

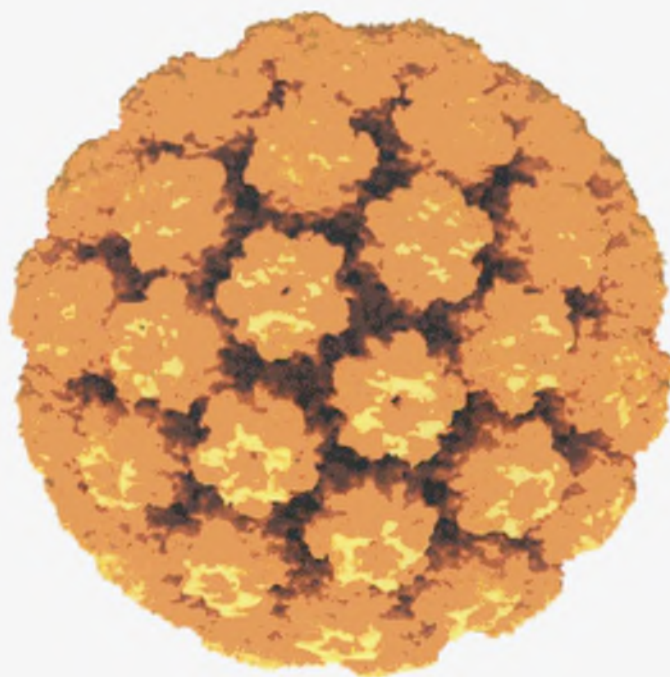
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ.648
Ημερομηνία16-9-09

**Φυλογενετική ανάλυση των Ε6 και Ε7 γενωμικών περιοχών των ιών
HPV 16**



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΚΟΝΤΟΣΤΑΘΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7664/1
Ημερ. Εισ.: 05-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΟΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087175

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πειραματική και εργαστηριακή διαδικασία της πτυχιακής εργασίας με τίτλο <<Φυλογενετική ανάλυση των Ε6 και Ε7 γενωμικών περιοχών των ιών HPV 16>> πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας – Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο Οκτώβριος 2008 - Ιούνιος 2009 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Π. Μαρκουλάτου.

Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής : Π. Μαρκουλάτος

Z. Μαμούρης

K. Ματθιόπουλος

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας : 17-9-2009



Στους γονείς μου, Δημήτρη και Κυριακή.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και για την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτόν τον εξαιρετικά ενδιαφέροντα τομέα της ιολογίας που συνδέεται με την ογκογένεση. Επίσης τον ευχαριστώ για τη συνεχή βοήθεια και επίβλεψή του ως προς την διεξαγωγή της πτυχιακής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές μου κ. Ζήση Μαμούρη και κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλου καθώς δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη, καθώς και για τις γνώσεις που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Βίκυ Πλιάκα και Δημήτρη Τσακογιάννη για την βοήθεια τους στο χώρο του εργαστηρίου και την φιλική ατμόσφαιρα που αναπτύχτηκε. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δημήτρη Τσακογιάννη για την συνεχή βοήθεια του ως προς το θέμα μου καθώς και για τις συμβουλές του στο αντικείμενο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Η Βιολογία των Human Papilloma viruses (HPV)	8
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	8
1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses	10
1.2.1 Alpha-papillomavirus.....	12
1.2.2 Beta-papillomavirus	13
1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus	14
2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)	15
2.1 Δομή καψιδίου.....	15
2.2 Οργάνωση του γενώματος.....	17
2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1	18
2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2	19
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4	20
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5	21
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6	22
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7	25
3. Ο κύκλος ζωής των HPV	30
3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο	30
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος	31
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος	32
3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	33
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	34
4. Κλινικές Εκδηλώσεις	36
4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.....	36
5. Υλικά και μέθοδοι.....	38
5.1 Κλινικά δείγματα.....	38
5.2 Προετοιμασία DNA.....	38
5.3 Εκκινητικά μόρια PCR.....	40
5.4 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.....	41
5.5 PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934	42
5.6 Autonested PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934	43
5.7 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing) .	43
5.8 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Προγράμματα βιοπληροφορικής...	44
5.9 PCR με εκκινητικά μόρια 41-757.....	44
5.10 Autonested PCR με εκκινητικά μόρια 41-757.....	45

5.11	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Autonested PCR	46
5.12	Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR	46
5.13	Καθαρισμός προϊόντων της Autonested GoTaq Flexi PCR	47
5.14	Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων της Autonested GoTaq PCR.....	47
6.	Αποτελέσματα	51
6.1	Αποτελέσματα Autonested PCR με εκκινητές 41-757	51
6.2	Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR	52
6.3	RFLP με EcoRI	54
6.4	Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	55
6.5	Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των κλινικών δειγμάτων	66
7.	Συζήτηση	69
8.	Βιβλιογραφία.....	72

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (papillomaviruses) ανήκουν στην οικογένεια των papillomaviridae και έχουν μέγεθος περίπου 7900 bp. Το πρώτο ζώο με PV ανακαλύφθηκε το 1930 από τον Richard Shope σε άγριο κουνέλι. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα και προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και του βλενογόνου στον άνθρωπο, σε άλλα θηλαστικά και πτηνά. Έτσι μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις που εν δυνάμει εξελίσσονται σε κακοήθειες.

Υπάρχουν περίπου 200 τύποι HPV από τους οποίους οι 40 προσβάλλουν τη γεννητική οδό. Ένας σημαντικός αριθμός HPV στελεχών που προσβάλλει το επιθήλιο του βλεννογόνου βρίσκονται συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και είναι γνωστοί ως HPV υψηλής επικινδυνότητας (high risk), ενώ στελέχη τα οποία προκαλούν απλά θηλώματα είναι γνωστά ως χαμηλής επικινδυνότητας (low risk). Καρκίνος από HPV είναι δυνατόν να παρουσιαστεί και σε άλλα μέρη του σώματος όπως τη στοματοφαρυγγική οδό, το λαιμό και τον πρωκτό. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος HPV που ευθύνεται για πάνω από το 50% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι ο HPV16.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη των ογκογονιδίων E6 και E7 των στελεχών HPV-16 για την ανίχνευση μεταλλάξεων από κλινικά δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος Low και High grade. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση των γενετικών τόπων E6 και E7 ενώ τα προϊόντα ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των HPV-16 variants. Στην συνέχεια ακολούθησε αλληλούχηση των κλώνων και με την βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής εξετάστηκαν οι περιοχές E6, E7 για την ύπαρξη μεταλλάξεων κρίσιμες για την ανάπτυξη αλλοιώσεων. Οι μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν συσχετίστηκαν με τον βαθμό της αλλοίωσης (High και Low grade) των κλινικών δειγμάτων. Τέλος κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα βάσει των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών E6, E7 και ταυτοποιήθηκαν τα HPV-16 variants σε κάθε δείγμα που εξετάστηκε.

1. Η Βιολογία των Human Papilloma viruses (HPV)

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 (Zur Hausen 1996). Οι papillomaviruses (PVs) αποτελούν μια ομάδα ιών χωρίς περίβλημα οι οποίοι προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και το επιθήλιο του βλεννογόνου προκαλώντας μια σειρά αλλοιώσεων (καλοήθειες αλλοιώσεις του δέρματος και κονδυλώματα). Μερικοί PVs έχουν συνδεθεί επίσης με την ανάπτυξη επιθηλιακών κακοηθειών ειδικά με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και άλλους όγκους της ουρογεννητικής οδού). Η αναγνώριση και η μελέτη αυτών των PVs είναι σημαντικές και για την δημιουργία εμβολίων εναντίων τους (Howley PM 2007).

Ενώ οι αλλοιώσεις του δέρματος (warts) ήταν γνωστοί στους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, μόνο το 19^ο αιώνα αναγνωρίστηκε ότι είχαν ιική προέλευση και διαχωρίστηκαν από τη σύφιλη και τη γονόρροια. Η ιική φύση των αλλοιώσεων του δέρματος που προκαλούνται από τους PVs αποκαλύφθηκε στις αρχές του 1900 όταν διηθήματα από κακοήθειες αποδείχτηκε ότι μεταδίδουν την ασθένεια (Giuffo G et al). Οι PVs έπειτα αναγνωρίστηκαν σε μια ποικιλία σπλονδυλωτών ζώων εκτός από τους ανθρώπους (Lancaster WD 1982, Sundberg JP 1987).

Το πρώτο ζώο με PV αναγνωρίστηκε το 1930 από τον Richard Shope, ο οποίος χαρακτήρισε την μεταδιδόμενη φύση των δερματικών papillomas να προκύπτει σε άγρια κουνέλια (Shope RE 1933). Έτσι ο papillomavirus του Shope, ο οποίος είναι ο cottontail rabbit papillomavirus (CRPV), ήταν ο πρώτος ογκογενετικός DNA ιός που αναγνωρίστηκε. Σημαντικές μελέτες το 1950 και το 1960 έδειξαν ότι η ιική αντιγραφή συνδεόταν άμεσα με την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων τα οποία μόλυνε ο ιός καθώς και με την ιική φύση των καψιδίων των papillomaviruses (Lowy DR 2007, Roden RB 2004). Το 1970 οι επιστήμονες καταφέρνουν να κλωνοποιήσουν το γένωμα του papillomavirus και έτσι αποκαλύφθηκαν οι βιοχημικές ιδιότητες του ιού. Στην συνέχεια η αλληλούχηση και η αντίστροφη γενετική βοήθησαν στην αναγνώριση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) των ιικών γονιδίων και στον καθορισμό της λειτουργίας τους αντίστοιχα (Danos O et al 1982,1983, Chen EY et al 1983).

Εφόσον κάθε papillomavirus είναι ειδικός για τα είδη τα οποία προσβάλλει, υπάρχουν εκατοντάδες τύποι αυτών των ιών (Antonsson A et al 2003). Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην αλληλούχηση των διάφορων τύπων HPV εξαιτίας της στενής σχέσης τους με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Υπάρχουν 96 πλήρως αλληλουχημένοι τύποι HPV μέχρι το 2004 και επιπλέον 100 μερικώς αλληλουχημένοι HPV τύποι (de Villiers EM et al 2004). Ένας από τους πιο σημαντικούς HPV-σχετιζόμενους καρκίνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου είναι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, ο οποίος το 2007 ήταν ο 2^{ος} πιο κοινός καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις του καρκίνου του τραχήλου αποδίδονται στον HPV. Άλλοι τύποι καρκίνου που προκαλούνται από HPV είναι αυτοί του πρωκτού, του κόλπου και του πέους. Επιπρόσθετα υπάρχουν και καρκίνοι της μη γενετικής οδού όπως επίσης στοματικοί και λарυγγικοί καρκίνοι. (Hoory et al 2008, Fakhry C et al 2006, Hernandez BY et al 2005, Partridge JM et al 2007).

*Οι περισσότερες δυσπλασίες θεραπεύονται αυθόρμητα. Μάλιστα η πιθανότητα εξομάλυνσης είναι υψηλή όταν η δυσπλασία είναι χαμηλής σοβαρότητας ενώ η πιθανότητα εξομάλυνσης μειώνεται όταν η δυσπλασία είναι υψηλής σοβαρότητας (Howley PM et al 2007).

Από τους 200 τύπους HPV, οι 40 προσβάλλουν τη γεννητική οδό. Ένα σύνολο αυτών των τύπων βρίσκεται συνεχώς στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε υψηλότερη αναλογία από ότι σε δείγματα μάρτυρες. Αυτοί οι τύποι χαρακτηρίζονται ως «υψηλής επικινδυνότητας» (high risk). Άλλοι τύποι HPV που έχουν ίδια ποσοστά σε όγκους και σε μάρτυρες χαρακτηρίζονται ως χαμηλής επικινδυνότητας» (low risk). Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), ανήκουν τα μέλη που μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Σε μια παγκόσμια μελέτη περίπου 1000 δειγμάτων τραχήλου της μήτρας πάνω από το 90% των δειγμάτων περιείχαν HPV (Bosch FX et al 1995). Τέσσερις τύποι HPV (16,18,31,45) εκ των 20 τύπων που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι προκαλούν το 80% των HPV-θετικών καρκίνων. Ο επικρατέστερος τύπος ήταν ο HPV 16 ενώ οι τύποι χαμηλής επικινδυνότητας 6 και 11 βρέθηκαν σε 3 μόνο όγκους. (Hoory et al, 2008).

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

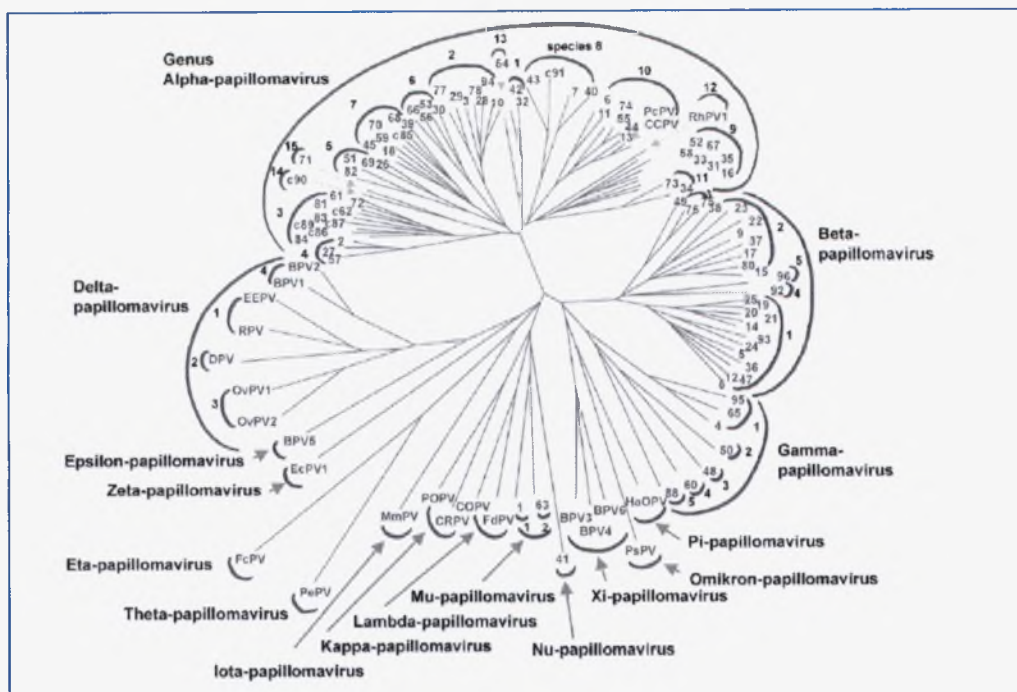
Πίνακας 1.1: Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV

Ο HPV16 ιός διακρίνεται σε variants τα οποία περιγράφονται σε φυλογενετικά κλαδιά, η κατανομή των οποίων ποικίλει γεωγραφικά. Το πρωτότυπο είναι ένα Γερμανικό στέλεχος και μέλος του Ευρωπαϊκού –European (E) κλαδιού (Seedorf et al 1985). Τα υπόλοιπα κλαδιά των variants που έχουν περιγραφεί είναι το Ασιατικό – (As), κυρίως στην Νότιο – Ανατολική Ασία, το Ασιατικό – Αμερικάνικο (AA), κυρίως στην Κεντρική και Νότια Αμερική, το Αφρικανικό 1 (AF1) και το Αφρικανικό 2 (AF2), κυρίως στην Αφρική, το Βόρειο – Αμερικάνικο (NA1) στην Αμερική (Ho et al., 1991) και ένα πρόσφατα χαρακτηρισμένο στέλεχος Javanese variant (Java) από την Ινδονησία (de Boer et al., 2004). Τα Ευρωπαϊκά variants βρίσκονται σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές εκτός από την Αφρική. Τα E και As variant φαίνεται ότι είναι υποκατηγορίες της γενιάς E (Yamada et al., 1997), (Yuping Wu et al 2006).

