4} πρωτεΐνη. Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών (HDAC).
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη. Εμπλέκεται στην σταθεροποίηση της δομής του καψιδίου και πιθανώς και στο πακετάρισμα του DNA.

Πίνακας 2.1: Περιληπτική αναφορά όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

1.3 Ο κύκλος ζωής των HPV

1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

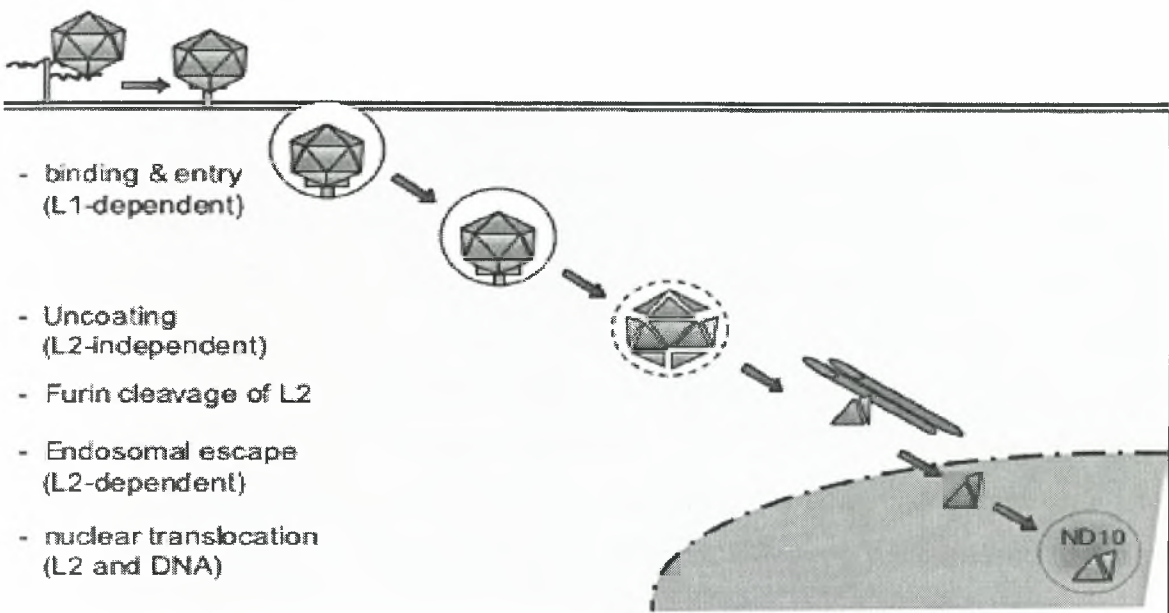
Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή (Howley and Lowy, 2001). Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Μόλυνση της βασικής στοιβάδας από HPV.

Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσης του με την θειϊκή ηπαρίνη η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S. et al., 2003). Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon C.S. et al., 2001). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμινίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culr T.D. et al., 2006). Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έπειτα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (εικόνα 3.2) (Day P.M. et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί, ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε

δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 (Pulido H. et al., 2006).

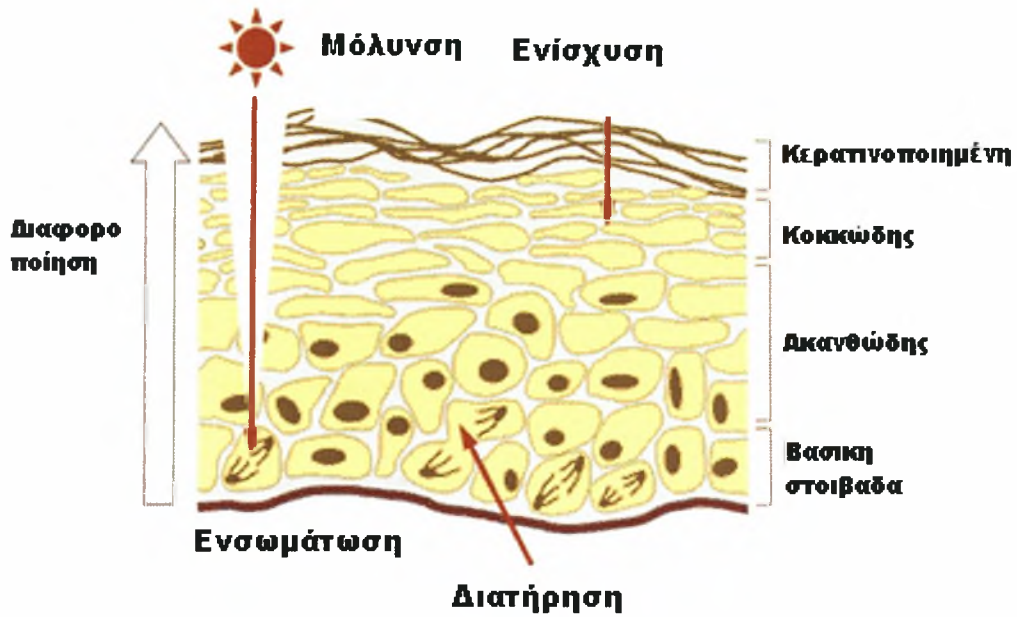


Εικόνα 3.2: Είσοδος του HPV στο κύτταρο-ξενιστή.

1.3.2 Αντιγραφή του ιικού γενόματος

Η αντιγραφή του γενόματος των HPV κατά την διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την ενσωμάτωση, την διατήρηση και την ενίσχυση (εικόνα 3.3). Κατά την διάρκεια της φάσης της ενσωμάτωσης που ακολουθεί την μόλυνση, ένα HPV γένωμα μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και ξεκινά αρκετούς γύρους αντιγραφής και φτάνει 50 - 100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Σε αυτό το σημείο το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Ακολουθώντας την ενσωμάτωση, το ιικό γένωμα αντιγράφεται, μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, κατά μέσο όρο ένα σε κάθε κυτταρικό κύκλο κατά την διάρκεια της φάσης S, με την διατήρηση ενός σταθερού αριθμού αντιγράφων για περιόδους, που

περιορίζεται σε δεκάδες εξαιτίας της ρύθμισης της έκφρασης των E1 και E2 από την E2 πρωτεΐνη (Steger and Corbach 1997, Stubenrauch et al., 1998b). Τα επίπεδα της E2 ρυθμίζουν την πρώιμη ιική μεταγραφή. Σε μικρό αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της E2, η E2 ενεργοποιεί την έκφραση από τον πρώιμο υποκινητή ο οποίος οδηγεί στην έκφραση των E1 και E2, ενώ, από την άλλη, η E2 σε υψηλά επίπεδα, παρεμποδίζει την μεταγραφή (Stubenrauch et al., 1998b). Μ' αυτόν τον τρόπο, η έκφραση των ικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και ο αριθμός των αντιγράφων του ικού γενώματος πιστεύεται ότι διατηρούνται σε ένα σταθερό, ευνοϊκό επίπεδο στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Κατά την διαφοροποίηση, η μεταγραφή των αντιγραφικών γονιδίων εξαρτάται, όχι πλέον από τον E2-ρυθμιζόμενο πρώιμο υποκινητή, αλλά από τον περισσότερο ενεργό όψιμο υποκινητή ο οποίος είναι ανεξάρτητος από την πρωτεΐνη E2 (Klumpp and Laimins, 1999). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των E1 και E2 πρωτεϊνών αντιγραφής από αυτόν τον ειδικό υποκινητή οδηγούν στην ενίσχυση του ικού γενώματος σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ικού DNA που θα εισέρθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων (Hoffmann R. et al., 2006). Ανάλυση των επιπέδων των ικών μετάγραφων κατά την διάρκεια της σύνθεσης του DNA υποδηλώνει ότι η E1 πρέπει να είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ενίσχυσης του ικού γονιδιώματος (Ozbum and Meyers, 1998a).



Εικόνα 3.3: Οι τρεις φάσεις της αντιγραφής του γενώματος του HPV (ενσωμάτωση, διατήρηση και ενίσχυση).

Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) (Corden S. A. et al., 1999, Pett M. R. et al., 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με την σειρά τους επάγουν το κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου.

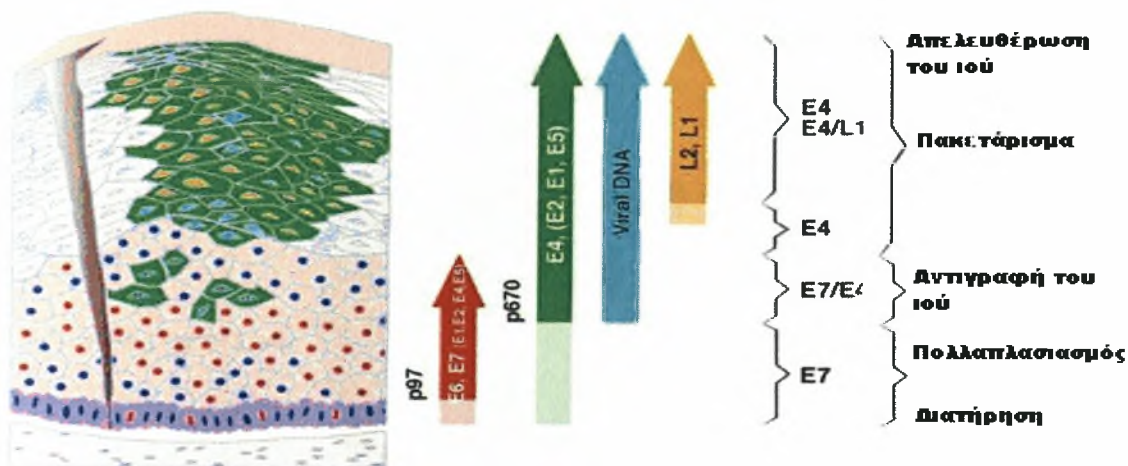
Σε χαμηλού βαθμού CIN αλλοιώσεων, το γονιδίωμα των HPV παραμένει σε επισωματική μορφή, και τα mRNA τα οποία κωδικοποιούνται από τον HPV και εκφράζονται σ' αυτές τις αλλοιώσεις περιέχουν μόνο ικές αλληλουχίες. (Lehn H. et al., 1988, Fukushima M. et al., 1990). Σε τραχηλικά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο, το ικό γονιδίωμα είναι συχνά ενσωματωμένο στα χρωμοσώματα των κυττάρων-ξενιστών (Baker C. C. et al., 1987, Schwartz F. et al., 1985, Durst M. et al., 1985). Η ενσωμάτωση του γενώματος των HPV στις περισσότερες περιπτώσεις επιδρούν στην δημιουργία των mRNA τα οποία περιέχουν τα ικά ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και αλληλουχίες του κυτταρικού γονιδιώματος (Lehn H. et al., 1988, Choo K. B. et al., 1987). Η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος συμβάλλει στην απορύθμιση της έκφρασης των ικών ογκογονιδίων E6 και E7 (von Knebel Doeberitz et al., 1991, Jeon S. et al., 1995). Τελικά, είναι πλήρως αποδεδειγμένο ότι η έκφραση αυτών των ογκογονιδίων είναι απαραίτητη για την πρόκληση και την διατήρηση του νεοπλασματικού φαινοτύπου των τραχηλικών

καρκινικών κυττάρων (von Knebel Doeberitz et al., 1994). Αυτές οι πληροφορίες υποδηλώνουν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου τα οποία εκφράζουν τα ενσωματωμένα στα χρωμοσώματα HPV ογκογονίδια παρουσιάζουν ένα μεγάλο πλεονέκτημα επιλεκτικής ανάπτυξης και είναι επιρρεπή για κλωνική ανάπτυξη σε καρκινικά κύτταρα.

1.3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

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

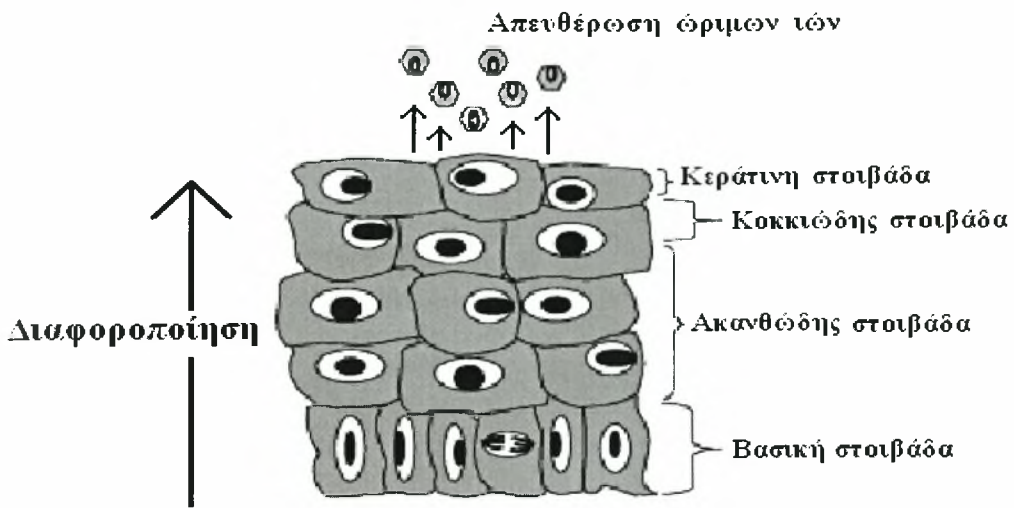
Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στην σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1,E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1, L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670. Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (Grassmann K. et al., 1996). Η μεταγραφή παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 3.4.



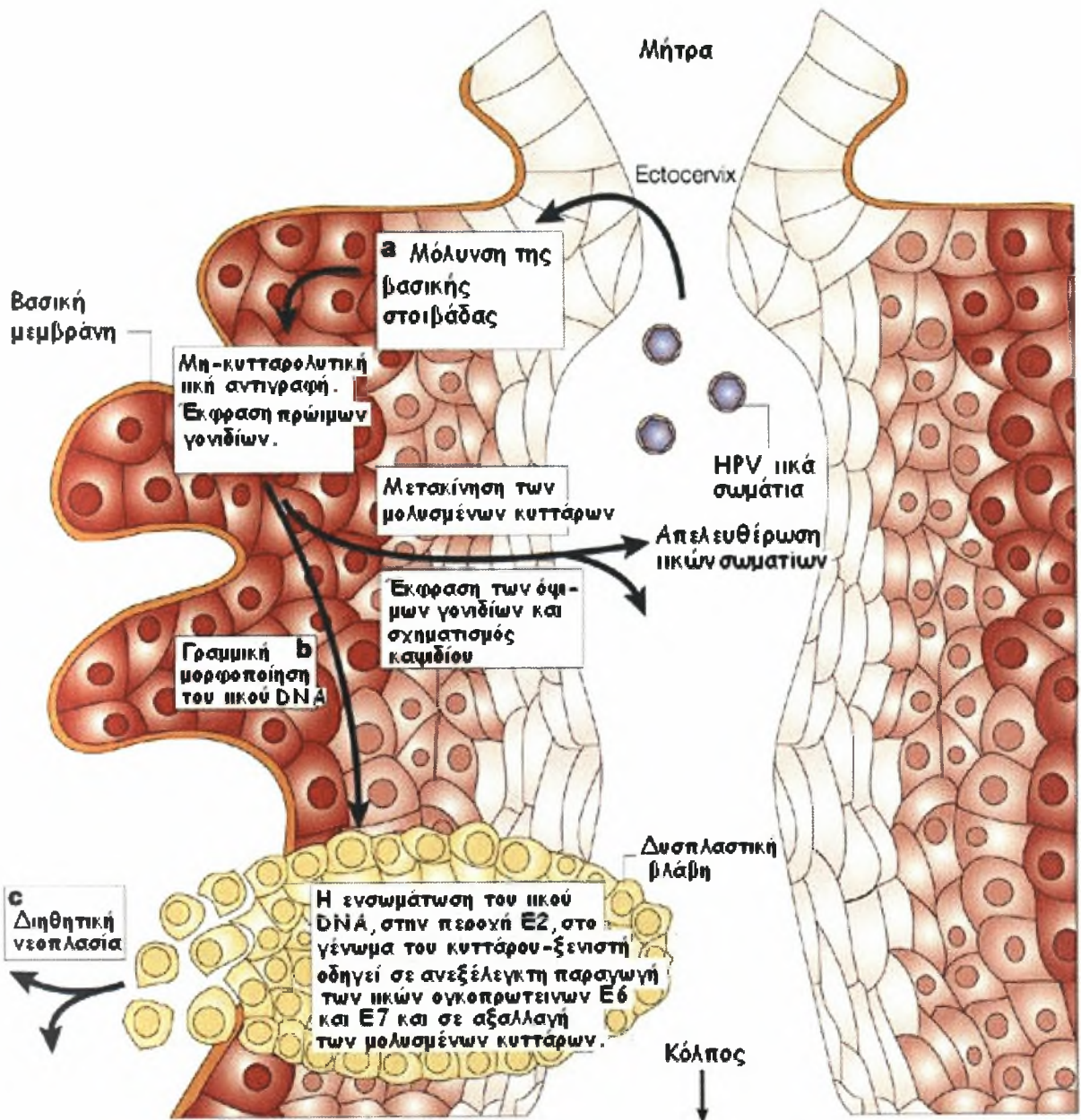
Εικόνα 3.4: Συνοπτική απεικόνιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος.

1.3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Στο τελικό στάδιο του κύκλου ζωής των HPV πραγματοποιείται η τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος μέσα στα νεοσυντεθέντα ιικά καψίδια. Η συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων πραγματοποιείται στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα, και περιλαμβάνει, εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, και την πρωτεΐνη E2, η οποία έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B. et al., 2004). Η L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή και σχηματίζει τα L1 πενταμερή, τα οποία είναι απαραίτητα για την συγκρότηση του καψιδίου, ενώ η L2 εντοπίζεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και πιστεύεται ότι συμβάλει στο πακετάρισμα του ιικού γενώματος εντός των νεοσυντεθέντων καψιδίων (Florin et al., 2002). Η ωρίμανση των ιικών σωματιδίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέρθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια (εικόνα 3.5). Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr E. et al., 2004). Στην εικόνα 3.6 απεικονίζεται συνολικά ο κύκλος ζωής των HPV.



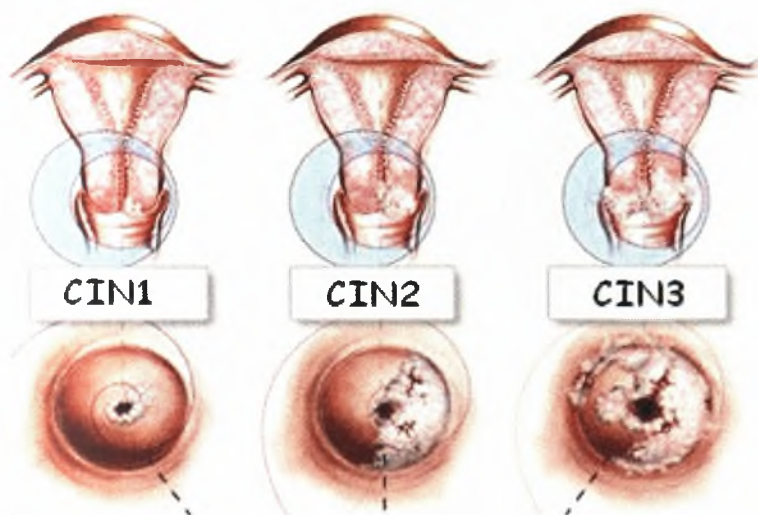
Εικόνα 3.5: Απελευθέρωση των ώριμων HPV ιών από την κεράτινη στοιβάδα.