1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses

Οι papillomaviruses και οι polyomaviruses (SV40, BKV, polyoma) ταξινομήθηκαν μορφολογικά ως μέλη της οικογένειας των papovaviridae αφού έχουν κοινή εικοσαεδρική καψιδιακή δομή στην οποία ένα δίκλωνο DNA συνδέεται με ιστόνες. Ωστόσο η κύρια διαφορά είναι ότι στους papillomaviruses τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης βρίσκονται μόνο στην μία αλυσίδα του DNA σε σχέση με τους polyomaviruses (Danos O et al 1989). Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα καψίδια των papillomaviruses είναι μεγαλύτερα από αυτά των polyomaviruses (Hoory et al 2008). Ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών (ICTV), απέδειξαν νέες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ιών HPV σύμφωνα με μια καινούρια κατηγοριοποίηση με βάση λίστες γνωστές ως «PV types». Έτσι, οι PVs αποτελούν μια ταξινομική οικογένεια από μόνοι τους, τους Papillomaviridae, οι οποίοι δεν έχουν καμία σχέση με τους polyomaviruses. Αυτή η διαπίστωση

βασίστηκε στο γεγονός ότι οι παραπάνω ομάδες ιών διαφέρουν ως προς το μέγεθος του γονιδιώματός τους καθώς και την νουκλεοτιδική και αμινοξική τους αλληλουχία (de villiers E.M et al 2004). Η ταξινόμηση των papillomaviruses γίνεται βάση variants, υποτύπων, τύπων, ομάδων και υπερομάδων που ανταποκρίνονται στα φαινοτυπικά επίπεδα ποικιλομορφίας (Shih-Yen Chan et al 1995). Οι papillomaviruses κατηγοριοποιούνται σε 12 γένη, που ονομάζονται βάση των 12 πρώτων γραμμάτων της ελληνικής αλφαβήτου. Η ταξινόμηση γίνεται βάση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της L1 καψιδιακής πρωτεΐνης και όλα τα μέλη ενός γένους έχουν 60% ομοιότητα στο L1 DNA τους. Από τα 12 γένη τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus είναι PVs ανθρώπου ενώ τα υπόλοιπα 7 γένη είναι papillomaviruses ζώων (Hoory et al 2008). Η περαιτέρω κατηγοριοποίηση εντός του γένους οφείλεται στο γεγονός ότι τα μέλη αν και έχουν διαφορετικές γενωμικές αλληλουχίες, διαθέτουν όμοιες ή παρόμοιες βιολογικές ή παθολογικές ιδιότητες. Έτσι ανάμεσα στο γένος μπορεί να υπάρχουν τύποι, υπότυποι και variants σύμφωνα με το ποσοστό ομοιότητάς της καψιδιακής τους πρωτεΐνης L1. Εάν η αλληλουχία L1 διαφέρει τουλάχιστον 10% έχουμε διαχωρισμό σε τύπο, αν διαφέρει από 2-10% σε υπότυπο και αν διαφέρει 2% σε στέλεχος (de villiers E.M et al 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papillomaviruses που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lambda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 1.4 περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (κυρίως πρωτευόντων του Παλιού Κόσμου και ζώων της Αυστραλίας) (Charles E. et al., 2007, Antonson A. et al., 2006).



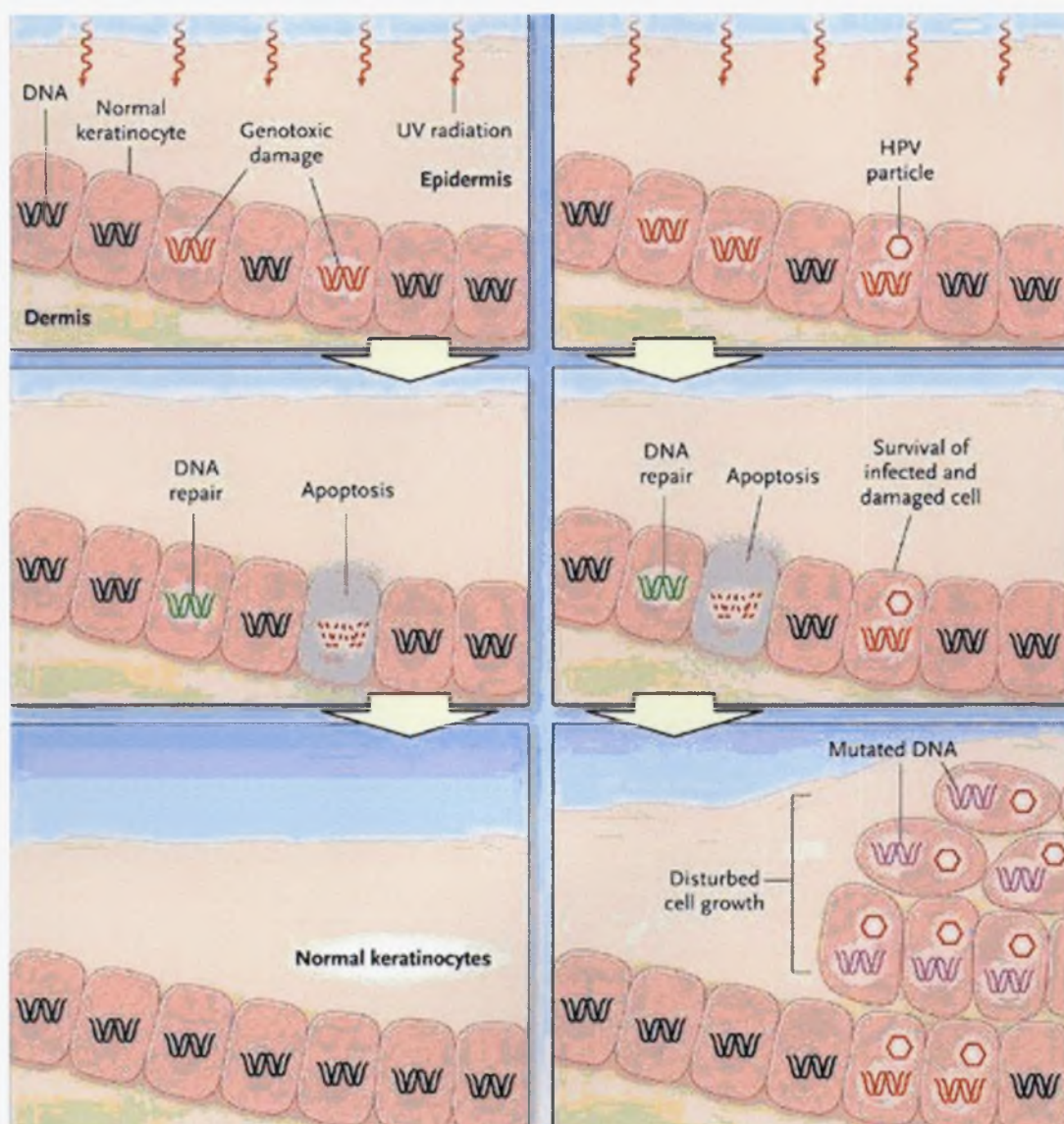
Εικόνα 1.1: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers E. M. et al., 2004).

1.2.1 Alpha-papillomavirus

Η μεγαλύτερη ομάδα των HPV ιών είναι οι Alpha papillomaviruses και σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται εκείνοι που προσβάλλουν τόσο το επιθήλιο του δέρματος όσο και το επιθήλιο του βλενογόνου. Οι Alpha papillomaviruses περιλαμβάνουν επίσης δερματικούς ιούς όπως ο HPV2, οι οποίοι προκαλούν κοινές μυρμηγκιές και σπάνια συσχετίζονται με καρκίνο. Περισσότεροι από 30 διαφορετικούς τύπους HPV μολύνουν το επιθήλιο του τραχήλου και μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο. Αυτοί οι HPV ιοί που σχετίζονται με τον καρκίνο κατηγοριοποιούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (high risk). Σε αυτή την κατηγορία ο πιο επικρατής τύπος είναι ο HPV16 και ευθύνεται για περίπου το 50% όλων των καρκίνων του τραχήλου. Οι υπόλοιποι τύποι των Alpha-papillomaviruses κατηγοριοποιούνται ως ενδιάμεσου ή χαμηλού τύπου επικινδυνότητας ανάλογα με την συχνότητα που προκαλούν καρκινικές αλλοιώσεις. Οι χαμηλής επικινδυνότητας HPV τύποι, όπως ο HPV11, σχετίζονται σπάνια με τον καρκίνο του τραχήλου. Ωστόσο μπορούν να προκαλέσουν θηλώματα του γεννητικού συστήματος τα οποία είναι ένα σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα που αφορά το 1-2% των νεαρών ενηλίκων (Doorbar J. et al., 2006).

1.2.2 Beta-papillomavirus

Οι Beta papillomaviruses τυπικά προσβάλλουν το δέρμα χωρίς όμως να προκαλούν αλλοιώσεις. Ωστόσο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς αλλά και σε άτομα που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis), μπορεί να προκληθεί μη μελανωματικός καρκίνος του δέρματος (Pfister 2003). Σε αυτή την περίπτωση δρουν συνεργητικά με την ασθένεια EV περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως UV ακτινοβολία και η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς (Hoory et al 2008).



Εικόνα 1.2: η συμβολή των betaPVs στην καρκινογένεση του δέρματος. Τα κερατινοκύτταρα του δέρματος αντιμετωπίζουν την UV ακτινοβολία. Αριστερά τα κύτταρα επιδιορθώνουν την βλάβη ή υφίστανται απόπτωση εφόσον η βλάβη είναι σοβαρή. Δεξιά κερατινοκύτταρα που είναι μολυσμένα με betaPVs η επιδιόρθωση και η απόπτωση εμποδίζονται και έτσι προκαλούνται γενωμικά ασταθή κύτταρα που κινδυνεύουν από μετασχηματισμό (Bouwes Bavinck JN et al,2004), (Mariet C.W. Feltkamp,2008)

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 paillomavirus (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

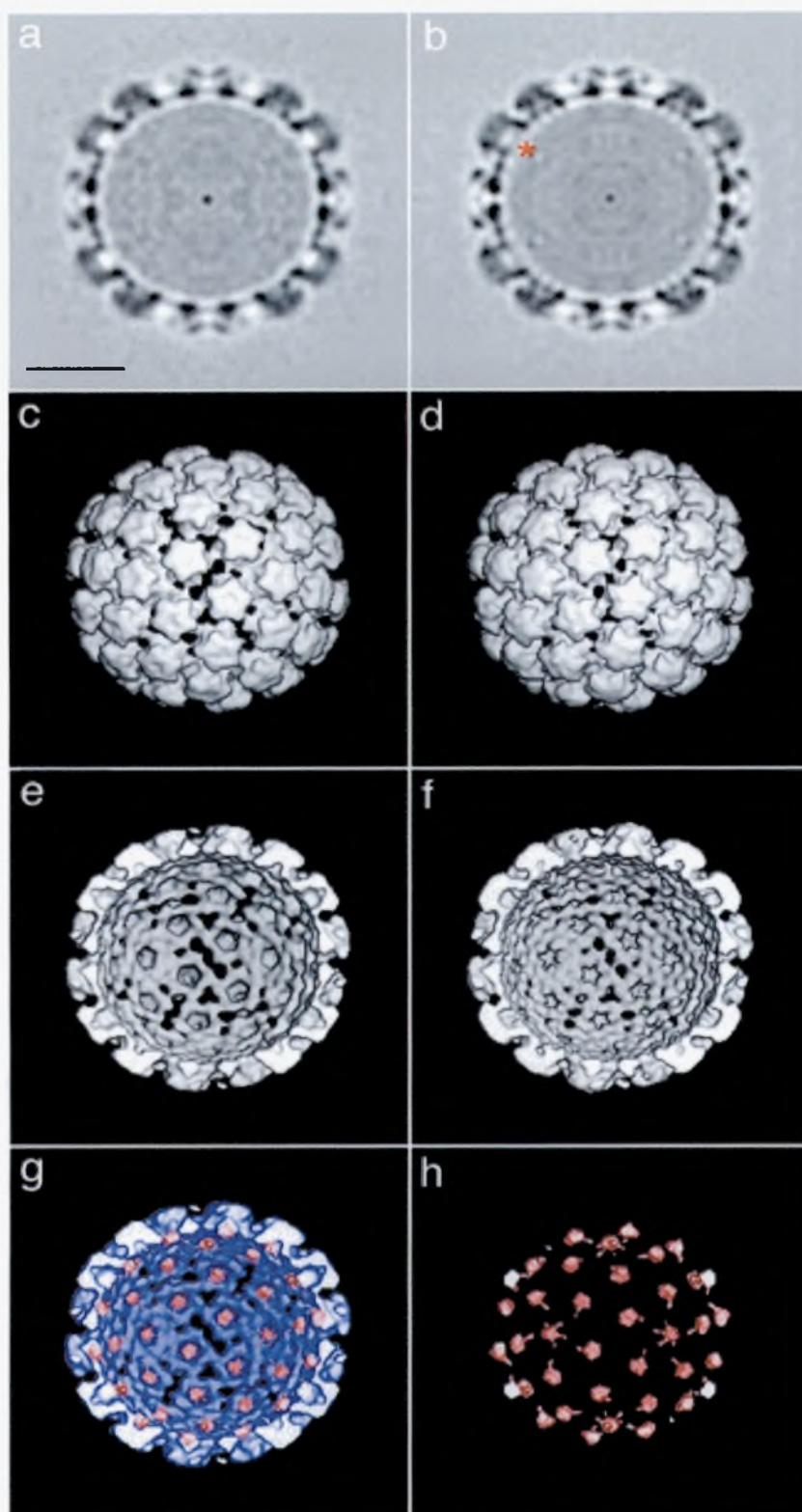
Πίνακας 1.2: Σύντομη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)

2.1 Δομή καψιδίου

Τα ιικά σωματίδια των ιικών καψιδίων είναι εικοσαεδρικές δομές 50-60 nm χωρίς φάκελο που αποτελούνται από συντηρημένες κύριες καψιδιακές L1 πρωτεΐνες και λιγότερο συντηρημένες δευτερεύουσες καψιδιακές L2 πρωτεΐνες. Τα ιικά σωματίδια των HPV1-BPV1 (bovine papillomavirus) έχουν παρόμοια δευτεροταγή δομή με 72 πενταμερικά καψομερή, σχηματίζοντας ένα ιικό κοχύλι με συμμετρία $T=7$ (Kirnbauer et al). Η L1 αποτελεί το 90-95% του ιικού καψιδίου ενώ η L2 το υπόλοιπο 90-95% του ιικού καψιδίου (Suzich et al 1995). Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη, δημιουργεί άδεια καψίδια που ορίζονται ως VLPs (virus-like particles) που είναι μορφολογικά και ανοσολογικά πολύ όμοια με τα ιικά σωματίδια αλλά τους λείπει το ιικό γένωμα.

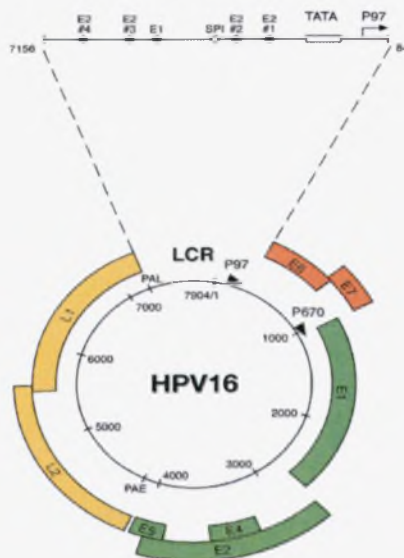
* Εμβολιασμός με L1 VLPs προστατεύει από τη μόλυνση από papillomavirus (Yang R et al 2004). Το καψίδιο του HPV αποτελείται από 360 αντίγραφα της L1, τα οποία οργανώνονται ως 72 πενταμερή σε μια εικοσαεδρική δομή με $T=7$. Οι αλληλεπιδράσεις των L1/L2 είναι κυρίως υδροφοβικές. Τα καψίδια των Papillomavirus έχουν μέγεθος περίπου 600 Å. Κάθε καψομερίδιο περιέχει 5 μονομερή της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης L1 των 55-kDa. Το καψίδιο περιέχει επίσης 12 αντίγραφα της δευτερεύουσας καψιδιακής πρωτεΐνης των 74-kDa, L2, η οποία είναι πιθανά συνδεδεμένη με 12 πενταμερή του καψομερούς. Υπάρχει μια περιοχή των 44 αμινοξέων κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της L2 που αλληλεπιδρά ειδικά με την L1, με την υπολογιζόμενη στοιχειομετρία ενός μορίου L2 για κάθε 5 L1 μόρια. Η δέσμευση της L1 σε αυτή την περιοχή διευκολύνεται μέσω ισχυρών υδροφοβικών δεσμών που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα της L2, 413 έως 419.