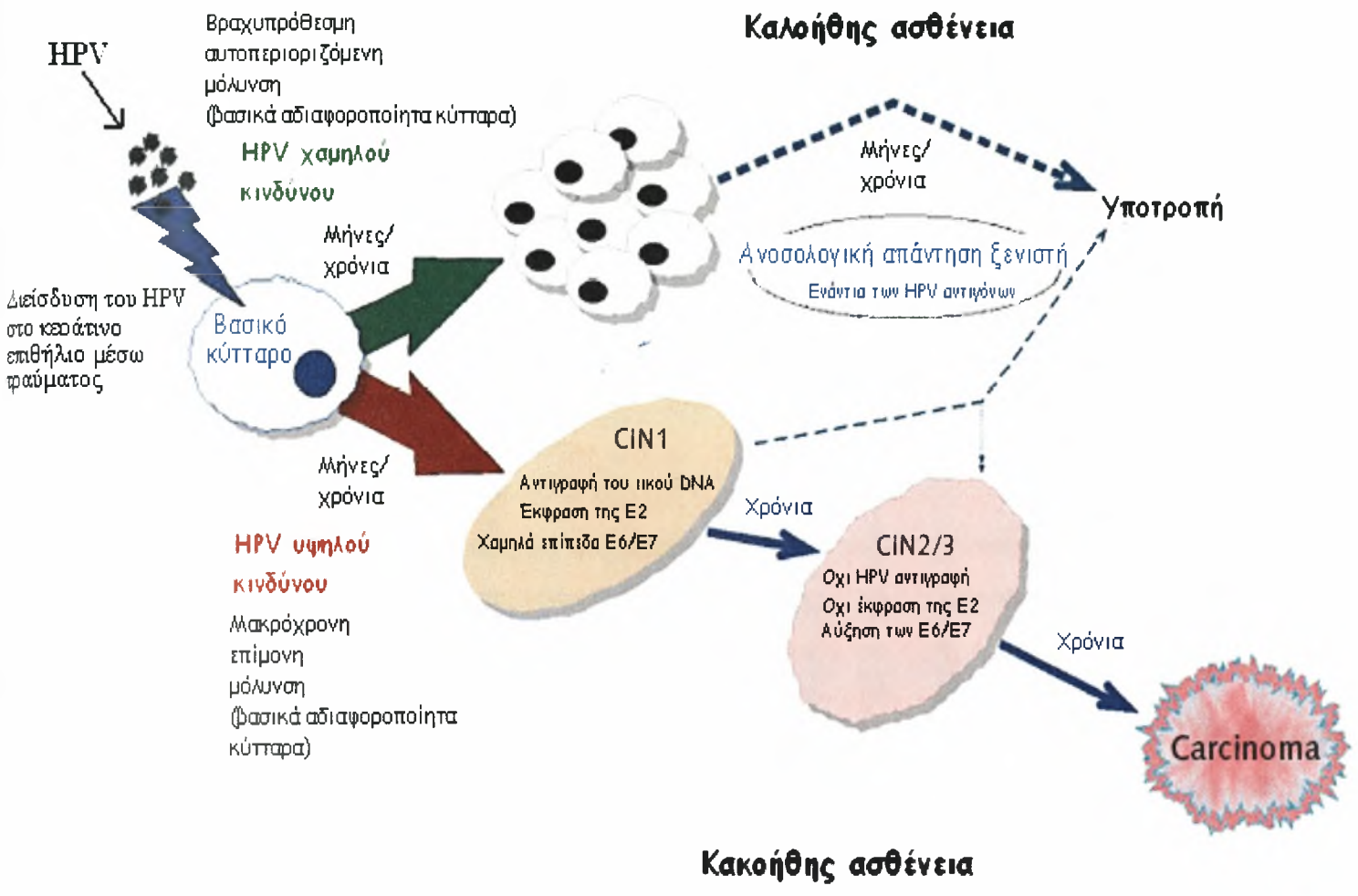
Εικόνα 3.6. Συνοπτική απεικόνιση του κύκλου ζωής των HPV.

1.3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A. et al., 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A. et al., 2003). Οι παραπάνω αλλοιώσεις φαίνονται στην εικόνα 3.5. Τέλος, στην εικόνα 3.6 απεικονίζεται συνοπτικά όλη η πορεία, από την μόλυνση της βασικής στοιβάδας από τους HPV (τόσο χαμηλού όσο και υψηλού κινδύνου) μέχρι και τις αλλοιώσεις που αυτοί προκαλούν.



Εικόνα 3.5: Καρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.



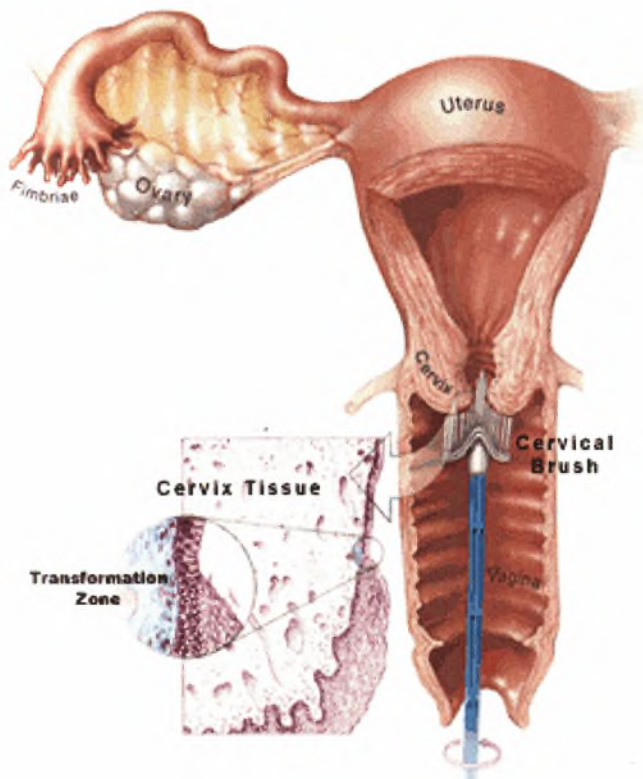
Εικόνα 3.6: Συνοπτική απεικόνιση της συνολικής πορείας των HPV, από την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου μέχρι και τις αλλοιώσεις που αυτοί προκαλούν.

1.4 Εργαστηριακή διάγνωση

Για την εργαστηριακή διάγνωση HPV χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα στα νοσοκομεία δύο κυρίως μέθοδοι ρουτίνας. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν το pap test και το Hybrid Capture- II και έχουν συμβάλει σημαντικά στην μείωση της επίπτωσης και της επέκτασης της ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες.

1.4.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap)

Το τεστ Παπανικολάου (test Pap) αποτελεί μια κυτταρολογική εξέταση και βασίζεται στην μικροσκοπική ανίχνευση μετασχηματισμένων τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 4.1). Το δείγμα μπορεί να απλωθεί απευθείας σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή μπορεί να τοποθετηθεί σε διάλυμα συντήρησης. Σύμφωνα με την Food and Drug Administration (FDA) υπάρχουν δύο μέθοδοι για την παρασκευή υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτοί είναι το PrepStain σύστημα και η ThinPrep smear μέθοδος (Howell L.P. et al., 1998). Παρόλα αυτά η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία των κυτταρολόγων και τον ποιοτικό έλεγχο που εφαρμόζεται σε κάθε εργαστήριο.



Εικόνα 4.1: Κύτταρα συλλέγονται από τον τράχηλο της μήτρας με την βοήθεια της τραχηλικής βούρτσας (Cervical Brush) και εξετάζονται μικροσκοπικά για τυχόν αλλοιώσεις. Τα κύτταρα που συλλέγονται αποτελούν το επίχρισμα Παπανικολάου (Pap smear).

1.4.2 Hybrid Capture II test

Στις ΗΠΑ η FDA συνιστά στις γυναίκες άνω των 30 ετών για την ανίχνευση των HPV μαζί με το pap test και την χρήση του Hybrid Capture II test. Το Hybrid Capture II test είναι μια μη ραδιενεργή μέθοδος και βασίζεται στην ενίσχυση σήματος, από τον υβριδισμό σημασμένων DNA ανιχνευτών με το DNA του HPV στόχου (Bozzeti M. et al., 2000, Loriez A.T. et al., 1996). Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται DNA ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες 13 τύπων υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπους χαμηλής επικινδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44). Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των τύπων HPV με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση HPV λοίμωξης από ότι, το pap test και το Hybrid Capture- II test. (Clavel et al., 2001, Cuzick et al., 1999, Schiffman et al., 2000).

1.4.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

1.4.3.1 PCR με εκκινητικά μόρια MY09/MY11 και GP5+/GP6+

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

μεμβράνες εμφανίζονται με αυτοραδιογραφία. Γενικά το σύστημα MY09/MY11 φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστο για τον εντοπισμό πολλαπλών μολύνσεων (Weimin Qu et al., 1997).

1.4.3.2 PCR σε συνδυασμό με Microarrays

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

1.4.3.3 Real time PCR

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

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

1.4.3.4 Nested Multiplex PCR

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

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κλινικά Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν έξι κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία στάλθηκαν από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Άγιος Σάββας'. Στα δείγματα αυτά βρέθηκε η ύπαρξη ιών HPV, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας ως HPV -16. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τη χρονική περίοδο 2003-2005 και διατηρήθηκαν σε υγρό μέσο Thin Prep στους -20°C . Η κωδικοποίηση των δειγμάτων, όπως στάλθηκαν από το νοσοκομείο, παρουσιάζεται στον πίνακα 5.1.

Κλινικά Δείγματα
710
747
793
796
858
868

Πίνακας 5.1: Κλινικά δείγματα τα οποία περιέχουν HPV -16.

2.2 Απομόνωση DNA-RNA

Η απομόνωση του DNA και του RNA έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas I. et al., 1996). Από κάθε κολπικό επίχρισμα πήραμε 100μl, τα οποία τα αναμείξαμε μετά από καλό vortex με 10μl/tube γλυκογόνο και 300μl Lysis Buffer αποτελούμενου από: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate και τα επώασαμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl κρύας ισοπροπανόλης διατηρημένης στους -20°C . Μετά από καλό vortex τα δείγματα έμειναν στον πάγο για 20min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 14.000xg στους $+4^{\circ}\text{C}$. Η ισοπροπανόλη (υπερκείμενο) απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500μl κρύας αιθανόλης

70%. Μετά από καλό vortex ακολούθησε φυγοκέντρωση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η αιθανόλη (υπερκείμενο) απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA και RNA επαναδιαλύθηκαν σε 100μl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA και RNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