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση 3DR μέσω υπολογιστή μόνο των L1 καψιδίων (a, c, και e) και L1+L2 καψιδίων (b, d, and f). Εικόνες α-β: εσωτερικές δομές του καψομεριδίου. Ο κόκκινος αστερίσκος υποδηλώνει μια περιοχή αντίστοιχης πυκνότητας στα L1 και L2 καψίδια. Εικόνες c-d:εξωτερικές όψεις κάθε τύπου καψιδίου. Εικόνες e-f:εσωτερικές όψεις μόνο της L1 ή του L1+L2 καψιδίου. Η πυκνότητα του DNA και των ιστονών έχουν αφαιρεθεί υπολογιστικά από τις εσωτερικές δομές. Εικόνα g: πυκνότητα της L1 (μπλε χρώμα) μαζί με L2(κόκκινο χρώμα). Εικόνα h: πυκνότητα μόνο της L2 (κόκκινο χρώμα) (B.Buck et al 2008).

2.2 Οργάνωση του γενώματος

Το γονιδίωμα των HPV ιών είναι δίκλωνο, κυκλικό, μεγέθους περίπου 8 kb. Στα ιικά σωματίδια είναι συνδεδεμένο με τις κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια δομή παρόμοια με αυτή της χρωματίνης (Howley P.M 1996). Τα ιικά γενώματα έχουν 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται από μια μόνο αλυσίδα DNA. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης διακρίνονται σε πρώιμες E (Early) και καθυστερημένες L (Late) περιοχές καθώς και την ρυθμιστική περιοχή LCR (ή URR). Οι πρωτεΐνες E1-E2 και E4-E5-E6-E7 περιέχουν την πληροφορία για τον διπλασιασμό του ιού καθώς και για τον καρκινικό μετασχηματισμό του κυττάρου (Danos O et al 1982). Οι περιοχές L1-L2 κωδικοποιούν για τα δομικά πολυπεπτίδια του καψιδίου του ιού. Οι 3 περιοχές σε όλους του papillomaviruses (E, L, LCR,) διαχωρίζονται από 2 περιοχές πολυαδενυλίωσης (pA): πρώιμες (early) pA (AE) και όψιμες (late) pA (AL) περιοχές. (Zheng, Baker, 2006). Στους ιούς HPV υψηλής επικινδυνότητας τα μετάγραφα προκύπτουν από 2 βασικούς υποκινητές. Ο 1ος βρίσκεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της E6 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (είναι ο p97 στους HPV-16 και 31 ενώ ονομάζεται p105 στους HPV-18) (Smotkin et al 1986). Ο 2ος υποκινητής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων, στον HPV-31 ονομάζεται p742 (Hummel N. et al., 1992). Στον HPV-16 ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K et al 1996). Η περιοχή LCR έχει μέγεθος περίπου 850b και βρίσκεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της E6. Σε αυτή την περιοχή συνδέονται μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν τον πρώιμο υποκινητή. Η LCR δεν έχει κωδική λειτουργία και αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής. Επίσης φέρει σημαντικές θέσεις δέσμευσης για τη ρύθμιση της RNA πολυμεράσης 2, η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφής τόσο από τους πρώιμους όσο και από τους όψιμους προαγωγείς (Zheng, Baker, 2006).



Εικόνα 2.2: Το γένωμα του HPV16 (7904 bp) απεικονίζεται ως μαύρος κύκλος. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τον πρώιμο (p97) και τον όψιμο (p670) υποκινητή. Τα 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF), [E1, E2, E4 και E5 (πράσινο), E6 και E7 (κόκκινο)] εκφράζονται είτε από τον p97 ή τον p670 σε διαφορετικά στάδια κατά την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων. Τα όψιμα ORF [L1 και L2 (κίτρινο)] επίσης εκφράζονται από τον p670, ακολουθώντας μια αλλαγή στο σχέδιο ματίσματος και έναν ελιγμό από την πρώιμη θέση πολυαδενυλίωσης (PAE) στην όψιμη θέση πολυαδενυλίωσης (PAL). Όλα τα ιικά γονίδια κωδικοποιούνται από τη μια αλυσίδα του δίκλωνου κυκλικού DNA του γενώματος. Η περιοχή LCR (από 7156–7184) μεγιστοποιήθηκε και δείχνει τις περιοχές δέσμησης της E2 καθώς και στο στοιχείο TATA element του υποκινητή p97. Φαίνονται και οι περιοχές δέσμησης των E1 και SP1 (Doorbar,2007).

2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η E1 πρωτεΐνη διαθέτει το πιο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ανάμεσα στους ιούς papilloma. Το μέγεθός της είναι περίπου 68 kDa και έχει χαμηλή έκφραση στα θετικά από HPV κύτταρα. Η E1 πρωτεΐνη διαθέτει 2 χαρακτηριστικές ιδιότητες 1) ΑΤΡάσης και 2) 3' - 5' ελικάσης (Hughes et al 1993, Seo et al 1993, Yang et al 1993). Έτσι η λειτουργία της E1 πρωτεΐνης είναι διττή: 1ον) Ως ΑΤΡάση αναγνωρίζει πλούσιες σε ΑΤ περιοχές της θέσης έναρξης της αντιγραφής (Frattini et al 1994, Muller et al,1997) και 2ον) Χρησιμοποιεί τη δραστηριότητα της 3' - 5' ελικάσης για να ξεδιπλώσει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρήσει η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et al., 1995). Η E1 αποτελείται από μια N-τελική περιοχή, μια ενδιάμεση περιοχή και μια C-τελική περιοχή, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ΑΤΡάσες και ελικάσες. Η ενδιάμεση περιοχή μπορεί να δεσμεύει το DNA (Van G et al 2002).

Η E1 προσδένεται αδύναμα στην θέση έναρξης της αντιγραφής όμως αυτή η πρόσδεση ισχυροποιείται όταν σχηματίζει σύμπλοκο με την E2 (Frattini et al 1994, Dixon et al 2000, Lu et al 1993, Sun et al 1996). Οι θέσεις πρόσδεσης της E2

γεινιάζουν με τις θέσεις αναγνώρισης της E1. Ως εκ τούτου η E2 βοηθάει στην προσέγγιση της θέσης έναρξης της αντιγραφής από την E1. Η E1 πρωτεΐνη δημιουργεί εξαμερείς δακτυλίους τους οποίους διαπερνά το DNA και κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το DNA ξεδιπλώνεται (Sedman et al 1998, Liu et al 1998). Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης γίνεται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών (chaperone proteins). Η περιοχή δέσμευσης DNA της E1 είναι χαρακτηριστική και αποτελείται από μια εκτεταμένη θηλιά και μια α -έλικα (Enemark et al 2000). Ακόμα η δραστηριότητα της E1 ρυθμίζεται και από την αλληλεπίδρασή της με τις κυκλίνες A και E. Παράλληλα 4 περιοχές φωσφορυλίωσης των κυκλικών κινασών (cdks) βρίσκονται στην E1 και πιθανή μετάλλαξη τους μειώνει την αντιγραφική ικανότητα της E1 (Ma et al 1999), (Michelle S et al 2004).

2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2, μεγέθους περίπου 50 kDa, δημιουργεί διμερή και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού DNA και την μεταγραφική ρύθμιση (Laimins et al 1998). Οι λειτουργικές περιοχές C και N έχουν κρυσταλλοποιηθεί με την C περιοχή να κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης του DNA και να σχηματίζει διμερή δομή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA (Hegde et al, 1992). Η N περιοχή σχηματίζει μια α έλικα η οποία είναι πλούσια σε γλουταμίνες ανάμεσα σε ένα πλαίσιο β -sheet (Antson et al 2000, Harris et al 1999). Τα διμερή της E2 προσδένονται σε παλινδρομικές αλληλουχίες (ACCN6GGT) που ονομάζονται E2BSs (Laimins et al 1998). Υπάρχουν 4 από αυτές τις αλληλουχίες εντός της περιοχής LCR (Howley et al, 1996), μία εκ των οποίων βρίσκεται γειτονικά της ιϊκής περιοχής της αντιγραφής. Η δέσμευση της E2 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση της E1 ελικάσης στην ιική περιοχή, η οποία δεσμεύει στην συνέχεια κυτταρικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA, συμπεριλαμβανομένου της RPA (replication protein A) και την πριμάση της DNA πολυμεράσης α (Loo et al 2004, Masterson et al 1998, Conger et al 1999, Han et al 1999). Κατά τη μόλυνση στο στάδιο της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στις περιοχές E2BSs (Steger et al, 1997). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις E2, προάγεται η έκφραση των πρώιμων γονιδίων ενώ σε υψηλές οι μεταγραφικοί παράγοντες TFIID και Sp1 εκτοπίζονται από τις E2BSs έτσι ώστε η E2 να δρα ως καταστολέας και να εμποδίζει την μετάφραση των πρώιμων γονιδίων (Demeret et al 1997, Dostatni et al 1991). Συγκεκριμένα, η E2 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και μπορεί να ρυθμίσει τον

ικό πρώιμο υποκινητή (p97 στον HPV16) και ελέγχει την έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ σε υψηλά επίπεδα η E2 καταστέλλει την έκφραση των ογκογονιδίων εκτοπίζοντας τον μεταγραφικό ενεργοποιητή SP1 από μια γειτονική περιοχή στον πρώιμο υποκινητή (Doorbar et al 2006).

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 του ιού HPV εκφράζεται κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης ζωής του ιού ως το τρίτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης σε πολυκιστρονικά μετάγραφα (Remm et al 1999). Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται από ματισμένα μετάγραφα τα οποία περιλαμβάνουν τα 5 πρώτα αμινοξέα της E1 έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι ενωμένες οι πρωτεΐνες E1^{E4}, κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 δεν διαθέτει το κωδικόνιο έναρξης AUG και χρησιμοποιεί την E1 για να ξεκινήσει τη μετάφραση (Howley P,M 1996). Η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και την C-τελική περιοχή (Roberts et al., 1994). Στα στελέχη υψηλής επικινδυνότητας ιών HPV, η έκφραση της E1^{E4} μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση του δικτύου των κερατινοκυττάρων στα κύτταρα, υποδεικνύοντας το ρόλο της E1^{E4} στην έξοδο των ιικών σωματιδίων (Doorbar et al 1991). 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.

Επιπλέον η E4 πρωτεΐνη εμπλέκεται και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθώς αλληλεπιδρά με την E4 –DBD, μια RNA ελικάση που εμπλέκεται στο μάτισμα του mRNA, στη μεταφορά καθώς και στην έναρξη της μετάφρασης (Yoshiooka et al 2000). Ακόμη στους HPV 16 και 11 η E1^{E4} σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2, αντισταθμίζοντας την επίδραση της E7, η οποία ωθεί τα κύτταρα στην φάση S (Chang et al 2000, Flores et al 2000). Συγκεκριμένα η E4 του HPV-16 μπορεί να εμποδίσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καθώς αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B/Cdk και κυκλίνη A/Cdk κατά τη φάση G2 και αυτό οδηγεί στην παύση του

κυτταρικού κύκλου στο όριο G2/M απομονώνοντας αυτές τις πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα (C.E. Davy et al 2005, 2006).

2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 του ιού HPV εκφράζεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης ζωής του ιού ως το τέταρτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης σε πολυκιστρονικά μετάγραφα (Remm et al 1999). Η E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη χωρίς πλήρως καθορισμένη λειτουργία. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στα συστήματα Golgi και περιστασιακά σε κυτταρικές μεμβράνες (Conrad et al 1993). Στους βόειους papilloma ιούς (BPVs), εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό των κυττάρων και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et al 1986).

Η μικρή ομολογία της E5 του HPV με την αντίστοιχη περιοχή του BPV, υποδεικνύει ένα διαφορετικό τρόπο δράσης για την E5 του HPV, η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα EGF. Έτσι, η υπερέκφραση της E5 του HPV, επάγει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα EGF, αποτρέποντας την αποδόμησή του (Conrad et al 1993, Rodriguez et al 2004, Straight et al 1993/1995).

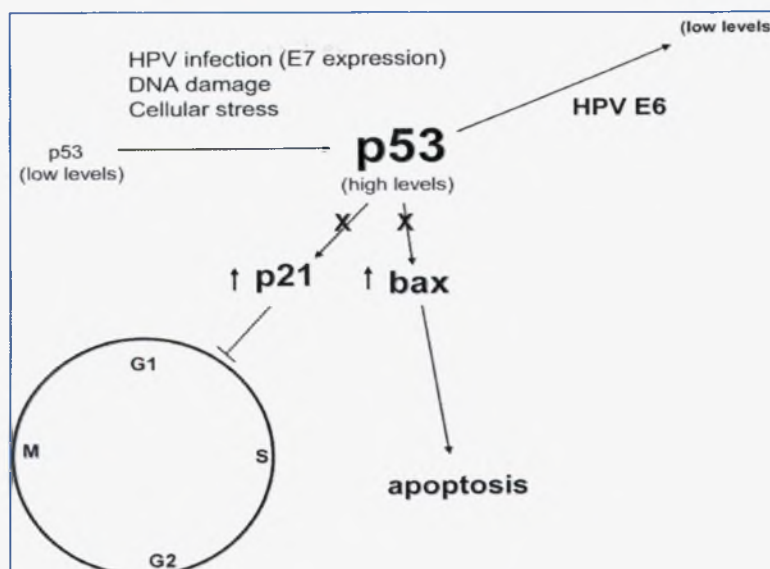
Η E5 πρωτεΐνη του HPV εκφράζεται κυρίως στη όψιμη φάση του κύκλου του ιού σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Στο γένωμα του HPV 31, η E5 επηρέασε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα.

Επιπλέον, η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται όντως στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Fehrmann et al 2003). Η E5 είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει στην έναρξη της καρκινογένεσης ή στην παθογένηση της HPV μόλυνσης. Πράγματι, ορισμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η E5 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του αντιγόνου του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II (Zhang B et al 2003).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

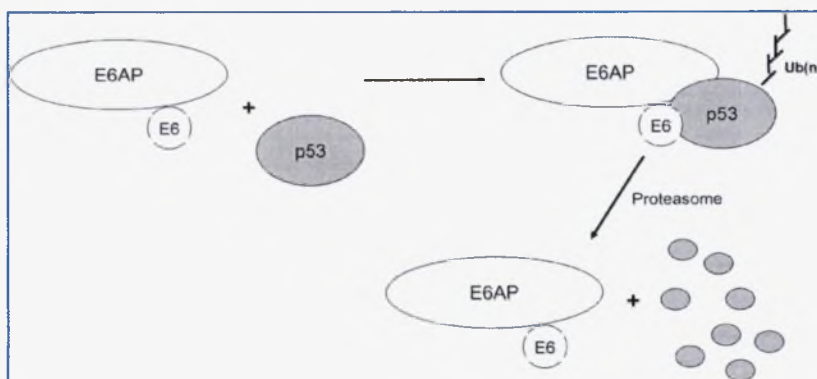
Οι E6 πρωτεΐνες των ιών χαμηλής και υψηλής επικινδυνότητας έχουν μέγεθος 150 αμινοξέα και περιέχουν 2 περιοχές δέσμευσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Οι E6 πρωτεΐνες των ιών χαμηλής και υψηλής επικινδυνότητας HPV έχουν παρόμοιες ιδιότητες ενεργοποίησης της μεταγραφής χρησιμοποιώντας μικρούς προαγωγείς που περιέχουν μόνο ένα TATA box element (Sedman et al 1991).

Οι E6 πρωτεΐνες υψηλού κινδύνου διανέμονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και προσδένονται σε περισσότερες από 12 πρωτεΐνες (zur Hausen et al 2002). Η έκφραση της E6 πρωτεΐνης από μόνης της σε κυτταρικές σειρές NIH 3T μπορεί να τις μετασχηματίσει και να αθανатоποιήσει ανθρώπινα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (Band et al 1991, Wazer et al 1995). Αντιθέτως για την αθανатоποίηση των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτείται η συνδυασμένη έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών (Hawley-Nelson et al. 1989). Επιπλέον η E6 μπορεί να επάγει την γενωμική αστάθεια, όπως αποδείχτηκε από την ανάπτυξη μεταθέσεων και ανευπλοϊδιών σε καλλιέργειες (Reznikoff et al, White A et al 1994) και την διατήρηση σταθερής επισωμικής αντιγραφής κατά την ιική ζωή (Park RB et al 2002). Η ιική πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση του ιού HPV. Βασικότετη είναι η αλληλεπίδρασή της με την p53. Ο φυσιολογικός ρόλος της p53 είναι ως καταστολέας όγκων, να ελέγχει την έκφραση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, σε περίπτωση βλάβης του DNA, ενεργοποιείται η p53 και επάγει την έκφραση του αναστολέα κινασών κυκλίνης p21. Η p21 αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου έτσι ώστε να επιδιορθωθεί η βλάβη. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι εφικτό, η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Ko et al 1996).



Εικόνα 2.3: Τα επίπεδα της of p53 σε φυσιολογικά κύτταρα είναι γενικά χαμηλά. Βλαπτικοί παράγοντες του DNA, ιϊκή μόλυνση και έκφραση του E7 αυξάνουν τα επίπεδα της p53 μέσω ενός συνδυασμού μηχανισμών που περιλαμβάνουν αυξημένη σταθερότητα των πρωτεϊνών και μετάφραση. Αυξημένα επίπεδα της p53 έχουν ως αποτέλεσμα είτε την απόπτωση είτε την παύση του κύκλου στο σημείο ελέγχου της G1 μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών γονιδίων και της p21. Οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες μπορεί να αλληλεπιδράσουν με αυτό τον αρνητικό ρυθμιστή της ανάπτυξης της p53, είτε απομονώνοντας την p53 σε ένα σταθερό, αλλά μη λειτουργικό σύμπλοκο είτε προκαλώντας ουβικιτινίωση και ενισχυμένη πρωτεόλυση όπως παρατηρήθηκε στις E6 πρωτεΐνες των HPV υψηλής επικινδυνότητας (Howley et al 2006).

Η αλληλεπίδραση της p53 και της E6 γίνεται μέσω της ουβικιτινικής λιγάσης E6AP (Huibregtse et al 1991). Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλοκο των τριών παραπάνω παραγόντων που συντελεί στην ουβικιτινίωση της p53 και την επακόλουθη αποδόμησή της από το πρωτεάσωμα 26S. Έπειτα ο χρόνος ημιζωής της p53 μειώνεται από μερικές ώρες σε λιγότερο από 20 min στα κερατινοκύτταρα (Huibregtse et al 1993, Hubbert et al 1992).



Εικόνα 2.4: η δημιουργία του τριμερούς συμπλόκου E6-E6AP-p53 (Howley et al 2006).

Επίσης η E6 μπορεί να ελαττώσει τη δραστικότητα της p53 μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον συνενεργοποιητή της p53, p300/CBP (Lechner et al 1994, Meyerson et al, 1997). Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας της p53 στοχεύοντας στον συνενεργοποιητή της p300/CBP παρέχει ένα δεύτερο μηχανισμό που μπορεί να εμποδίσει την p53. Σχετική μελέτη απέδειξε ότι η E6 μπορεί να εμποδίσει την ακετυλίωση που προκαλείται από τον p300 στον νουκλεοσωμικό πυρήνα των ιστονών (Thomas MC et al 2005). Η ενεργοποίηση της p300/CBP προκαλεί άρση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G1/S και G2/M οδηγώντας σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και διπλασιασμούς στο κύτταρο (Foster et al 1994, Kessis et al 1993, Thompson et al 1997).

Παράλληλα μια εναλλακτική μορφή της E6 ή E6* μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις E6 και E6AP (Pim et al 1994, Scheffner et al 1994). Η E6* αποδομεί την P53 αλλά μόνο η E6 πλήρους μήκους αθανατοποιεί κύτταρα (Bedell et al 1989).

Μια ακόμα λειτουργία των E6 πρωτεϊνών είναι η αλληλεπίδρασή τους με την οικογένεια πρωτεϊνών PDZ. Οι PDZ συνδέονται μέσω του C τελικού άκρου της E6 πρωτεΐνης υψηλής επικινδυνότητας HPV ιών και το αποτέλεσμα είναι η αποδόμηση της περιοχής PDZ. Διαγονιδιακά ποντίκια που μετά από την παραπάνω αλληλεπίδραση έχασαν την περιοχή PDZ, εμφάνισαν υπερπλασίες αν και διατηρούσαν τον έλεγχο της απενεργοποίησης της p53 (Nguyen et al 2003). Η E6 αποτελεί μια μοριακή γέφυρα ανάμεσα στις πρωτεΐνες PDZ και την E6AP, διευκολύνοντας την ουβικιτινίωσή τους και συμβάλλοντας στην αποδόμηση τους.

Ο παρακάτω πίνακας περιέχει τους μοριακούς στόχους της E6:

Κυτταρικές πρωτεΐνες	Λειτουργικές συνέπειες
E6AP	Ουβικιτινίωση και αποδόμηση συσχετιζόμενων πρωτεϊνών, Ουβικιτινίωση E6
p53, HDlg MUPP1 and hScrib	E6AP εξαρτώμενη ουβικιτινίωση και αποδόμηση
E6BP (Erc55), προσαρμοστικό σύμπλοκο κλαθρίνης AP-1	Άγνωστη λειτουργία
Paxillin	Διακοπή του κυτταροσκελετού ακτίνης
IRF-3	Παρεμπόδιση της επαγωγής της ιντερφερόνης
Bak	Παρεμπόδιση της απόπτωσης που επάγεται από την Bak
CBP/p300	Παρεμπόδιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης της p53
Myc, NFX1	Ενεργοποίηση της κυτταρικής τελομεράσης
E6TP1	Αποδόμηση που επάγεται από την E6
hADA3	Μεταγραφική ενεργοποίηση

Πίνακας 2.1: κυτταρικοί στόχοι των E6 ογκοπρωτεϊνών των papillomavirus (Howley et al 2007).

Επίσης η E6 μπορεί να αλληλεπιδράσει και με την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT (Klingelutz et al 1996). Η δράση της τελομεράσης (η οποία είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από 4 υπομονάδες) έγκειται στην προσθήκη εξαμερών επαναλήψεων στα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια της δράσης της προκαλεί σμίκρυνση των τελομερών, κυτταρική διαίρεση και τελικά γηρασμό των κυττάρων (Liu et al 1999). Η πρωτεΐνη E6 ενεργοποιεί την μεταγραφή της hTERT μέσω της συνδυαστικής της δράσης με τους παράγοντες Myc και Sp1 (Kyo et al 2001). Έτσι η E6 προσδένεται στον παράγοντα Myc και τον συνενεργοποιητή του Max οδηγώντας στην μεταγραφική ενεργοποίηση του προαγωγέα της hTERT (Veldman et al 2003).

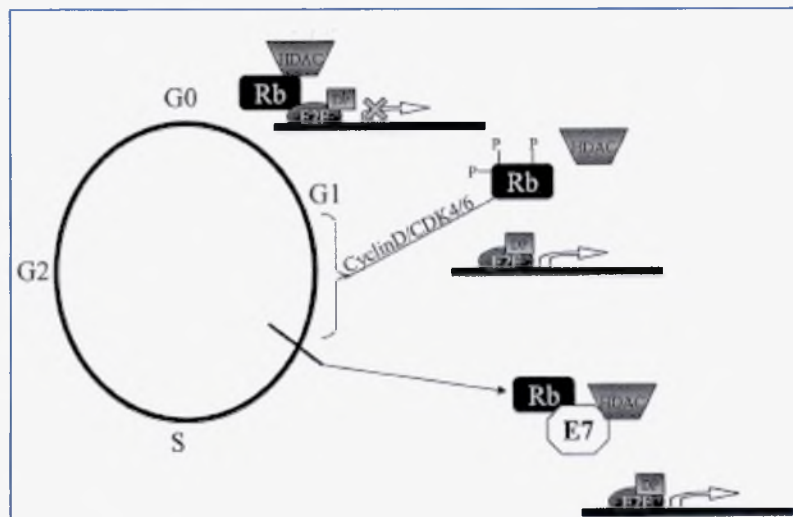
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η E7 ογκοπρωτεΐνη είναι απαραίτητη μαζί με την E6 για την αθανатоποίηση και την ιική παθογένεια. Η E7 εντοπίζεται στον πυρήνα και έχει μέγεθος 100 αμινοξέα και μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την καζεϊνική κινάση II (CK II) (Howley 2006). Η έκφρασή της E7 σε κυτταρικές σειρές NIH 3T έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να τις αθανатоποιήσει ενώ σε χαμηλότερο βαθμό αθανатоποιεί ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, ενώ η αθανатоποίηση των κερατινοκυττάρων είναι

αποτελεσματικότερη όταν εκφράζεται και η E6 πρωτεΐνη (Veldman et al 2003, Munger et al 1989).

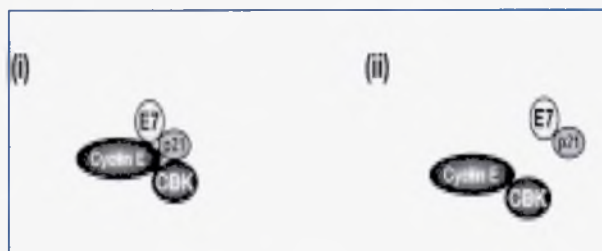
Η E7 αποτελείται από τις εξής 3 συντηρημένες περιοχές 1ον) την CR1 στο N άκρο, 2ον) την CR2 που περιλαμβάνει το μοτίβο LXCXE το οποίο προσδένει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb και 3ον) την CR3 που περιέχει 2 μοτίβα δάχτυλου ψευδαργύρου. Η E7 πρωτεΐνη έχει την ιδιότητα να ενώνεται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος Rb, p107 και p130 (Dyson et al 1989). Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1, οι οποίοι συνδέονται στους προαγωγείς των γονιδίων της φάσης S. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής αυτών των γονιδίων (Edmonds et al 1989, Weintraub et al 1995).

Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου τα σύμπλοκα κυκλινών-κινασών φωσφορυλιώνουν την Rb και έτσι η Rb απελευθερώνεται από τους E2F/DP. Πλέον τα γονίδια που κατέστειλαν είναι ελεύθερα να μεταγραφούν και να συνθέσουν DNA. Επίσης η E7 συνδέεται με την Rb έτσι ώστε η E7 να αποδομείται μέσω της ουβικιτινίωσής της από το πρωτεάσωμα (Berezutskaya et al 1997, Wang et al 2001). Το μοτίβο LXCXE μέσα στην ομόλογη περιοχή CR2 της E7 επαρκεί για τη δέσμευση της Rb, αλλά επιπλέον αλληλουχίες στην ενδιάμεση αμινοτελική περιοχή CR1 της ομόλογης περιοχής της E7 απαιτούνται για την αποδόμηση της πρωτεΐνης και αυτές οι αλληλουχίες είναι επίσης απαραίτητες για τις ιδιότητες μετασχηματισμού της E7 (Howley et al 2007). Οι παραπάνω δράσεις συντελούν στην απορύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου έτσι ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.



Εικόνα 2.5: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τις πρωτεΐνες Rb, HDAC και το μεταγραφικό σύμπλοκο E2F/DP-1, καθώς και πως επηρεάζεται από την δράση της E7 (Longworth et al 2004).

Η E7 έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E καθώς και με τους αναστολείς των κυκλινω εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Η E7 εμποδίζει τη δράση των p21 και p27 εφόσον έχουν αυξηθεί τα επίπεδα των κυκλινών A και E. Λόγω της παραπάνω δράσης η Rb φωσφορυλιώνεται και προωθείται ο κυτταρικός κύκλος (Funk J.O et al 1997).



Εικόνα 2.6: i) όταν τα επίπεδα της E7 είναι χαμηλά σε σχέση με την p21, τότε η κυκλίνη E, η E7, η p21 και η CDK σχηματίζουν ένα ανενεργό σύμπλοκο. Η είσοδος στη φάση S εμποδίζεται και η κυκλίνη E συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα. ii) όταν τα επίπεδα της E7 είναι υψηλά σε σχέση με την p21, η p21 απενεργοποιείται και γίνεται η είσοδος στην φάση S. Τα επίπεδα της κυκλίνης E παραμένουν χαμηλά (Doorbar et al 2007).

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την E7 είναι οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDCAs). Οι HDCAs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η αφαίρεση ακέτυλο-ομάδων από τις πλούσιες σε λυσίνες αμινοτελικές ουρές των ιστονών που συγκροτούν το νουκλεόσωμα. Οι HDCAs βοηθούν την Rb να συνδεθεί με τους E2F προαγωγείς. Οι E7 πρωτεΐνες δεσμεύονται στις HDCAs και μπορούν τόσο να αθανатоποιήσουν τα κύτταρα όσο και να διατηρήσουν τον ιό HPV στην επισωματική του μορφή. Επιπλέον, οι HDCAs μπορούν να αποακετυλιώσουν απευθείας τους παράγοντες E2F, συμβάλλοντας στην απώλεια της λειτουργίας τους (Marks et al 2001).

Ο παρακάτω πίνακας περιέχει τους μοριακούς στόχους της E7:

Κυτταρικές πρωτεΐνες	Λειτουργικές συνέπειες
pRB, p107, p130	Διακοπή του μεταγραφικού παράγοντα των συμπλόκων E2F
	Αποδόμηση
p21 ^{cip1}	Απενεργοποίηση της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (CDK) και της παρεμποδιστικής ικανότητας της αντιγραφής
p27 ^{kip1}	Απενεργοποίηση της παρεμποδιστικής ικανότητας της CDK
TBP, TAF110, Mi2 Ξ^2 (HDAC), M2 Pyruvate kinase, γλυκοσιδάση, hTid-1 , F-ακτίνη, S4 υπομονάδα του πρωτεασώματος	Άγνωστη λειτουργία
AP-1	Ενεργοποίηση της c-jun μεταγραφικής λειτουργίας
IGFBP-3	Παρεμπόδισης της απόπτωσης που επάγεται από την IGFBP-3
p48 στοιχείο του ISGF3	Παρεμπόδιση της διέγερσης από την IFN
Forkhead μεταγραφικός παράγοντας MPP2	Ενεργοποίηση της MPP2 μεταγραφικής ενεργότητας

Πίνακας 2.2: κυτταρικοί στόχοι των E7 ογκοπρωτεϊνών των papillomavirus (Howley et al 2007).

Γονίδιο:	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμήκησης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση αντιγραφής. Υπάρχει σε δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός καταστολέας. Δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή του ιικού γενώματος.
E3	Άγνωστη λειτουργία.
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 φωσφορύλιωση 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 hHRT.
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.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

Πίνακας 2.3: Περίληπτική αναφορά όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

3. Ο κύκλος ζωής των HPV

3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Η μόλυνση από τους HPV απαιτεί την μόλυνση της βασικής στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή, πιθανώς μέσω πληγών ή εκδορών.