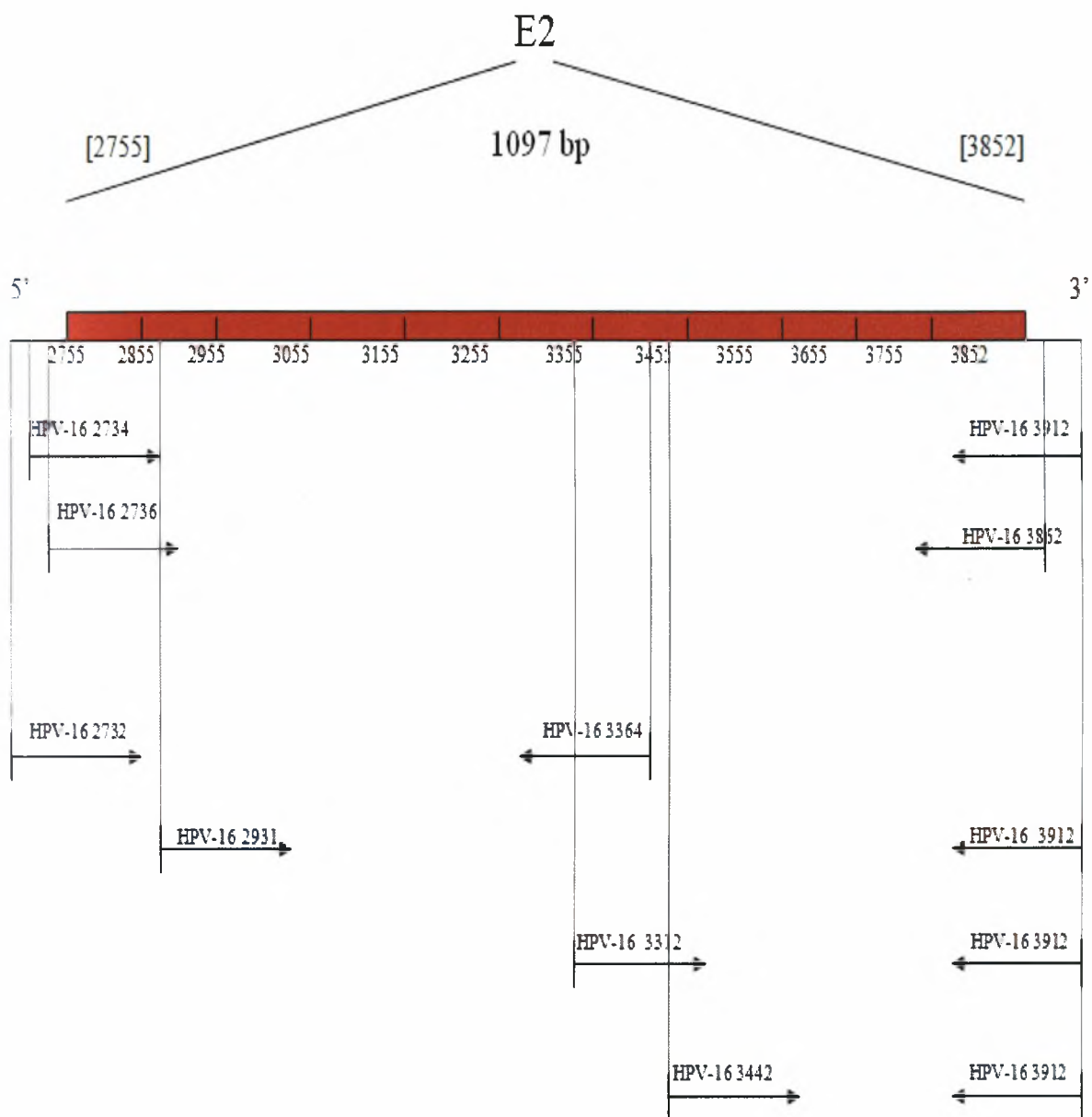
2.3 Εκκινητικά μόρια PCR

Η παρούσα ερευνητική μελέτη βασίστηκε στην δημοσίευση του B. Bhattacharjee και συν. 2005. Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν το γονίδιο E2 του HPV -16, ολόκληρο ή μεμονωμένα τμήματα αυτού, ανάλογα με το αν το γονιδίωμα του έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυττάρων των κλινικών δειγμάτων ή όχι αντίστοιχα. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η ενσωμάτωση του γενώματος του ιού γίνεται στην περιοχή του γονιδίου E2 μετά από θραύση του σε μία από τις τρεις περιοχές από τις οποίες αποτελείται. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα ζεύγη primers της συγκεκριμένης δημοσίευσης, όσο και ζεύγη primers τα οποία σχεδιάσαμε με την βοήθεια του προγράμματος Primer3 Output, Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>) και με βάση την κατατεθειμένη αλληλουχία στο GenBank του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) τύπου -16 (κωδικός αριθμός πρόσβασης αλληλουχίας: NC001526). Τέλος οι εκκινητές συντέθηκαν από την Metabion (Germany). Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2 μαζί με τις αλληλουχίες τους, τα σημεία πρόσδεσής τους στο γονιδίωμα και το μήκος του προϊόντος της περιοχής του γονιδίου E2 που ενισχύουν.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
W1	2811	Sense	ATGAAAATGATAGTACAGAC	1026 bp	Bhattacharjee B. et al 2006
W2	3837	Antisense	CCAGTAGACACTGTAATAG		Bhattacharjee B. et al 2006
A1	2810	Sense	ATGAAAATGATAGTACAGAC	661 bp	Bhattacharjee B. et al 2006
A2	3471	Antisense	TGGATAGTCTGTGTTTCTTCG		Bhattacharjee B. et al 2006
B1	3448	Sense	CGAAGAAACACACTACACCCATA	203 bp	Bhattacharjee B. et al 2006
B2	3649	Antisense	TAAAGTATTAGCATCACCTT		Bhattacharjee B. et al 2006
C1	3596	Sense	GTAATAGTAACACTACACCCATA	277 bp	Bhattacharjee B. et al 2006
C2	3872	Antisense	GGATGCAGTATCAAGATTTGT		Bhattacharjee B. et al 2006
HPV-16 2734*	2734	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1176 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3912*	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA		Παρούσα μελέτη
HPV-16 2736*	2736	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1162 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3862*	3862	Antisense	GCAAAAAGCACGCCAGTAAT		Παρούσα μελέτη
HPV-16 2732*	2732	Sense	GAGGACGAGGACAAGKAAAA	632 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3364	3364	Antisense	CGTTGCTGCTAAACACAGATG		Παρούσα μελέτη
HPV-16 2931	2931	Sense	CCAACACTGGCTGTATCAAAGA	980 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA		Παρούσα μελέτη
HPV-16 3312	3312	Sense	ATGCGGGTGGTCAGGTAAT	598 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA		Παρούσα μελέτη
HPV-16 3442	3442	Sense	CACCGAAGAAACACAGACGA	468 bp	Παρούσα μελέτη
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA		Παρούσα μελέτη

Πίνακας 5.1: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους, η πολικότητά τους και το μέγεθος του προϊόντος της PCR (PCR product length). Τα ζεύγη εκκινητικών μορίων W1-W2, HPV-16 2734 / HPV-16 3912 και HPV-16 2736 / HPV-16 3862 ενισχύουν ολόκληρο το E2 γονίδιο, ενώ τα ζεύγη A1-A2, B1-B2, C1-C2, HPV-16 2732 / HPV-16 3364, HPV-16 2931 / HPV-16 3912, HPV-16 3312 / HPV-16 3912 και HPV-16 3442 / HPV-16 3912 ενισχύουν συγκεκριμένα τμήματα του.

*Οι primers αυτοί σχεδιάστηκαν έτσι, ώστε να πιάνουν εξωτερικά του E2 γονιδίου. Μ' αυτόν τον τρόπο αυξήσαμε την πιθανότητα να ενισχύσουμε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου.



Εικόνα 5.1: Απεικονίζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν στη παρούσα ερευνητική μελέτη καθώς και οι περιοχές του γονιδίου E2 του HPV-16 στις οποίες συνδέονται.

2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.4.1 Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε στα έξι εκχυλισθέντα δείγματα μια PCR χρησιμοποιώντας ειδικά εκκινητικά μόρια τα οποία ενισχύουν το γονίδιο της β-γλοβουλίνης, με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας του DNA. Το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήσαμε για την συγκεκριμένη PCR είναι το εξής: PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') και GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε εκχυλισθέν δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων (PC04/GH20) συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000 Stratagene) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 40 °C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 60sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Η PCR που πραγματοποιήθηκε περιέχει έναν θετικό μάρτυρα από DNA που απομονώθηκε από κύτταρα MRC5 και Rd τα οποία προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH2O ελεύθερο από DNases και RNases.

2.4.2 Ενίσχυση του E2 γονιδίου

Στην συνέχεια τα έξι δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου του ιού, ολόκληρου ή τμημάτων του, με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε εκχυλισθέν δείγμα, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla

USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 50°C για 30sec για τα ζεύγη W1/W2, A1/A2, B1/B2 και C1/C2 και 56 °C για 10sec για τα ζεύγη HPV-16 2734/HPV-16 3912, HPV-16 2736/HPV-16 3862, HPV-16 2732/HPV-16 3364, HPV-16 2931/HPV-16 3912, HPV-16 3312/HPV-16 3912 και HPV-16 3442/HPV-16 3912 και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από κάθε προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 200V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

2.5 Ενίσχυση των μεταγράφων των ικών ογκογονιδίων - APOT assay

Η ενσωμάτωση του γενώματος των HPV στις περισσότερες περιπτώσεις επιδρούν στην δημιουργία των mRNA τα οποία περιέχουν τα ικά ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και αλληλουχίες του κυτταρικού γονιδιώματος. Η ενσωμάτωση του ικού γενώματος συμβάλει στην απορύθμιση της έκφρασης των ικών ογκογονιδίων E6 και E7. Το πρωτόκολλο APOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts), το οποίο είναι ένα RT-PCR πρωτόκολλο, επιτρέπει την διάκριση των HPV mRNAs που προέρχονται από το ενσωματωμένο και το επισωματικό ικό γονιδίωμα (Klaes R. et al., 1999).

2.5.1 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Τελικό RNA (5 μl) από το εκχυλισθέντα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή (RT) χρησιμοποιώντας ένα oligo(dT)₁₇-εκκινητικό μόριο [(dT)₁₇-p3: 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'] και 200U (Units) από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (Invitrogen, Life Technologies) για 50 min στους 42°C σε τελικό όγκο 20 μl.

2.5.2 PCR

Τα μονόκλωνα cDNA που δημιουργήθηκαν από την RT περικλείουν ικές αλληλουχίες οι οποίες στην συνέχεια ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές HPV: E7-ειδικό εκκινητικό μόριο ως sense primer, το εκκινητικό μόριο p1-16 (5'-CGGACACAGAGCCCATTACAAT-3') και ως antisense primer το εκκινητικό μόριο p3 (5'-GACTCGAGTCGACATCG-3') ειδικά για τον HPV-16. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl cDNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Herculase reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2 μονάδες (U) Herculase DNA πολυμεράση (Herculase DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 25 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 59°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 2min. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

2.5.3 Nested PCR

3 μl από το προϊόν ενίσχυσης της 1ης PCR χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την nested PCR κάτω από τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης χρησιμοποιώντας ως sense primer το εκκινητικό μόριο p2-16 (5'-CTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACG-3') και ως antisense primer το εκκινητικό μόριο (dT)₁₇-p3 που χρησιμοποιήθηκε στην RT, μόνο που εδώ η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 67°C και οι κύκλοι της αντίδρασης 40. Όλα τα εκκινητικά μόρια αυτού του πρωτοκόλλου παρουσιάζονται στην δημοσίευση του Klaes R. και συν. 1999. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπως παραπάνω.

2.6 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing)

Από τα προϊόντα της PCR με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 2734/HPV-16 3912 των κλινικών δειγμάτων 747, 793, 858 και 868, 40μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες PCR ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης κόπηκαν από το πήκτωμα και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 1.5ml. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το προϊόν QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και των δυο κλώνων του προϊόντος από την Macrogen Inc, (Seoul, Korea).

2.7 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Προγράμματα βιοπληροφορικής

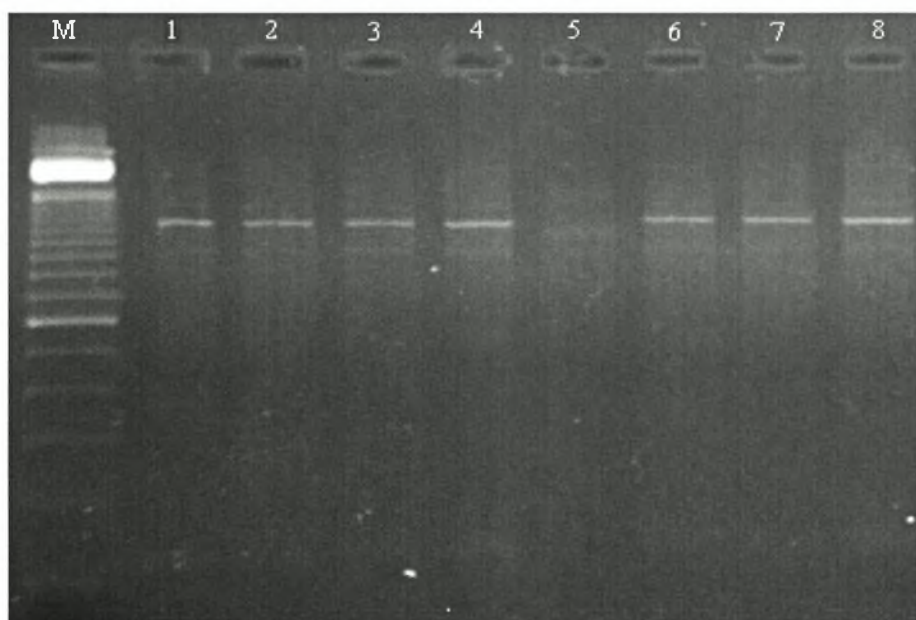
Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων έγινε με την χρησιμοποίηση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Πιο συγκεκριμένα, για την εύρεση γνωστών αλληλουχιών, οι οποίες είναι καταχωρημένες στις παγκόσμιες γονιδιακές τράπεζες δεδομένων (GenBank) χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα BLAST. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το GeneRunner και τέλος, η πολλαπλή στοίχιση, η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η δημιουργία φυλογενετικών δέντρων έγιναν με το MEGA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα PCR

3.1.1 PCR με τα εκκινητικά μόρια της β-γλοβουλίνης

Στην εικόνα 6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης. Όπως παρατηρούμε και τα έξι κλινικά δείγματα (τα οποία συμβολίζονται στην εικόνα με τους αριθμούς 1, 2, 3, 4, 6, και 7) εμφανίζουν τις ζώνες των προϊόντων στο σωστό ύψος σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp DNA Ladder (στην εικόνα συμβολίζεται με το γράμμα M) της εταιρίας Invitrogen, Life Technologies. Αυτό σημαίνει ότι υπήρχε στα εκχυλισθέντα δείγματα DNA. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Rd και MRC-5 (στην εικόνα συμβολίζονται με τους αριθμούς 5 και 8 αντίστοιχα) τα οποία περιέχουν στο γενετικό τους υλικό το γονίδιο της β-γλοβουλίνης. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 6.1 οι θετικοί μάρτυρες έδωσαν αποτέλεσμα στο σωστό ύψος, επομένως η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε κανονικά.



Εικόνα 6.1: Αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους, με τους αριθμούς 1, 2, 3, 4, 6, και 7 τα κλινικά δείγματα 710, 747, 793, 796, 858 και 868 αντίστοιχα και με τους αριθμούς 5 και 8 οι θετικοί μάρτυρες (Rd και MRC-5 αντίστοιχα).

**3.1.2
PCR**

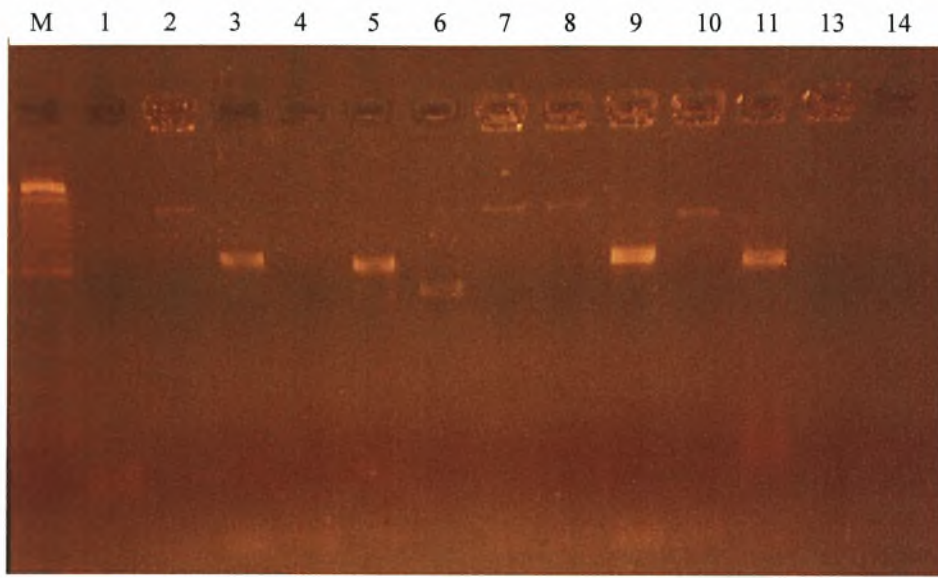
με τα εκκινητικά μόρια της δημοσίευσης

Οι PCR οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης του B. Bhattacharjee και συν. 2005 (W1/W2, A1/A2, B1/B3, C1/C2) για την ενίσχυση του γονιδίου E2 ή συγκεκριμένων περιοχών του, δεν έδωσαν κανένα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην συγκεκριμένη δημοσίευση. Στην δικιά μας περίπτωση ορισμένα ζεύγη έδωσαν αποτελέσματα σε ορισμένα μόνο δείγματα και αυτά σε τελείως διαφορετικά μεγέθη από τα αναμενόμενα ενώ άλλα ζεύγη δεν έδωσαν κανένα αποτέλεσμα.

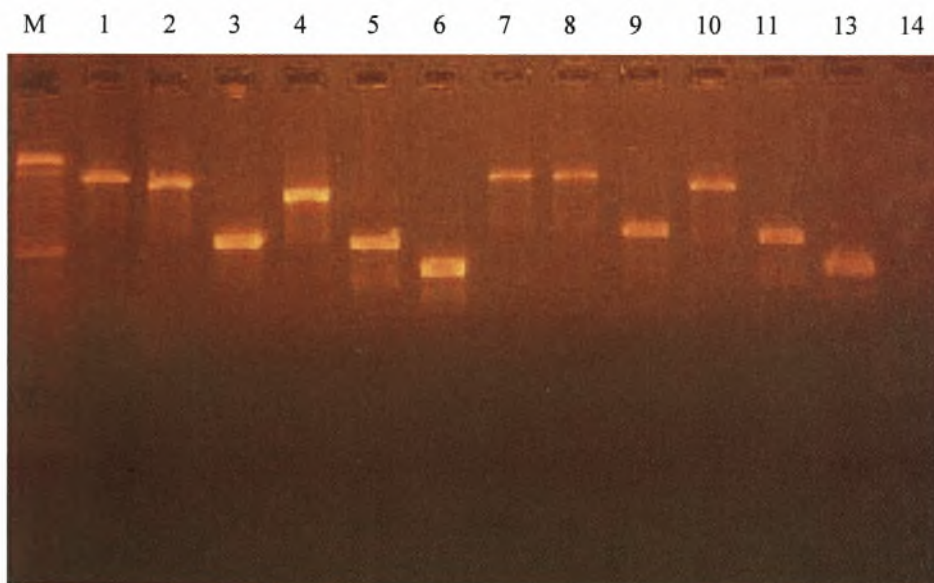
3.1.3 PCR με τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία

Τα αποτελέσματα των PCR που πραγματοποιήθηκαν με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν για την παρούσα ερευνητική εργασία (HPV-16 2734/HPV-16 3912, HPV-16 2736/HPV-16 3862, HPV-16 2732/HPV-16 3364, HPV-16 2931/HPV-16 3912, HPV-16 3312/HPV-16 3912 και HPV-16 3442/HPV-16 3912) παρουσιάζονται στην εικόνα 6.2. Στην εικόνα αυτή με Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους και με τον αριθμό 14 συμβολίζονται τα κύτταρα Rd τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Από τα αποτελέσματα αυτά, παρατηρούμε ότι το δείγμα 710 δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 2734/HPV-16 3912 (εικόνα 6.2α, θέση 1), το δείγμα 747 δεν έδωσε αποτέλεσμα με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 3442/HPV-16 3912 (εικόνα 6.2α, θέση 13) και το δείγμα 858 δεν έδωσε αποτέλεσμα με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 2736/HPV-16 3862 (εικόνα 6.2γ, θέση 8). Επίσης, από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν προϊόν πάνω από τις 1000 bp, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο E2 βρίσκεται άθικτο και επομένως το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται σε επισωμακή μορφή.

α)

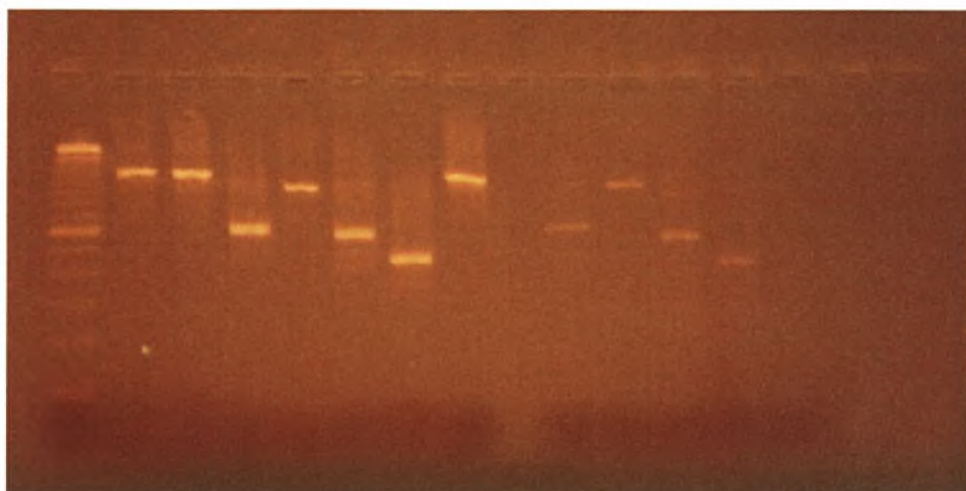


β)



γ)