Εικόνα 3.1: Μόλυνση της βασικής στοιβάδας του ξενιστή από HPV

Η δέσμευση του κυττάρου-ξενιστή και η είσοδος των HPV εξαρτάται από διάφορους υποδοχείς. Αρχικά αναγνωρίστηκε η αδ ιντεγρίνη ως υποψήφιος υποδοχέας (Evander M et al 1997). Τα καψίδια των PV προσδένονται επίσης στην ηπαρίνη και σε γλυκοσαμινογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων, που μπορούν να ξεκινήσουν την δέσμευση του ιού από τον υποδοχέα (Bousarghin L et al 2003, Joyce JG et al 1999, Shafiti-Keramat S et al 2003). Οι περισσότεροι PVs εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση του υποδοχέα η οποία εξαρτάται από κυστίδια κλαθρίνης (Day PM et al 2003). Η αποσυναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και η έκθεση του ιικού γενώματος γίνεται μέσα στο ενδόσωμα. Συνεπώς, η L2 και το γένωμα διαφεύγουν στο κυτταρόπλασμα, εισέρχονται στον πυρήνα και εντοπίζονται στην περιοχή 10 του πυρήνα (Day PM et al 2004). Μελέτες υποδεικνύουν τον πολλαπλό ρόλο της L2 σε αυτές τις διαδικασίες. Η L2 ίσως ενισχύει την εισαγωγή του ιικού γενώματος και την τοποθέτησή του στην μεταγραφικά ενεργή περιοχή 10 του πυρήνα. Επίσης η C-τελική περιοχή της L2 διευκολύνει την έξοδο από τα ενδοσώματα μετά την έκδυση του ιού (Kamper N et al 2006). Η διάσπαση της L2 σε μια περιοχή συναίνεσης με φουρίνη είναι απαραίτητη για την διαφυγή των ενδοσωμάτων από την μόλυνση (Richards RM et al 2006). Επιπλέον, η L2 αλληλεπιδρά με το tSNARE syntaxin 18, ένα στοιχείο της πρωτεΐνης

του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι εξίσου σημαντική για τη μεταφορά του ιικού γενώματος στον πυρήνα (Bossis I et al 2005). 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 υπό μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα 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).

3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του γενώματος των HPV κατά την διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις. Κατά την πρώτη φάση η αντιγραφή του ιού ξεκινά όταν υπάρχει πολλαπλασιασμός του ιικού γενώματος σε περίπου 50-100 αντίγραφα. Στα κύτταρα στα οποία το ιικό DNA έχει εγκαθιδρυθεί, το ιικό DNA διατηρείται ως σταθερό πλασμίδιο σε πολλά αντίγραφα. Συγκεκριμένα, η μόλυνση οδηγεί στην εγκαθίδρυση του ιικού γενώματος ως σταθερό επίσωμα στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας και αυτό απαιτεί την έκφραση των ιικών πρωτεϊνών της αντιγραφής E1 και E2. Η πρωτεΐνη E2 διαδραματίζει πολλούς ρόλους κατά την μόλυνση των βασικών κυττάρων και απαιτείται για την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA. Κατά την δεύτερη φάση, στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας το ιικό γένωμα αντιγράφεται μαζί με το κυτταρικό DNA στη φάση S, καθώς τα αντιγραφόμενα DNA του ιού κατανέμονται ισομερώς κατά τη διαίρεση του κυττάρου. Τα ιικά γενώματα αντιγράφονται κατά μέσο όρο μια φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, συγχρονισμένα με το χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή. Η E2 δρα επιπλέον ως μεταγραφικός παράγοντας καθώς ρυθμίζει τον πρώιμο ιικό υποκινητή (p97 στον HPV16, p99 στον HPV31) και ελέγχει την έκφραση των ιικών ογκογονιδίων (E6 and E7). Σε χαμηλά επίπεδα η E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ σε υψηλά επίπεδα καταστέλλει την έκφραση των ογκογονιδίων εκτοπίζοντας τον μεταγραφικό ενεργοποιητή SP1 από μια περιοχή γειτονικά στον πρώιμο υποκινητή.

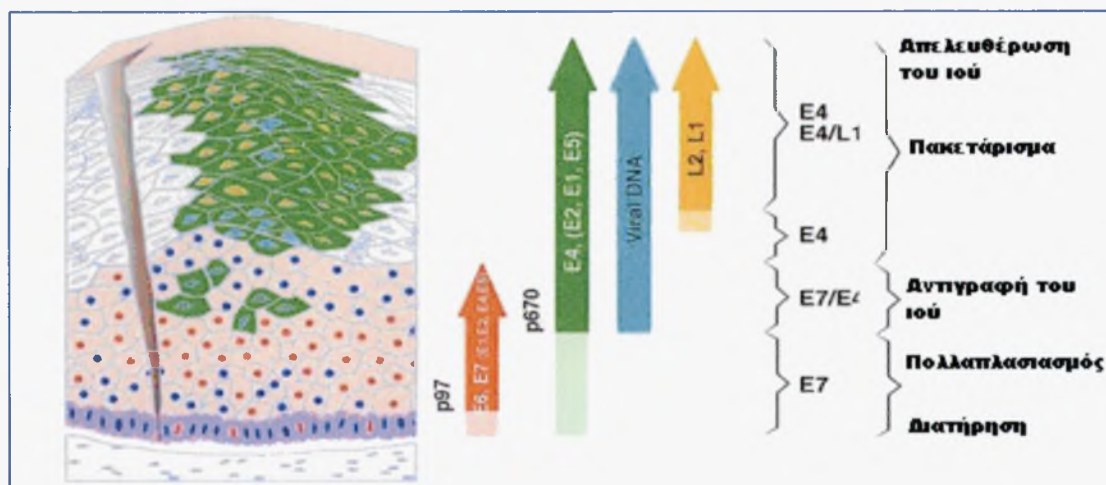
Αυτού του τύπου η αντιγραφή του DNA, ως πλασμίδιο σε πολλά αντίγραφα, εξασφαλίζει μια επίμονη μόλυνση στα βασικά κύτταρα της επιδερμίδας. Κατά την τρίτη φάση, η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται στα περισσότερα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα των papilloma ιών. Σε αυτά τα κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιείται πλέον σύνθεση κυτταρικού DNA, παρατηρείται μια έκρηξη σύνθεσης ιικού DNA, η οποία παράγει τα γενώματα που θα πακεταριστούν σε νεοσύστατα καψίδια (Howley et al 2007, Gilbert DM et al 1987).

3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Η μεταγραφή των papillomaviruses είναι σύνθετη επειδή υπάρχουν πολλαπλοί υποκινητές, εναλλακτικά και πολλαπλά σχέδια ματίσματος και η διαφορική παραγωγή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) των ειδών σε διαφορετικά κύτταρα (Howley et al 2007). Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων.

Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6, και E7) από την πρόιμη περιοχή του ιικού γενώματος. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6, E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τον HPV-16, HPV-31 και p105 για τον HPV-18). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Από την άλλη πλευρά στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σώματα. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων (Grassmann K et al. 1996). Μια ακόμα σημαντική διαφορά στη δομή του E6 και E7 και στον τρόπο με τον οποίο εκφράζονται διαχωρίζει τους HPV υψηλής επικινδυνότητας από τους HPV χαμηλής επικινδυνότητας. Έτσι για τους HPV υψηλής επικινδυνότητας ένας μόνο υποκινητής είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή

των E6 και E7. Αντιθέτως για τους HPV χαμηλής επικινδυνότητας (π.χ. HPV-6 και HPV-11) δύο υποκινητές είναι υπεύθυνοι για την μεταγραφή των E6 και E7 (Howley et al 2007).



Εικόνα 3.2: 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 (κόκκινο χρώμα). 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 (πράσινο χρώμα). Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο χρώμα).

3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

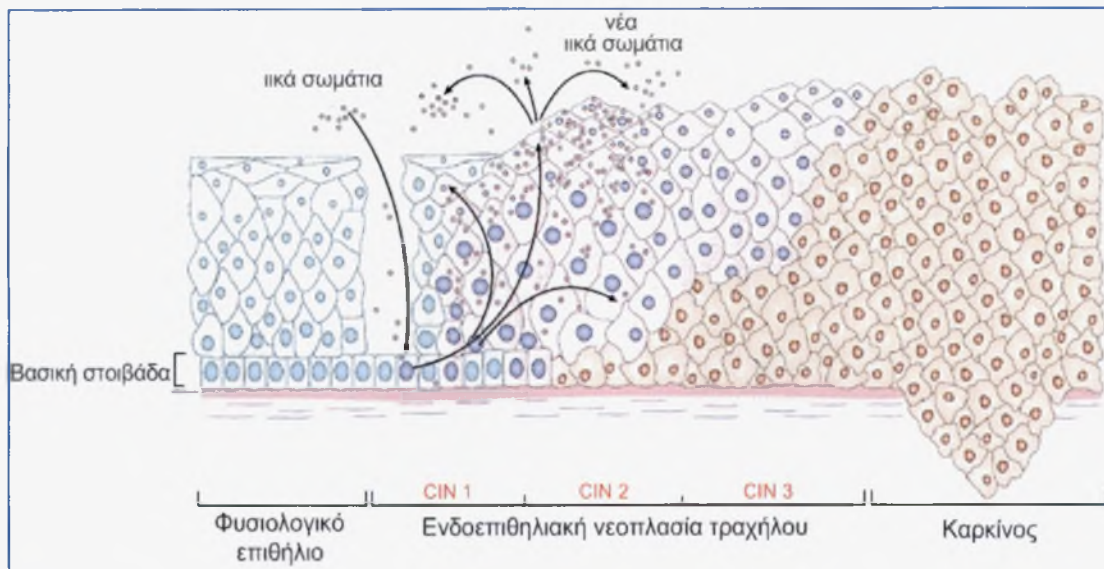
Το τελικό στάδιο στον παραγωγικό κύκλο των papillomaviruses απαιτεί το πακετάρισμα των γενωμάτων που έχουν αντιγραφεί, σε μολυσματικά σωματίδια. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1, L2 απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης E2 (Day P.M et al 1998), η οποία όπως έχει παρατηρηθεί συμβάλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B et al 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιικού γενώματος εντός του καψιδίου (Fay A. et al 2004). Από την άλλη πλευρά η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι βασική δομική μονάδα του καψιδίου των HPV (Florin et al 2002). Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την απελευθέρωση των ιών HPV. Τα ιικά σωματίδια

παρατηρούνται στην κοκκώδη στοιβάδα του επιθηλίου και όχι σε χαμηλότερες στοιβάδες. Ο ιός δεν θεωρείται ότι είναι κυτταρολυτικός και η απελευθέρωση των ιϊκών σωματίων δεν συμβαίνει πριν τα στρώματα του κερατινοποιημένου επιθηλίου (Howley et al 2007).

Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια με τη βοήθεια της E4 πρωτεΐνης. Η E4 μπορεί να διακόψει το δίκτυο της κερατίνης και να επηρεάσει την ακεραιότητα του κερατινοποιημένου καλύμματος (Doorbar et al 2006).

3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Μια σειρά αλλαγών δυσπλασίας κατά τη διάρκεια πολλών χρόνων συνοδεύει την πρόοδο των αλλοιώσεων σε κακοήθειες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου των λεπιδωδών (squamous) κυττάρων (SCCs) (Krebs et al 1994, Wright et al, Richart RM et al 1969). Ο βαθμός στον οποίο το λεπιδώδες επιθήλιο αντικαθίσταται από κύτταρα της βασικής στοιβάδας καθορίζει την σοβαρότητα των αλλοιώσεων. Η ενσωμάτωση του HPV DNA, μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού, είναι το κλειδί για τη σταθεροποίηση της έκφρασης των E6/E7 και αποτελεί τη μετάβαση στις σοβαρότερες αλλοιώσεις (Howley et al 2007). Στις σοβαρότερες δυσπλασίες, τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας έχουν αντικαταστήσει ολόκληρη την πυκνότητα της αλλοίωσης. Η ιστολογική ταξινόμηση των τραχηλικών δυσπλασιών είναι οι βαθμοί CIN 1,2 και 3, οι οποίοι ανταποκρίνονται σε ήπιες, μέτριες και σοβαρές δυσπλασίες αντίστοιχα. Η CIN 3 εντοπίζεται επίσης in situ και σε επιθετικά καρκινώματα. Στο κυτταρολογικό σύστημα Bethesda (Kurman R et al 1994) οι ήπιες κυτταρολογικές ανωμαλίες ταξινομούνται ως χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις των λεπιδωδών κυττάρων (LSIL) και οι περισσότερο σοβαρές ανωμαλίες ταξινομούνται ως υψηλού βαθμού SIL. Οι διαφορούμενες αλλοιώσεις ταξινομούνται ως (ASCUS) (Hoory et al 2008).



Εικόνα 3.3: Εξέλιξη της μόλυνσης από HPV σε καρκίνο του τραχήλου. Εδώ φαίνονται και τα προκαρκινικά στάδια CIN 1-3.

4. Κλινικές Εκδηλώσεις

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας όντας ο 2^{ος} πιο συνηθισμένος καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως, προκαλεί 500.000 περιστατικά κακοήθειας κάθε χρόνο και περίπου ισάριθμους θανάτους ετησίως (Parkin DM et al 2005, Pisani P 1999). Παρόλο που τα περιστατικά διανέμονται σε όλη την υφήλιο, η συχνότητά τους δεν διανέμεται ομοιόμορφα. (Human papillomaviruses 1995, Yang BH 2004). Το 80% των καρκίνων του τραχήλου προκύπτει στις αναπτυσσόμενες χώρες με μικρότερα ποσοστά στις αναπτυγμένες χώρες. Περίπου σε 12.000 περιπτώσεις στις ΗΠΑ γίνεται διάγνωση και το ένα τρίτο αυτών των περιπτώσεων καταλήγουν σε θάνατο. Τα ποσοστά ποικίλουν ανάλογα με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, παραδείγματος χάριν τα ποσοστά των μαύρων γυναικών είναι διπλάσια σε σχέση με αυτά των λευκών (Freeman H 2005). Αυτή η διαφορά καταδεικνύει και την διαφορά στην πρόσβαση από τον γενικό πληθυσμό σε στρατηγικές πρόληψης όπως τέστ Παπανικολάου (Pap test) ως διαγνωστική μέθοδο και τη θεραπεία των πρόδρομων κακοηθειών.

Η διάδοση του HPV DNA στην μήτρα έχει υπολογιστεί σε γυναίκες από όλο τον κόσμο χρησιμοποιώντας ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης. Η διάδοση είναι υψηλότερη στην Αφρικανική ήπειρο με 23%, 15,6% στην Αμερική, 8,3% στην Ασία και 6,6% στην Ευρώπη (WHO HPV Information Centre, www.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/SummaryReportsSelect.cfm, τελευταία εκτίμηση 30 Ιανουαρίου 2008). Οι υπολογισμοί διάδοσης πιθανώς ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία του πληθυσμού, την ενδημικότητα του HIV και τη σεξουαλική συμπεριφορά. Τα δεδομένα είναι μειωμένα για το φορτίο του HPV στους άνδρες, παρόλο που σε πρόσφατη μελέτη σε άνδρες 18-23 χρόνων έδειξε υψηλή διάδοση του HPV (25,8%) (Hoory et al, 2008).

4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.

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

A) Η σεξουαλική επαφή. Οι HPV προσβάλλουν με μεγαλύτερη συχνότητα γυναίκες που εναλλάσσουν πολλαπλούς συντρόφους.

Β) Μετάδοση από την μητέρα στο νεογέννητο.

Γ) Χωρίς σεξουαλική επαφή (επαφή με ουρογενετικά εκκρίματα) (Fraiser 1994).