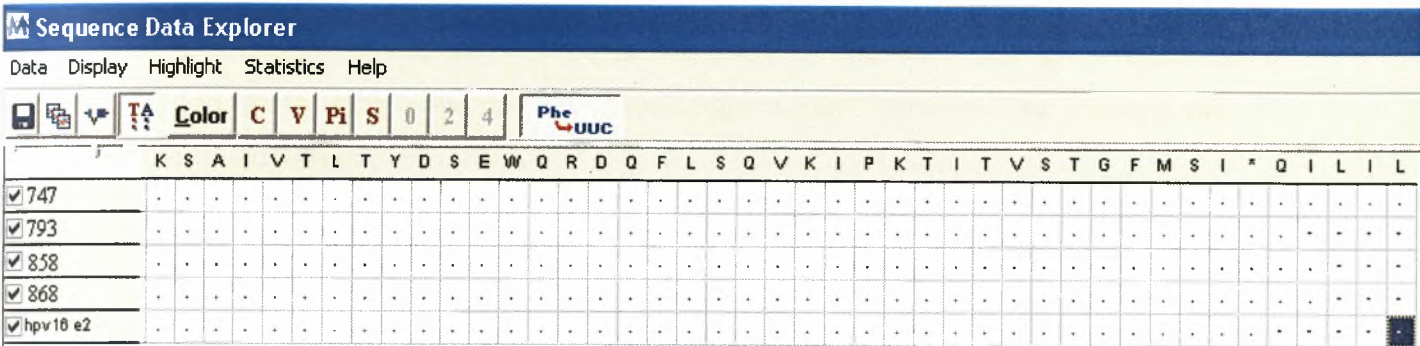
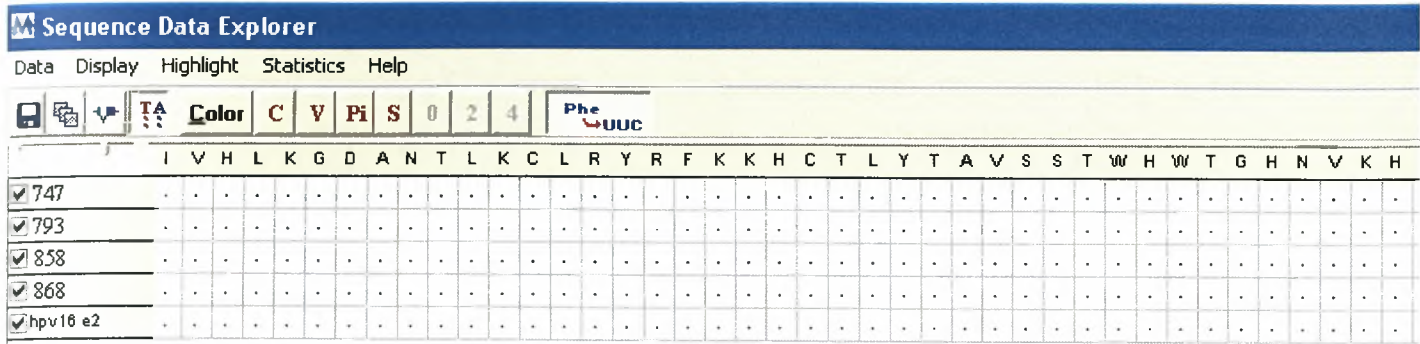
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 13 14



Εικόνα 6.2: Στην εικόνα 6.2α με τους αριθμούς 1, 2, 3, 4, 5 και 6 συμβολίζονται τα ζεύγη εκκινητικών μορίων HPV-16 2734/HPV-16 3912, HPV-16 2736/HPV-16 3862, HPV-16 2732/HPV-16 3364, HPV-16 2931/HPV-16 3912, HPV-16 3312/HPV-16 3912 και HPV-16 3442/HPV-16 3912 αντίστοιχα και αντιστοιχούν στο δείγμα 710. Στην ίδια εικόνα οι αριθμοί 7, 8, 9, 10, 11, 12 και 13 αντιστοιχούν επίσης στα ζεύγη εκκινητικών μορίων που αναφέρθηκαν παραπάνω και αντιστοιχούν στο δείγμα 747. Ο ίδιος συμβολισμός ακολουθείται και στις εικόνες 6.2β και 6.2γ. Στην εικόνα 6.2β οι αριθμοί 1-6 αντιστοιχούν στο δείγμα 793 και οι αριθμοί 7-13 στο δείγμα 796, ενώ στην εικόνα 6.2γ οι αριθμοί αναφέρονται στο δείγμα 868 και οι αριθμοί 7-13 στο δείγμα 858.

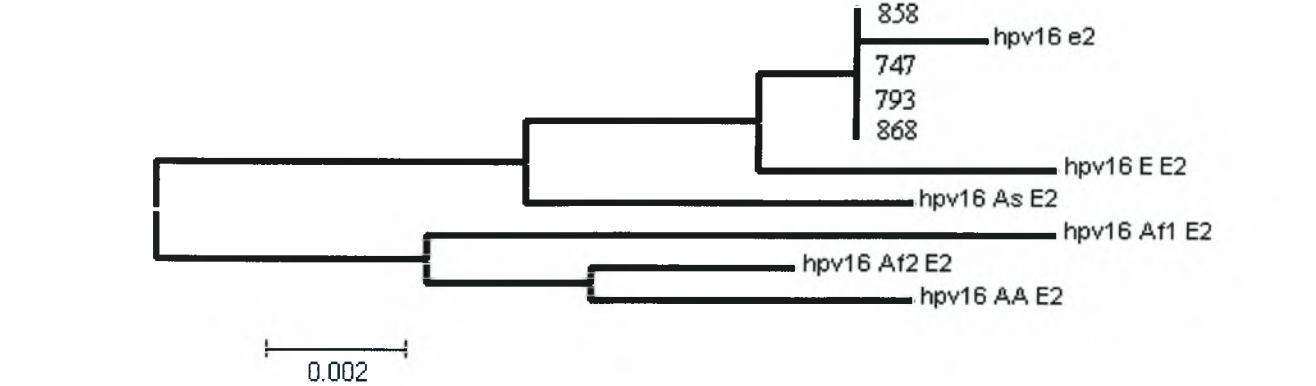
3.2 Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των τμημάτων που ενισχύθηκαν με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 2734/HPV-16 3912 για τα δείγματα 747, 793, 858 και 868 μετά την ηλεκτρονική τους επεξεργασία, συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής MEGA και προέκυψε ότι είναι όμοια μεταξύ τους με ποσοστό ομοιότητας 100%. Η νουκλεοτιδική σύγκριση των κλινικών δειγμάτων με το πρότυπο στέλεχος HPV-16 ανέδειξε ομοιότητα 98%. Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής παρατηρούμε την ύπαρξη δύο νουκλεοτιδικών αλλαγών, στις θέσεις 2925 (A→G) και 3409 (C→T). Με σκοπό τον έλεγχο αμινοξικών αλλαγών από τις παραπάνω μεταλλάξεις πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αντίστοιχης αμινοξικής αλληλουχίας των κλινικών δειγμάτων με αυτή του πρότυπου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.3 η μετάλλαξη στη



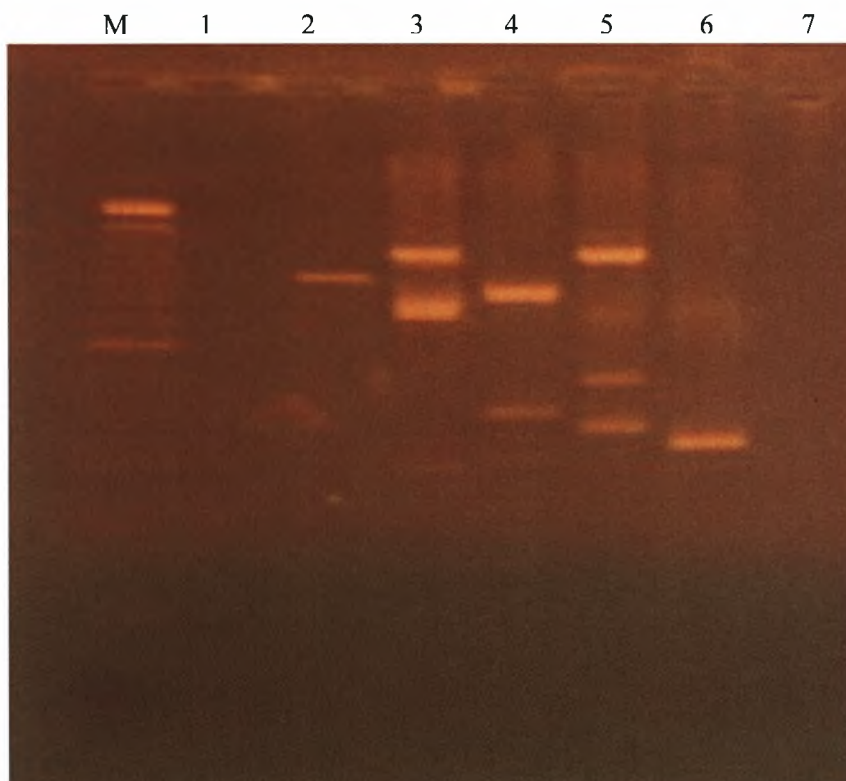
Εικόνα 6.3: Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της E2 πρωτεΐνης των κλινικών δειγμάτων 747, 793, 858 και 868 με αυτήν του πρότυπου στελέχους HPV-16. Η χρωματισμένη στήλη υποδηλώνει την αλλαγή του αμινοξέος (P→S).

Επίσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση και νουκλεοτιδική στοίχιση των κλινικών δειγμάτων με τις αλληλουχίες άλλων στελεχών HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (Af-1), African type-2 (Af-2)] από το GenBank και σχεδιάστηκε το φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζεται στην εικόνα 6.4. Από την εικόνα αυτή παρατηρούμε ότι τα πέντε κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήσαμε για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου ανήκουν στο Ευρωπαϊκό (E) στέλεχος.



Εικόνα 6.4: Φυλογενετικό δέντρο της περιοχής του E2 γονιδίου των κλινικών μας δειγμάτων, του πρότυπου στελέχους HPV-16 και των στελεχών E, As, AA, Af-1 και Af-2.

Στην εικόνα 6.5 φαίνονται τα αποτελέσματα από την nested PCR η οποία πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητικών μορίων p2-16/(dT)₁₇-p3. Η επισωματική μορφή του γονιδιώματος του ιού υποδηλώνεται με προϊόν περίπου στις 1050 bp και οποιοδήποτε άλλο, διαφορετικού μεγέθους, προϊόν υποδηλώνει ενσωματωμένη μορφή του. Από την εικόνα 6.5 παρατηρούμε ότι στο δείγμα 747 (θέση 2) το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή, στο δείγμα 793 (θέση 3) βρίσκεται ταυτόχρονα και σε επισωματική και σε ενσωματωμένη μορφή, στο δείγμα 796 (θέση 4) βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή, στο δείγμα 858 (θέση 5) βρίσκεται και σε επισωματική και σε ενσωματωμένη μορφή και στο δείγμα 868 (θέση 6) βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή. Στην θέση 1 δεν πήραμε αποτελέσματα γιατί τελείωσαν τα κύτταρα από το τραχηλικό δείγμα 710.