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1 Κλινικά δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τραχηλικά επιχρίσματα του αντικαρκινικού νοσοκομείου Άγιος Σάββας. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2003-2005 σε υγρό μέσο ThinPrep και διατηρήθηκαν στους -20°C. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας τα οποία συνοδεύονταν με περιγραφή της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Τα παρακάτω δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV 16 στο εργαστήριο σε προηγούμενη μελέτη με τη μέθοδο NMPCR. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες:

Δείγματα από το Νοσοκομείο Άγιος Σάββας					
747	793	796	825	858	868

Πίνακας 5.1: Κωδικοποίηση δειγμάτων από το Νοσοκομείο Άγιος Σάββας

Δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας	
Δείγματα	Κλινική Εικόνα
A3	HG (CIN III)
A4	HG (CIN III)
A6	HG (CIN III)
A13	HG (CIN III)
A15	HG (CIN III)
A17	LG (CIN I)
A24	LG (CIN I)
A38	HG (CIN III)

Πίνακας 5.2: Κωδικοποίηση των δειγμάτων από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

5.2 Προετοιμασία DNA

Η απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I. et al, 1996. Από κάθε κολπικό επίχρισμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μl τα οποία αναμίχθηκαν καλά με γλυκογόνο

10μg/tube και lysis Buffer 300μl (GuSCN 4M, N-lauroyl sacrosine 0,5%, Dithiotreitol 1mM, sodium citrate 25 mM) και επώαστηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), καλή ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 20 min στους +4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης. Έπειτα ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ιζήμα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

Έπειτα ακολούθησε μια 2^η εκχύλιση στα δείγματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που είχαν ήδη εκχυλιστεί με το 1^ο πρωτόκολλο, με την εφαρμογή ενός 2^{ου} πρωτόκολλου. Η 2^η εκχύλιση με διαφορετικό πρωτόκολλο έγινε για τον έλεγχο της ποιότητας της 1^{ης} εκχύλισης και για την περαιτέρω απομάκρυνση αναστολέων της PCR. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τη 2^η εκχύλιση ήταν το εξής:

- 1) Απομάκρυνση των κυττάρων από την καλυπτρίδα με ένα αποστειρωμένο tip μέσα σε ένα σωληνάριο Eppendorf.
- 2) Προσθήκη 0,5-1,5 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και vortex.
- 3) Φυγοκέντρηση των tubes στις 13.000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 4) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με ένα 1 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA), vortex.
- 5) Επώαση στους 4°C για 1 ώρα.
- 6) Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min.
- 7) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με 50 μl buffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3 , 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Tween 20).
- 8) Προσθήκη 1μL proteinase K (20μg/μl).

9) Επώση στους 55°C για 60 min και βρασμός για 10 min για την απενεργοποίηση της proteinase K.

10) Φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 5 min.

11) Συλλογή του υπερκείμενου.

5.3 Εκκινητικά μόρια PCR

Για την συγκεκριμένη εργασία αρχικά σχεδιάστηκαν 2 ζευγάρια εκκινητών οι 24-1071 και οι 21-934 με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV16 η οποία είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων Gene Bank. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 έτσι ώστε να ενισχύουν ένα κομμάτι του γονιδίου LCR, τα γονίδια E6 και E7 και ένα κομμάτι του γονιδίου E1 των δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν με HPV 16. Το 1^ο ζευγάρι εκκινητών ονομάστηκε 24-1071 με έναν «forward primer» 24, και έναν back primer 1071. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους primers είναι της τάξης των 1047 bp. Το 2^ο ζευγάρι εκκινητών ονομάστηκε 21-934 με έναν «forward primer» 21, και έναν back primer 934. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους primers είναι της τάξης των 913 bp. Τα 2 παραπάνω ζευγάρια εκκινητών εφαρμόστηκαν σε όλα τα δείγματα που είχαμε και δούλεψαν στα δείγματα 747, 793, 796 από το Νοσοκομείο του Αγίου Σάββα για τα οποία δεν έχουμε το ιστορικό των ασθενών, ενώ δεν δούλεψαν σε κανένα δείγμα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (λόγω διαφορών των δειγμάτων με την πρότυπη αλληλουχία). Τα δείγματα που δούλεψαν αλληλουχήθηκαν και με βάση τα προϊόντα PCR σχεδιάστηκαν οι καινούριοι εκκινητές 41-757 με έναν «forward primer» 41, και έναν back primer 757, οι οποίοι ενισχύουν τα γονίδια E6 και E7. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους primers είναι της τάξης των 716 bp. Αυτό το ζευγάρι εκκινητών εφαρμόστηκε στα δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
24	CTA AGG GCG TAA CCG AAA TC	1047
1071	CGC ATG TGC TGT CTC TGT TT	
21	AAA CTA AGG GCG TAA CCG AAA	913
934	CAG CCT CTA CAT AAA ACC ATC CA	
41	AGC GAC CCA GAA AGT TAC CA	716
757	ATG GGG CAC ACA ATT CCT AG	

Πίνακας 5.3: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR με κατεύθυνση 5’-3’.

5.4 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA σε όλα τα κλινικά δείγματα και για την διαπίστωση ότι η διαδικασία της εκχύλισης έχει πραγματοποιηθεί σωστά και ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς της PCR πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης ενός ‘housekeeping’ γονιδίου. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια GH20 (5’-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3’) και PC04 (5’-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3’).

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

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
PCO4 και GH20	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 94°C για 30sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 40oC για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Πίνακας 5.4: Συνθήκες αντίδρασης PCR γλοβουλίνης.

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

5.5 PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934

Σε όλα τα δείγματα (Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και Νοσοκομείου Αγίου Σάββα) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 24-1071 και 21-934 για την ενίσχυση με PCR. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
24-1071 και 21-934	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 52oC για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Πίνακας 5.5: Συνθήκες αντίδρασης PCR

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

5.6 Autonested PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934

Για την ενίσχυση της ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε Autonested PCR. Τα PCR προϊόντα των κλινικών δειγμάτων ενισχύθηκαν με Nested PCR με τους ίδιους τύπο-ειδικούς εσωτερικούς εκκινητές 24-1071 και 21-934. Ωστόσο με αυτή τη διαδικασία ενισχύθηκαν μόνο τα δείγματα 747, 793, 796.

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

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
24-1071 και 21-934	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec	— 25 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 52oC για 30sec)	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Πίνακας 5.6: Συνθήκες Autonested PCR

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

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

Από τα προϊόντα της Autonested PCR 747, 793, 796 και με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 24-1071 και 21-934, 40μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι PCR ζώνες που προέκυψαν από το πήκτωμα αγαρόζης κόπηκαν 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 των PCR products από την Macrogen Inc, (Seoul, Korea).

5.8 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) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το GeneRunner και τέλος, η πολλαπλή στοίχιση και η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με το πρόγραμμα Mega. Έτσι σχεδιάστηκαν οι εκκινητές 41-757 με βάση την αλληλουχία των PCR products (747, 793, 796) που προέκυψαν, οι οποίοι ενισχύουν τα γονίδια E6 και E7.

5.9 PCR με εκκινητικά μόρια 41-757

Στα δείγματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 41-757 για την ενίσχυση με PCR. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
41-757	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec	— 40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55oC για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Πίνακας 5.7: Συνθήκες αντίδρασης PCR

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

5.10 Autonested PCR με εκκινητικά μόρια 41-757

Πραγματοποιήθηκε Autonested PCR με τους τύπο-ειδικούς εσωτερικούς εκκινητές 41-757 στα δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Τα προϊόντα της PCR με τα εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934 υποβλήθηκαν σε Autonested PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών 41-757. Η αντίδραση της Nested PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μείγμα περιείχε από: 2 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl του μείγματος των εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών για κάθε μίγμα εκκινητών ξεχωριστά όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
41-757	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec	— 25 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55oC για 30sec)	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72oC για 1 min	

Πίνακας 5.8: Συνθήκες Autonested PCR

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

5.11 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Autonested PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Autonested PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Από το προϊόν Autonested PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 140V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Η επιβεβαίωση της ύπαρξης HPV 16 στα δείγματα έγινε μέσω της ύπαρξης της χαρακτηριστικής μπάντας των bp με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

5.12 Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR

Στην συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης στα δείγματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που ενισχύθηκαν με AutoNested PCR με τους εκκινητές 41-757. Η κλωνοποίηση πραγματοποιείται διότι στα τραχηλικά δείγματα HPV16 θεωρείται πολύ πιθανή η ταυτόχρονη μόλυνση από διαφορετικά στελέχη HPV16. Έτσι με τη διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης θα προκύψουν μεμονωμένοι κλώνοι ο καθένας από τους οποίους περιέχει το γενωμικό τμήμα από ένα μόνο διακριτό στέλεχος.

Η Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR είναι απαραίτητη για την μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων των autonested PCR αντιδράσεων (θετικών δειγμάτων), η οποία ακολούθησε. Έτσι, η Autonested GoTaq Flexi PCR πραγματοποιήθηκε για την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων, καθώς επίσης για την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης poly(A) μονόκλωνων άκρων, μια ιδιότητα του ενζύμου πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την αντίδραση. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 μl προϊόντος της autonested PCR το οποίο έχει καθαριστεί από πήκτωμα αγαρόζης (όπως περιγράφεται παρακάτω), 2 μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών τελικής

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

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
24-1071 και 41-757	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec	
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 52oC για 30sec (24-1071) ή 55oC για 30sec (41-757)	30 κύκλοι
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Πίνακας 5.9: Συνθήκες GoTag PCR

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

5.13 Καθαρισμός προϊόντων της Autonested GoTaq Flexi PCR

Από τα προϊόντα της κάθε Autonested GoTag PCR, 50μl ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης 2%, το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, ο 100bp DNA Ladder σε συγκέντρωση 1μg/μl, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120Volts, 50mA για περίπου 1h. Οι αντίστοιχες στα προϊόντα των autonested PCR ζώνες απομακρύνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 1,5ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.14 Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων της Autonested GoTaq PCR

Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής:

A) Αντίδραση λιγάσης: χρησιμοποιείται ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA) για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων, έτσι ώστε να ενσωματωθεί σε αυτόν, το ενισχυμένο γενωμικό τμήμα από τις αντιδράσεις PCR. Τα προϊόντα της Autonested GoTaq PCR διαθέτουν πολύ-(A) άκρα τα οποία ενώνονται συμπληρωματικά με τα πολύ-(T) άκρα τα οποία διαθέτει ο φορέας. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl pGEM®-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTaq PCR 3μl, 1μl T4 DNA Ligase (3u/μl) και 2x Rapid Ligation Buffer 5μl.

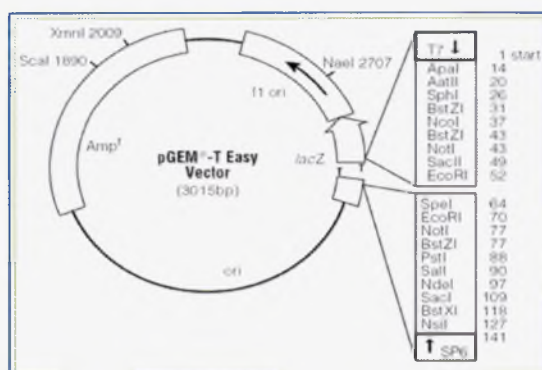
B) Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂): Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α. Από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) ακολουθώντας επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, 1ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD600 και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M (0,55g CaCl₂, Sigma, USA, διαλύονται σε ddH₂O μέχρι όγκο 50ml).

Γ) Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων: Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200μl από τα δεκτικά κύτταρα σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes). Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν τα μικροσωληνάρια στον πάγο για 30min. Έπειτα τα

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

Δ) Πέψη με EcoRI: Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl 10x H Buffer, 1μl Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15μl ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρασμα της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23μl που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων

στο πηκτώμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκτομής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων έγινε μέσω της ύπαρξης της χαρακτηριστικής μπάνας των bp με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).



Εικόνα 5.1: Ο φορέας κλωνοποίησης της pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. Από www.promega.com.

6. Αποτελέσματα

6.1 Αποτελέσματα Autonested PCR με εκκινητές 41-757

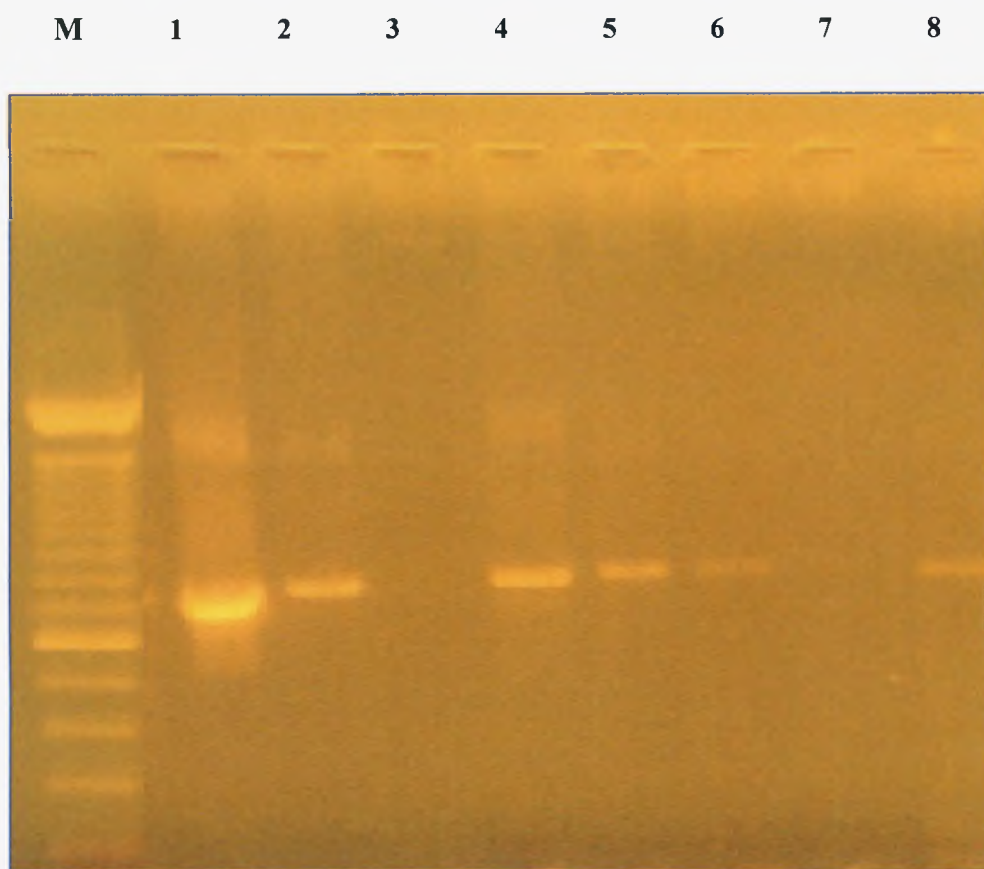
Τα δείγματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υποβλήθηκαν σε Autonested PCR με τους εκκινητές 41-757. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε η περιοχή Ε6-Ε7.

Δείγματα	Ζεύγος εκκινητών
A3, A4, A6, A13, A15, A17, A24, A38	41-757

Πίνακας 6.1: Δείγματα και ζεύγη εκκινητών με τα οποία ενισχύθηκαν

Ενδεικτικά παρακάτω παρουσιάζεται φωτογραφία για τα θετικά αποτελέσματα της Autonested PCR:

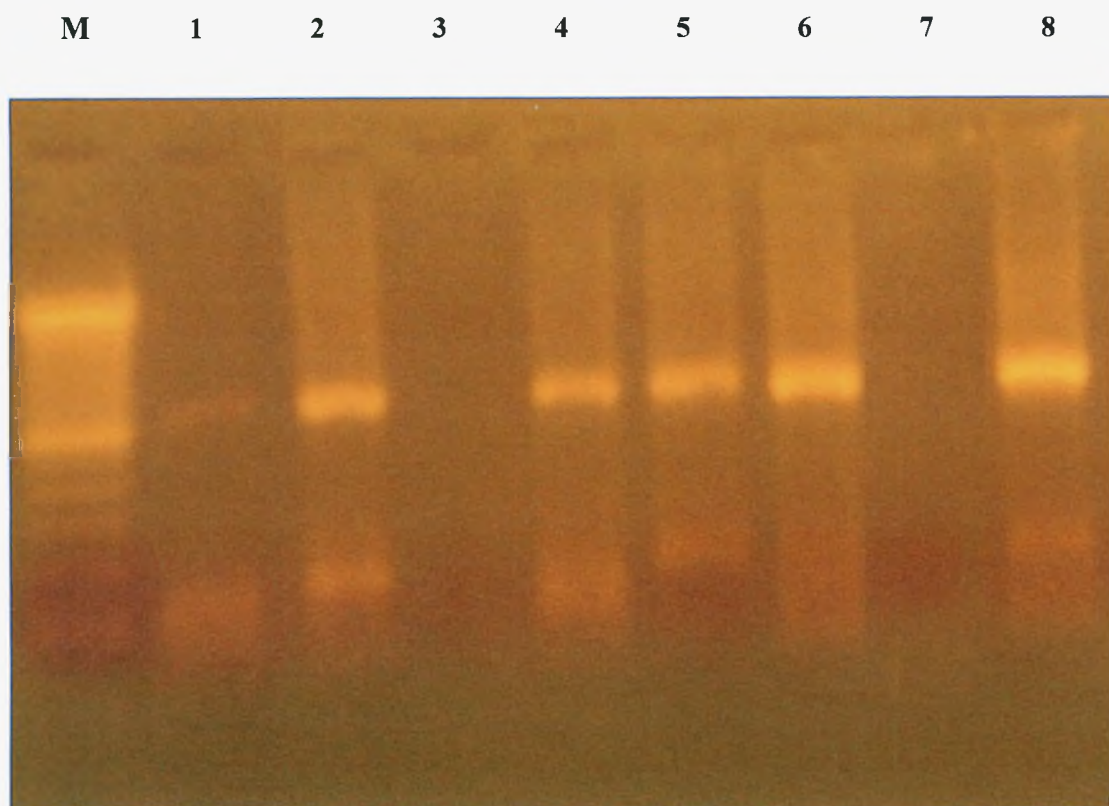
Autonested PCR με τα εκκινητικά μόρια 41-757. Τα δείγματα A3, A13, A15, A17, A24, A38 ενισχύθηκαν με τους εκκινητές 41-757 και ηλεκτροφορήθηκαν στις διαδρομές 1 έως 8. Στην εικόνα αυτή με Μ συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους ενώ στις διαδρομές 3 και 7 υπάρχει απεσταγμένο – αποστειρωμένο H₂O (ddH₂O), για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην διαδικασία της PCR. Στην διαδρομή 1 υπάρχει ένα έντονο προϊόν του A3, ενώ τα προϊόντα των A13, A15, A17, A24 υπάρχουν στις διαδρομές 2,4,5 και 6 αντίστοιχα. Στην διαδρομή 8 υπάρχει το προϊόν του A38. Τα προϊόντα που προκύπτουν είναι της τάξης των 716 bp όπως προκύπτει από τη σύγκριση των ζεύγων βάσεων με τον μάρτυρα Μ. Στις διαδρομές 3,7 το ddH₂O δεν παρουσιάζει προϊόν άρα δεν υπάρχει επιμόλυνση στην διαδικασία της PCR.



Εικόνα 6.1: PCR με τα εκκινητικά μόρια 41-757.

6.2 Autonested GoTaq Flexi Πολυμεράση PCR

Τα δείγματα A3, A13, A15, A17, A24, A38 από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο ενισχύθηκαν με Autonested GoTaq Flexi PCR έτσι ώστε στη συνέχεια να ελεγχθεί μέσω της μοριακής κλωνοποίησης εάν υπάρχουν πολλαπλές μολύνσεις από διαφορετικά variants σε κάθε δείγμα. Η παρακάτω εικόνα είναι μια ενδεικτική εικόνα Autonested GoTaq Flexi PCR των δειγμάτων A3, A13, A15, A17, A24, A38.

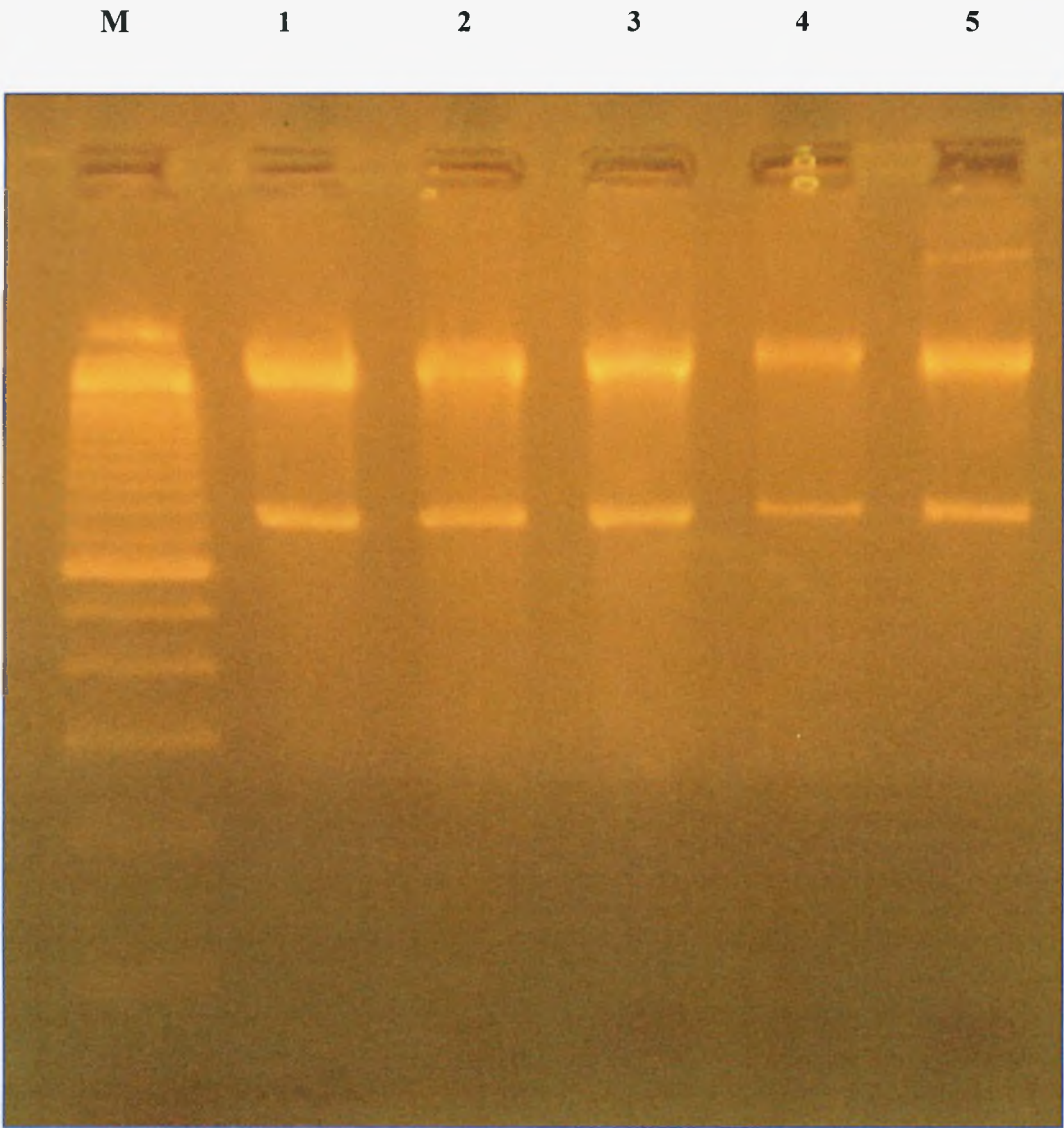


Εικόνα 6.2: Autonested GoTag Flexi PCR με τους εκκινητές 41-757.

Στην διαδρομή M βρίσκεται ο μοριακός μάρτυρας M, ενώ στις διαδρομές 3,7 ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Στις διαδρομές 1 έως 2, 4 έως 6 και 8 βρίσκονται κατά αντιστοιχία A3, A13, A15, A17, A24, A38 όπου σε όλα ανιχνεύεται το προϊόν των 716bp.

6.3 RFLP με EcoRI

Στην εικόνα παρατηρούμε στις διαδρομές 1 έως 5 τα προϊόντα της RFLP όπου βρίσκονται οι κλώνοι A13c1, A13c2, A13c3, A15c1, A15c2 ενώ στη θέση M υπάρχει ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Υπάρχουν 2 ζώνες η 1^η είναι στα 716 bp και η 2^η στα 1400 bp. Η 1^η ζώνη των 716 bp αντιστοιχεί στο γονιαδιακό προϊόν των E6-E7 γενομικών περιοχών που ανιχνεύεται, ενώ η 2^η ζώνη των 1400 bp αντιστοιχεί στο πλασμίδιο.



Εικόνα 6.3: RFLP με τους εκκινητές 41-757.

6.4 Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων 747, 793 και 796, οι οποίες ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934, καθώς και τα δείγματα A13, A15, A17, A24, A38 τα οποία ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια 41-757 και έπειτα κλωνοποιήθηκαν, επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής. Επίσης συγκρίθηκαν με την πρότυπη αλληλουχία των E6 και E7 γονιδίων αντίστοιχα, με βάση το πρόγραμμα βιοπληροφορικής MEGA. Επίσης το ίδιο έγινε και για τα variants African type 1, African type 2, Asian, Asian American και European.

Τα αποτελέσματα των αντικαταστάσεων των βάσεων καθώς και των αλλαγών των αμινοξέων που προκύπτουν στα δείγματα για τις περιοχές E6 και E7 απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E6 του HPV16					
		109	124	126	350
πρότυπη αλληλουχία		T	G	G	T
δείγματα					αλλαγή αμινοξέος
747	C				F9F
747		C			E14D
747				C	R15P
747					G
					L90V
793	C				F9F
793				C	R15P
793					G
					L90V
796	καμμία μετάλλαξη				

	νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E6 του HPV16								
	126	208	230	263	303	350	357	396	
	πρότυπη αλληλουχία	G	A	T	T	T	T	G	A
δείγματα									αλλαγή αμινοξέος
A13C1	C								R15P
A13C1		T							Q42H
A13C1			G						Y50D
A13C1				A					Y61N
A13C1						G			L90V
A13C2	C								R15P
A13C2							A		G92E
A13C2								T	D105V
A13C3	C								R15P
A13C3					A				L74*
A13C3						G			L90V

νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E6 του HPV16																
	126	145	169	201	286	289	321	335	350	365	368	405	432	463	495	
πρότυπη λληλουχία	G	G	T	G	T	A	T	C	T	T	G	T	T	C	G	
δείγματα																αλλαγή αμινοξέος
A15C1	C															R15P
A15C1				A												C40Y
A15C1		T														Q21H
A15C1					A											A68A
A15C1						G										V69V
A15C1							A									I80N
A15C1								T								H85V
A15C1									G							L90V
A15C1										G						L95V
A15C1											A					E96K
A15C1													C			L117P
A15C1																C40Y
A15C1																A68A
A15C1														G		D127E
A15C1															A	R138Q
A15C2	C															R15P
A15C2		T														Q21H
A15C2			C													T29T
A15C2					A											A68A
A15C2						G										V69V
A15C2								T								H85Y
A15C2									G							L90V
A15C2												A				I108N

	νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E6 του HPV16									
	126	143	145	286	289	335	371	403	435	
πρότυπη αλληλουχία	G	C	G	T	A	C	C	A	G	
δείγματα										αλλαγή αμινοξέος
A17C1	C									R15P
A17C1		G								Q21D
A17C1			T							Q21H
A17C1				A						A68A
A17C1					G					V69V
A17C1						T				H85Y
A17C1							T			Q97*
A17C1								G		L107L
A17C1									A	C118V

νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου Ε6 του HPV16																	
	126	143	158	172	178	184	201	218	221	285	306	336	350	390	466	514	523
πρότυπη αλληλουχία	G	C	C	A	A	A	G	C	C	C	T	A	T	T	A	G	C
δείγματα																	
A24C1	C																R15P
A24C1		G															Q21D
A24C1											A						L74I
A24C1												G					H85R
A24C1													G				L90V
A24C1														A			L103*
A24C1															T		K128N
A24C1																A	M144I
A24C1																	C147C
A24C2	C																R15P
A24C2					G												H31R
A24C2						T											I34I
A24C2							A										C40Y
A24C2								T									R46*
A24C2									T								R47C
A24C2										T							A68V
A24C2													G				L90V
A24C3	C																R15P
A24C3			A														I26M
A24C3				T													I30I
A24C3						T											I34I
A24C3													G				L90V

	νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E6 του HPV16														
	126	143	144	154	197	249	258	270	350	380	458	479	494	544	
πρότυπη αλληλουχία	G	C	A	A	T	G	T	A	T	A	C	C	C	A	
δείγματα															αλλαγή αμινοξέος
A38C1	C														R15P
A38C1		G													Q21E
A38C1				G											T24T
A38C1									G						L90V
A38C1										G					N100D
A38C2	C														R15P
A38C2		G													Q21A
A38C2			C												Q21A
A38C2						T									R55R
A38C2							A								I59K
A38C2								T							D63V
A38C2									G						L90V
A38C2												T			H133V
A38C2														T	R154S
A38C3	C														R15P
A38C3		G													Q21E
A38C3					C										Y39H
A38C3									G						L90V
A38C3											T				L126L
A38C3													T		R138W

νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16	
620	749
πρότυπη αλληλουχία	C
δείγματα	αλλαγή αμινοξέος
747	A
747	T
793	καμμία μετάλλαξη
796	καμμία μετάλλαξη

		νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16											
		596	649	655	662	671	755	763	770	776	812	815	
πρότυπη αλληλουχία		T	G	T	A	A	T	T	A	C	T	G	
δείγματα												αλλαγή αμινοξέος	
A13C1											A		M84K
A13C2		A											M12K
A13C2			C										D30H
A13C2				C									S32P
A13C2					G								E34G
A13C2							C						L65P
A13C2												A	G85D
A13C3						G							E37G
A13C3								C					C68R
A13C3									T				Q70L
A13C3										T			T72I
A13C3												A	G85D

	νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16							
	599	660	686	759	789	795	798	
πρότυπη αλληλουχία	T	G	C	G	T	T	G	
δείγματα								αλλαγή αμινοξέος
A15C1		T						E33D
A15C1			A					A42D
A15C1				A				R66R
A15C1					C			I76I
A15C1						G		T78T
A15C1							C	L79F
A15C2	A							L13*
A15C2					C			I76I
A15C2						G		T78T

		νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16					
		563	647	789	795	814	
πρότυπη αλληλουχία		T	A	T	T	G	
δείγματα							αλλαγή αμινοξέος
A17C1		C					M1T
A17C1			G				N29S
A17C1				C			I76I
A17C1					G		T78T
A17C1						A	G85S

	νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16							
	565	627	728	777	789	806	813	
πρότυπη αλληλουχία	C	C	C	A	T	T	G	
δείγματα								αλλαγή αμινοξέος
A24C1	T							H2Y
A24C2		A						L22L
A24C2			T					T56I
A24C2					A			I76I
A24C2						C		L79F
A24C2							A	M84I
A24C3				T				T72T

		νουκλεοτίδια ORF του γονιδίου E7 του HPV16									
		586	609	612	675	748	754	787	793	814	816
πρότυπη αλληλουχία	C	A	A	A	T	C	A	A	G	C	
δείγματα											αλλαγή αμινοξέος
A38C1			C								P17P
A38C1				T							I38I
A38C1									A		G85S
A38C2										T	G85G
A38C3	T										H9Y
A38C3		T									Q16H
A38C3					A						S63T
A38C3						A					L65I
A38C3							T				I76F
A38C3								G			T78A

Πίνακες 6.2: Συγκεντρωτικοί πίνακες μεταλλάξεων για τις περιοχές E6-E7.