Εικόνα 6.5: Στην εικόνα αυτή με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους, οι αριθμοί 1, 2, 3, 4, 5, και 6 αντιστοιχούν στα δείγματα 710, 747, 793, 796, 858 και 868 και ο αριθμός 7 αντιστοιχεί στο ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Στην θέση 1 δεν πήραμε αποτέλεσμα γιατί τελείωσαν τα κύτταρα από το τραχηλικό δείγμα 710.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα, αναμφίβολα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συνδέεται άμεσα με την μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) του τραχήλου, μιας και το 99% των περιπτώσεων αυτού του καρκίνου είναι θετικό σε HPV μόλυνση. Ο επικρατέστερος τύπος HPV που προκαλεί αυτόν τον τύπο καρκίνου είναι ο HPV-16, και ακολουθούν οι τύποι 18, 45, 31 οι οποίοι ανήκουν στους HPV υψηλού κινδύνου (high-risk HPV). Η ογκογόνος δράση αυτών των ιών οφείλεται στις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7, των οποίων η ρύθμιση της μεταγραφής εξαρτάται από την πρωτεΐνη E2, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Το γονιδίωμα του HPV-16 μπορεί να βρίσκεται σε δυο μορφές, είτε επισωματικό, είτε ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Η ενσωμάτωση αυτή γίνεται συνήθως στην περιοχή του E2 γονιδίου, με θραύση σε κάποιο σημείο του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την φυσιολογική παραγωγή ή όχι της πρωτεΐνης E2. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με την μελέτη της κατάστασης του E2 γονιδίου καθώς και σε τι μορφή υπάρχει το γονιδίωμα του HPV-16 (επισωματική ή ενσωματωμένη ή και τα δυο ταυτόχρονα) μέσα στα κύτταρα-ξενιστές σε έξι κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία στάλθηκαν από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Άγιος Σάββας' και ταυτοποιήθηκαν ως HPV-16. Για το σκοπό αυτό, η μελέτη αυτή στηρίχτηκε σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία όμως μας οδηγούν στο ίδιο συμπέρασμα: α) PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου, ολόκληρου ή τμημάτων του, χρησιμοποιώντας ειδικά γι' αυτό ζεύγη εκκινητικών μορίων και β) το πρωτόκολλο APOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts assay) για την ενίσχυση των μεταγράφων των ιικών γονιδίων, είτε αυτά προέρχονται από επισωματικό είτε από ενσωματωμένο ιικό γένωμα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν PCR στα έξι κλινικά δείγματα για την ενίσχυση ολόκληρου του E2 γονιδίου ή τμημάτων του με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων τα οποία αναφέρονται στην δημοσίευση του B. Bhattacharjee και συν. 2005 (W1/W2, A1/A2, B1/B2 και C1/C2). Η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε στα προϊόντα των PCR δεν έδειξε κανένα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα, τα οποία αναφέρονται στην συγκεκριμένη δημοσίευση. Γι' αυτόν τον λόγο, τα παραπάνω εκκινητικά μόρια ελέγχθησαν με πολλαπλή ομοπαράθεση (λογισμικό BLAST και MEGA) για το αν πιάνουν στις αλληλουχίες του E2 γονιδίου του HPV-16 του στελέχους HPV NC001526. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα παραπάνω ζεύγη εκκινητικών μορίων δεν είναι

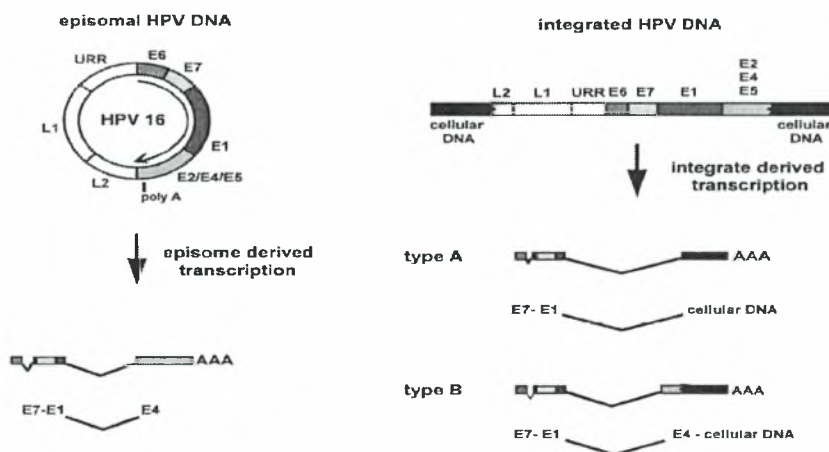
κατάλληλα για την ενίσχυση του E2 γονιδίου του HPV-16, γεγονός που συμπίπτει με τα δικά μας πειράματα. Για το λόγο αυτό σχεδιάσαμε δικά μας εκκινητικά μόρια χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer3 Output με βάση την κατατεθειμένη αλληλουχία στο GenBank του πρότυπου HPV-16 (κωδικός αριθμός πρόσβασης αλληλουχίας: NC001526).

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν PCR με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν στη παρούσα εργασία (HPV-16 2734/HPV-16 3912, HPV-16 2736/HPV-16 3862, HPV-16 2732/HPV-16 3364, HPV-16 2931/HPV-16 3912, HPV-16 3312/HPV-16 3912 και HPV-16 3442/HPV-16 3912) και τα αποτελέσματα από τις ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων φαίνονται στις εικόνες 6.2α, 6.2β και 6.2γ. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται μάλλον σε επισωματική μορφή στα έξι κλινικά δείγματα και αν βρίσκεται σε ενσωματωμένη, να μην έχει ενσωματωθεί μέσω του E2, μιας και πήραμε προϊόντα μεγέθους 1172 bp και 1167 bp τα οποία αντιστοιχούν σε ολόκληρο το E2 γονίδιο. Επίσης πήραμε προϊόντα και με τα άλλα ζεύγη των εκκινητικών μορίων τα οποία ενισχύουν μεμονωμένα τμήματα του γονιδίου, γεγονός που ήταν αναμενόμενο μιας και υπάρχει ολόκληρη η αλληλουχία του. Επίσης, παρατηρούμε ότι ορισμένες PCR δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα (εικόνα 6.2α θέσεις 1 και 13, εικόνα 6.2γ θέση 8), γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε κάποιο τεχνικό πρόβλημα. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουμε ύστερα από τη σύγκριση των αλληλουχιών του E2 γονιδίου των δειγμάτων που έδωσαν αποτελέσματα στις συγκεκριμένες αντιδράσεις με αυτών που δεν έδωσαν η οποία έδειξε 100% ομοιότητα μεταξύ τους.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση και με την αλληλουχία του E2 γονιδίου του πρότυπου στελέχους HPV-16 και επιβεβαιώθηκε ότι ο ιός που υπήρχε στα δείγματά μας ήταν HPV-16, μιας και η σύγκριση αυτή έδειξε 98% ομοιότητα. Τα κλινικά δείγματα φέρουν στο E2 γονίδιο μεταλλάξεις στις θέσεις 2925 (A→G) και 3409 (C→T) σε σχέση με την αντίστοιχη πρότυπη αλληλουχία. Η αλλαγή στη θέση 2925 είναι συνώνυμη, ενώ η αλλαγή στη θέση 3409 οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος (P→S) στην θέση 219 της αμινοξικής αλληλουχίας της E2 πρωτεΐνης (εικόνα 6.3). Η θέση αυτή της αμινοξικής αλλαγής ανήκει στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης (transactivation domain).

Από τη νουκλεοτιδική σύγκριση του E2 γονιδίου των κλινικών δειγμάτων με αλληλουχίες του E2 γονιδίου άλλων στελεχών HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (Af-1), African type-2 (Af-2)] και τη κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου (εικόνα 6.4) παρατηρούμε ότι ο HPV-16 που βρίσκεται στα κλινικά δείγματα ανήκει στο Ευρωπαϊκό (E) στέλεχος.

Τέλος, εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο APOT. Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στις δομικές διαφορές ανάμεσα στα 3'-τελικά άκρα των μεταγράφων των ιικών ογκογονιδίων. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος των HPV υψηλού κινδύνου στα τραχηλικά καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση συνήθως του E2 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και την διάσπαση ή την απάλειψη της poly-A ουράς από τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα ιικά ογκογονίδια. Συνεπώς, τα μετάγραφα που προέρχονται με συμμετοχή των E6 και E7 ογκογονιδίων συνήθως περιλαμβάνουν ικές αλληλουχίες στα 5'-τελικά άκρα και κυτταρικές αλληλουχίες στα 3'-τελικά άκρα. Αυτά τα μετάγραφα συνήθως χρησιμοποιούν την θέση ματίσματος που βρίσκεται μετά από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του E1 γονιδίου (εικόνα 7.1, μετάγραφο τύπου A). Σε μερικές τραχηλικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, το ενσωματωμένο γονιδίωμα των HPV διασπάται μαζί με το E4 γονίδιο, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία συντηγμένων ικών-κυτταρικών μεταγράφων τα οποία συμπεριλαμβάνουν E6-E7-E1 αλληλουχίες στα 5'-τελικά τους άκρα και ακολουθούνται από αλληλουχίες του E4 και κυτταρικές στα 3'-τελικά άκρα (εικόνα 7.1, μετάγραφο τύπου B). Αντίθετα, σε αλλοιώσεις οι οποίες περιέχουν μόνο επισωματικό HPV γένωμα, το κυριότερο μετάγραφο το οποίο περιλαμβάνει E6-E7 αλληλουχίες ματίζεται διαμέσου του E1- σήματος ματίσματος στην E4-θέση δέκτη του ματίσματος και τελειώνει στην ική θέση πολυαδενυλίωσης (εικόνα 7.1, μετάγραφο που προέρχεται από επίσωμα).



Εικόνα 7.1: Στην εικόνα αυτή φαίνεται η μορφή των μεταγράφων που προέρχονται από επισωματικό και ενσωματωμένο HPV γονιδίωμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε, αρχικά, το πρωτόκολλο ενίσχυσης του E2 γονιδίου για να διαπιστώσουμε σε τι κατάσταση βρίσκεται αυτό και από τα αποτελέσματα να συμπεράνουμε σε τι μορφή βρίσκεται το γονιδίωμα του ιού (επισωματικό

ή ενσωματωμένο) στα κλινικά μας δείγματα. Στην συνέχεια για να επαληθεύσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα εφαρμόσαμε τη μέθοδο APOΤ. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων, παρατηρήσαμε ότι κάποια αποτελέσματα δεν συνέλιπταν. Ενώ, με την πρώτη μέθοδο παρατηρήσαμε ότι σε όλα τα δείγματα το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται μάλλον σε επισωματική μορφή (εικόνα 6.2), με την μέθοδο APOΤ αποδείξαμε ότι στα δείγματα 747, 796 και 868 το γονιδίωμα βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή, ενώ στα δείγματα 793 και 858 συνυπάρχουν και οι δυο μορφές (εικόνα 6.5). Η ασυμφωνία που παρατηρείται για τα δείγματα 747, 796 και 868 πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι το γονιδίωμα έχει ενσωματωθεί σε κάποια άλλη θέση, διαφορετική του E2 γονιδίου, φαινόμενο που έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι πιο πιθανές θέσεις ενσωμάτωσης μετά το E2 γονίδιο, αλλά με πολύ μικρότερο ποσοστό απ' αυτό, είναι το E4 γονίδιο και E1 γονίδιο (Arias-Pulido H. et al., 2006).

Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η μια μπορεί να θεωρηθεί συμπληρωματική της άλλης. Η μέθοδος για την ενίσχυση ολόκληρου του E2 γονιδίου ή τμημάτων του μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετήσουμε την κατάσταση του γονιδίου αυτού και στην συνέχεια η μέθοδος APOΤ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βγάλουμε καλύτερα συμπεράσματα για την μορφή που μπορεί να έχει το γονιδίωμα του ιού μέσα στα κύτταρα-ξενιστές καθώς και αν αυτό έχει ενσωματωθεί σε διαφορετική περιοχή από το E2 γονίδιο.

Η παρούσα εργασία αποτελεί το αρχικό κομμάτι μιας ερευνητικής προσπάθειας για τη καλύτερη κατανόηση της δράσης του γονιδιώματος των HPV ιών. Μια μελλοντική πρόταση είναι να αλληλουχηθούν τα PCR προϊόντα της APOΤ για να δούμε σε ποιο σημείο ακριβώς έχει ενσωματωθεί το γονιδίωμα του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων αυτής και παρόμοιων εργασιών με την κλινική εικόνα των ασθενών θα μπορούσε να μας οδηγήσει σε πολύτιμα συμπεράσματα για την ογκογόνο δράση των HPV με απώτερο στόχο τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού τρόπου αντιμετώπισής τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Antonsson A, McMillan NA, 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
2. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland, 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805-809.
3. Arias-Pulido H., Peyton C. L., Joste N. E., Vargas H. and Wheeler C. M., 2006. Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *J. Clin. Micr.* 1755-1762.
4. Artandi SE, Attardi LD, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(3):881-90. Review.
5. Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS, 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins *Virus Res.* (1-2):208-11.
6. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley P. M., 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61: 962-971.
7. Bechtold V, Beard P, Raj K., 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* (3):2021-8.
8. Boring, C. C., T. S. Squires, T. Tong, and S. Montgomery, 1994. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J. Clin.* 44:7-26.
9. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, de Sanjosé S, Moreno V, Puig-Tintore LM, Smith PG, Muñoz N, zur Hausen H., 2001. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* (3):163-75.
10. Bosch, F.X., 1995. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst;* 87:796-802.

11. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T, 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391(6667):597-601.
12. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7.
13. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7.
14. Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M., 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53: 25-36
15. Chakrabarti O, Krishna S, 2003. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci.* 28(3):337-48.
16. Charles E. Wood, Zigui Chen, J. Mark Cline, Brigitte E. Miller, and Robert D. Burk, 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol.* 81(12):6339-45.
17. Chen, G., and A. Stenlund, 2000. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol.* 74:1506-1512.
18. Choo, K. B., Pan, C. C., and S. H., 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. *Viriology.* 161: 259-261.
19. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, 2001. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer.* 84(12):1616-23.
20. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG, 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* (5):275-82.
21. Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid III, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek, 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.* 6:3745-3753.

22. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND, 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells 1: *J Virol.* (18):8940-50.
23. *Curr Opin Infect Dis.* (2):139-43. Review.
24. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akker E, 1999. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess.* 3(14):i-iv, 1-196. Review. No abstract available.
25. Danos O, Katinka M, Yaniv M, 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*;1:231–236.
26. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J, 2002. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* (19):9806-18.
27. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (39):14252-7.
28. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hausen H., 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27.
29. Demeret C, M Le Moal, M Yaniv, and F Thierry, 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.*:4777-84.
30. Doorbar J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541)
31. Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv, 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 5:1657-1671.
32. Durst, M., Kleinheinz. A., Hotz. M., and Gissman L., 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.*, 66: 1515-1522.
33. Dyson N, 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12(15):2245-62. Review.

34. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E, 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 243(4893):934-7.
35. Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK, 2006. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology*. (2):271-9.
36. Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins, 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 77:2819-2831.
37. Flores, E., B. L. Allen-Hoffman, D. Lee, and P. F. Lambert, 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622-6631.
38. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M, 2002. .Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* (19):10009-14.
39. Fraiser, L. D. *et al*, 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360.
40. Fukushima, M., Yamakawa, Y., Shimano, S., Hashimoto, M., Sawada, Y., and Fujinaga, K., 1990. The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer (Philla.)*, 66: 2155-2161.
41. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA, 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11(16):2090-100
42. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M, 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol.* 44(6):2025-31
43. Gillison, 2001. *J. National Cancer inst.*
44. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T, 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49.

45. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T, 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49.
46. Haris S. F., and M. R. Botchan, 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284:1673-1677.
47. Harley CB, Futcher AB, Greider CW, 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345(6274):458-60.
48. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler, 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505-512.
49. Heise A., 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19.
50. Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K, 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* (9):4431-9.
51. Holt SE, Wilson VG, 1995. Mutational analysis of the 18-base-pair inverted repeat element at the bovine papillomavirus origin of replication: identification of critical sequences for E1 binding and in vivo replication. *J. Virol.* (10):6525-32.
52. Howley P.M., 1996. *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.
53. Howley P.M., 1996. *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.
54. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT, 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 66(10):6237-41.
55. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* (2):775-84.
56. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, 1993. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol.* (8):4918-27.
57. Hummel, N., J. B. Hudson, and L. A. Laimins, 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070-6080.

58. Jeon, S., and Lampert, P. F., 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1654-1658,
59. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L. and Shay J. W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266:2011-2015.
60. Klaes R., Woerner S. M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., Lotz B., Melsheimer P. and Magnus von Knebel Doeberitz, 1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Research*. 59:6132-6136.
61. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK, 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 380(6569):79-82.
62. Klumpp DJ, Laimins LA, 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*. 257(1):239-46.
63. Ko LJ, Prives C, 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 10(9):1054-72. Review. No abstract available.
64. Kremsdorf D, S Jablonska, M Favre, and G Orth, 1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *J Virol*. 48(2): 340-351.
65. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB, 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(16):7491-5.
66. Laimins, L. A., 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201-223. *In* D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
67. Lechner MS, Laimins LA, 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 68(7):4262-73.

68. Lehn, H., Villa, L. L., Marziona, F., Hilgarth, M., Hillemans, H. G., and Sauer, G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J. Gen. Virol.*, 69:187-196, 1988.
69. Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D, 2004. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol.* (3):478-83.
70. Liu J.S, Kuo SR, Broker TR, Chow LT 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* (45):27283-91.
71. Liu, J. P., 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
72. Luxton J, Shepherd P, 2001. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition.
73. Mahdavi A, Monk BJ, 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
74. Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA, 2001. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol.* 13(6):477-83. Review
75. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, 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(9):7407-19.
76. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM, 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8(13):4099-105.
77. Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D, 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer *N Engl J Med.*348(6):518-27.
78. Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. Griep, and P. F. Lambert, 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol.* 77:6957-6964.
79. Ozbun MA, Meyers C, 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology.* 248(2):218-30.

80. Ozbun MA, Meyers C, 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol.* 72(4):2715-22.
81. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* 94:153-156.
82. Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault , Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault, 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 29, 26765-26772.
83. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N, 2006. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response *Proc Natl Acad Sci U S A.* (10):3822-7.
84. Pfister, H., 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 52–56.
85. Pisani, P., F. Bra, and D. M. Parkin, 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* 97:72-81.
86. Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM, 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 63(16):4862-71.
87. Robert L. Garcea and Daniel DiMaio, 2007. *The Papillomavirus.* Springer.
88. Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH, 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.* (10):6432-45.
89. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM, 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75(3):495-505.
90. Schwartz, F., Freese, U. K., Gissiman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H., 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell lines. *Nature (Lond.)* 314: 111-114.
91. Sedman J, Stenlund A., 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* (8):6893-7.

92. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R, 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 77(24):13125-35.
93. Shih-Yen Chan, H Delius, A L Halpern, and H U Bernard, 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 69(5):3074-83.
94. Singer, A., L. Ho, G. Terry, and T. S. Kwie, 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, p. 105-129. *In* A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection*. Edward Arnold, London, United Kingdom.
95. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B, 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42(7):3176-84.
96. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B, 2004. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 74(1):107-16.
97. Steger, G., and S. Corbach, 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 71:50-58.
98. Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance, 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67:4521-4532.
99. Stubenrauch, F., H. B. Lim, and L. A. Laimins, 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of the oncogenic human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 72:1071-1077.
100. Tan SH, Baker CC, Stükel W, Bernard HU 2002. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology.* 305(2):486-501.
101. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV.

102. Thorner LK, Lim DA, Botchan MR 1993. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J. Virol.* (10):6000-14.
103. Titolo S., E. Welchner, P. W. White, and J. Archambault, 2003. Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy. *J. Virol.* (9): 5512–5518.
104. Ustav M, Stenlund A 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames *EMBO J.*(2):449-57.
105. Vogelstein B., 1990. Cancer. A deadly inheritance; *Nature (London)* 348:681-682.
106. Von Knebel Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsch, D., and zur Hausen, H., 1991. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1411-1415.
107. Von Knebel Doeberitz, M., Rittmuler, C., Aengeneyndt, F., Jansen-Durr, P., and Spitkovsky, D., 1994. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRb interactions. *J. Virol.*, 68: 2811-2821.
108. Weimin Qu, Gang Jiang, Yvette Cruz, Chee Jen Chang, Gloria Y. F. Ho, Roberts S. Klein, and Robert D. Burk. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems.
109. Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.
110. Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA, 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* (11):6732-40.
111. Yang, Francisco Martinez Murillo, Hengmi Cui, Richard Blosser, Satoshi Uematsu, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Raphael P. Viscidi, and Richard B. S. Roden, 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.* Oct;78(20):11152-60.

112. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW, 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):668-73.
113. Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
114. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ, 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* 73(8):6209-19.
115. zur Hausen H., 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 92(9):690-8. Review.
116. Zur Hausen, H, 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.
117. Zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.*1288(2):F55-78.