Η πιο σημαντική μετάλλαξη εντοπίστηκε στην περιοχή E6 του ιού HPV 16 για όλους τους κλώνους από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας στη θέση G126C και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή R15P. Είναι πολύ σημαντική μετάλλαξη καθώς δεν έχει αναφερθεί ξανά στην βιβλιογραφία. Πολλές από τις παραπάνω μεταλλάξεις επιβεβαιώνονται και από τη βιβλιογραφία και έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η μετάλλαξη για την περιοχή E6 του ιού HPV 16 T350G για τους κλώνους A13c1, A13c3, A15c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 έχει αναφερθεί ότι προκαλεί την αμινοξική αλλαγή L90V. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη εμπλέκεται στην εξέλιξη από ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τύπου (CIN) 3 σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ICC. Τα HPV 16 variants συμμετέχουν με μεγαλύτερη συχνότητα στην μετατροπή του CIN3 σε ICC (Wu Y et al 2006, Hu X et al 2001). Τα παραπάνω βιβλιογραφικά στοιχεία επιβεβαιώνονται από το γεγονός ότι σύμφωνα με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, τα δείγματα A13, A15 και A38 ήταν όλα CIN3 εκτός του A24 που ήταν CIN1. Δηλαδή επαληθεύεται το γεγονός ότι η μετάλλαξη T350G μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της κακοήθειας. Η ίδια μετάλλαξη βρέθηκε στο 40% των τραχηλικών δειγμάτων που εξετάστηκαν σε μελέτη στην Αυστραλία, συχνότητα η οποία είναι συγκρίσιμη με Ευρωπαϊκά τραχηλικά δείγματα. Ωστόσο η συχνότητα της συγκεκριμένης μετάλλαξης στα δείγματα της Αυστραλίας ήταν 10% μεγαλύτερη σε σχέση με Κινέζικα δείγματα προηγούμενης μελέτης. Η μετάλλαξη T350G ανάλογα με το είδος του πληθυσμού μπορεί να χαρακτηριστεί ως υψηλού ή χαμηλού κινδύνου ή μηδαμινού κινδύνου. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα πιθανώς σχετίζονται με γενετικές διαφορές στους διάφορους πληθυσμούς, συγκεκριμένα με ένα πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου της p53 που δημιουργεί είτε αργινίνη είτε προλίνη. Αυτή η αλλαγή αμινοξέος μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση όσον αφορά τη δέσμευση των διαφόρων στελεχών των E6 πρωτεϊνών (Kylie J. Watts et al 2002).

Η μετάλλαξη για την περιοχή E7 του ιού HPV 16 για τον κλώνο A17c1 (A647G) έχει αναφερθεί ότι προκαλεί την αμινοξική αλλαγή N29S, ενώ έχει αναφερθεί και στην βιβλιογραφία (Wu Y et al 2006).

Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την κλινική εικόνα των ασθενών στους παρακάτω πίνακες:

Περιοχή Ε6			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
ΟΛΟΙ ΟΙ ΚΛΩΝΟΙ	G126C	R15P	Όλοι HG και LG (A17, A24)
A17C1, A24C1, A38C1, A38C2, A38C3	C143G	Q21D	LG (A17, A24) και HG (A38)
A15C1, A15C2, A17C1	G145T	Q21H	LG (A17) και HG (A15)
A24C2, A24C3	A184T	I34I	LG
A15C1, A24C2	G201A	C40Y	LG (A24) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1	T286A	A68A	LG (A17) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1	A289G	V69V	LG (A17) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1	C335T	H85V	LG (A17) HG (A15)
A13C1, A13C3, A15C1, A15C2, A24C1, A24C2, A24C3, A38C1, A38C2, A38C3	T350G	L90V	HG και LG(A24)

Πίνακας 6.3: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή Ε6 ανάλογα με την κλινική εικόνα.

Οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία εκτός από την μετάλλαξη για την περιοχή Ε6 του ιού HPV 16 T350G που εντοπίζεται στους κλώνους A13c1, A13c3, A15c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή L90V. Επίσης αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι παρατηρείται η μετάλλαξη στην θέση G126C σε όλους τους κλώνους (HG και LG) και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή R15P. Η νουκλεοτιδική αυτή αλλαγή δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής στην βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα οι κλώνοι A15C1, A15C2, (HG) και ο κλώνος A17C1 (LG) παρουσιάζουν κοινές μεταλλάξεις στις θέσεις G145T, T286A, A289G, C335T. Ωστόσο θα πρέπει να γίνει η διαδικασία αυτή σε περισσότερα δείγματα έτσι ώστε να μπορεί να γίνει συσχέτιση των μεταλλάξεων που εντοπίσαμε με τον βαθμό της αλλοίωσης High και Low Grade.

Περιοχή E7			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
A15C1, A15C2, A17C1, A24C2	T789C	I76I	Όλοι LG εκτός από τον κλώνο A15 που είναι HG
A15C1, A15C2, A17C1	T795G	T78T	Ο κλώνος A17 είναι LG και ο A15 HG
A17C1, A38C1	G814A	G85S	Ο κλώνος A17 είναι LG και ο A38 HG
A13C2, A13C3	G815A	G85D	HG

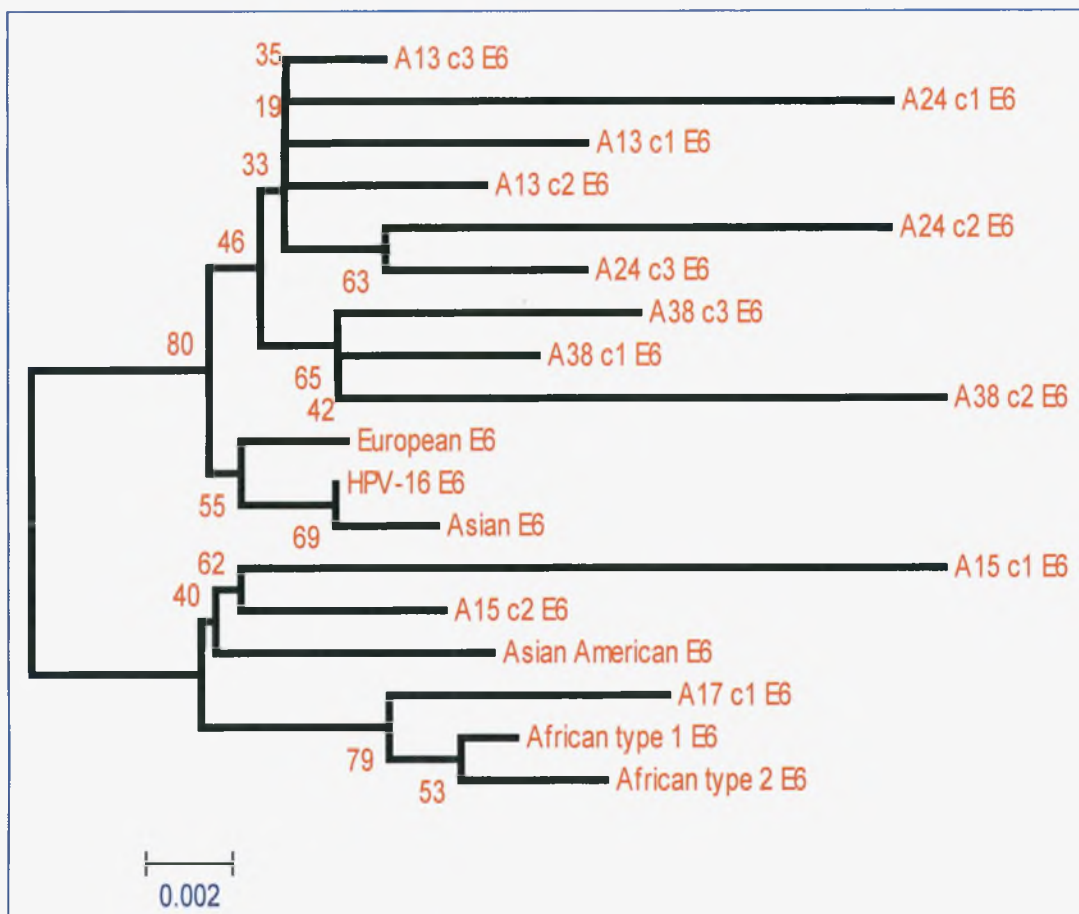
Πίνακας 6.4: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή E7 ανάλογα με την κλινική εικόνα.

Οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία.

6.5 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των κλινικών δειγμάτων

Επίσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση και νουκλεοτιδική στοίχιση των κλινικών δειγμάτων με τις αλληλουχίες των άλλων variants HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (AF1), African type-2 (AF2)] από το GenBank και σχεδιάστηκαν τα εξής φυλογενετικά δένδρα με τη βοήθεια του προγράμματος Mega:

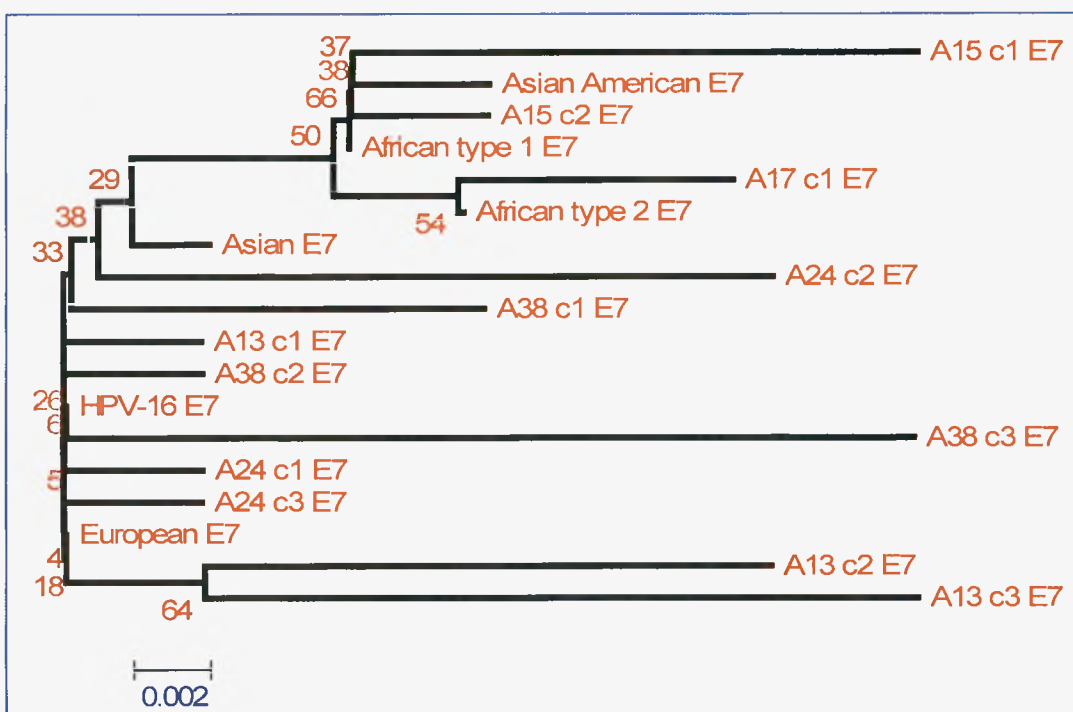
- A) φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A13c1, A13c2, A13c3, A15c1, A15c2, A17c1,A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 και των υπολοίπων variants HPV16 για την E6 περιοχή.



Εικόνα 6.4: Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A13c1, A13c2, A13c3, A15c1, A15c2, A17c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 και των υπολοίπων variants HPV16 για την E6 περιοχή.

Από το συγκεκριμένο φυλογενετικό δένδρο συμπεραίνουμε ότι οι κλώνοι A13c3, A24c1, A13c1, A13c2, A24c2, A24c3, A38c3, A38c1, A38c2 ομαδοποιούνται με το European, οι A15c1, A15c2 ομαδοποιούνται με το Asian American ενώ ο A17c1 ομαδοποιείται με το African type 1.

B) φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A13c1, A13c2, A13c3, A15c1, A15c2, A17c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 και των υπολοίπων variants HPV16 για την E7 περιοχή.



Εικόνα 6.5: Φυλογενετικό δένδρο των κλώνων A13c1, A13c2, A13c3, A15c1, A15c2, A17c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3 και των υπολοίπων variants HPV16 για την E7 περιοχή.

Από το συγκεκριμένο φυλογενετικό δένδρο συμπεραίνουμε ότι ο κλώνος A15c1 ομαδοποιείται με το Asian American, ο A15c2 και ο A17c1 ομαδοποιούνται με το African type 2. Οι κλώνοι A24c2, A38c1, A13c1, A38c2, A38c3, A24c1, A24c3 ομαδοποιούνται με το Asian. Τέλος, οι κλώνοι A13c2 και A13c3 ομαδοποιούνται με το European.

Επίσης από τα δύο φυλογενετικά δέντρα βλέπουμε ότι ο κλώνος A24c2 για την περιοχή E6 ομαδοποιείται με το European variant, ενώ στην περιοχή E7 ομαδοποιείται με το Asian variant. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST για την εύρεση της ομοιότητας του κλώνου A24c2 στις περιοχές E6 και E7 με αλληλουχίες καταχωρημένες στην βάση δεδομένων. Από τα αποτελέσματα είδαμε ότι ο κλώνος A24c2 παρουσιάζει ομοιότητα σε ποσοστό 98% με το European variant και στις 2 γονιδιακές περιοχές E6 και E7 και όχι με το Asian variant.

7. Συζήτηση

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι αποδεδειγμένα η βασική αιτία πρόκλησης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και το 2007 αποτέλεσε τον 2^ο πιο συνηθισμένο καρκίνο στις γυναίκες, παγκοσμίως. Έτσι από τους 200 τύπους HPV, οι 40 προσβάλλουν τη γεννητική οδό και ως εκ τούτου μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση του καρκίνου της μήτρας. Οι HPV που προσβάλλουν τη γεννητική οδό κατατάσσονται σε ομάδες υψηλής, ενδιάμεσης και χαμηλής επικινδυνότητας. Κύριος εκπρόσωπος της ομάδας υψηλής επικινδυνότητας αποτελεί ο ιός HPV16 ο οποίος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Έχει αποδειχτεί ότι τα E6 και E7 ογκογονίδια του ιού HPV16 μπορούν να οδηγήσουν στον μετασχηματισμό του κυττάρου ξενιστή και επομένως στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ως εκ τούτου κρίνεται σημαντική η μελέτη τους για την ανίχνευση μεταλλάξεων, έτσι ώστε να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα σχετικά με την εμφάνιση του καρκίνου της μήτρας. Για το σκοπό αυτό ενισχύθηκαν οι περιοχές των ογκογονιδίων E6-E7 από διάφορα δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων Low και High Grade. Σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητικών μορίων (24-1071 και 21-934) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των E6 και E7 ογκογονιδίων. Σε πολλά δείγματα όπου το σήμα ήταν αδύναμο πραγματοποιήθηκε AutoNested PCR στα ήδη ενισχυμένα προϊόντα από PCR με τα ίδια ζεύγη ως εσωτερικούς εκκινητές. Ωστόσο στα δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας δεν υπήρξαν αποτελέσματα και έτσι βάση των PCR products των δειγμάτων 747, 793, 796 του Νοσοκομείου του Αγίου Σάββα που στάλθηκαν για αλληλούχηση και επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής, σχεδιάστηκαν οι νέοι εκκινητές 41-757. Αυτοί εφαρμόστηκαν σε όλα τα δείγματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την ενίσχυση των E6 και E7 γονιδίων.

Ωστόσο για να διαπιστωθεί αν υπήρχε στα δείγματα ταυτόχρονη μόλυνση από διαφορετικά HPV-16 variants τα προϊόντα ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των HPV-16 variants. Για την υλοποίηση της κλωνοποίησης αρχικά πραγματοποιήθηκε η Autonested GoTaq Flexi PCR τόσο για την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων όσο και για την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης poly(A) μονόκλωνων άκρων. Τα προϊόντα της Autonested GoTaq Flexi PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα

αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και εν συνεχεία ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit.

Η μοριακή κλωνοποίηση που ακολούθησε ήταν εξέχουσας σημασίας για την συγκεκριμένη εργασία διότι βοήθησε στην δημιουργία μεμονωμένων κλώνων ο καθένας από τους οποίους περιέχει το γενωμικό τμήμα από ένα μόνο διακριτό στέλεχος. Επιτυχής κλωνοποίηση έγινε στα δείγματα 747, 793, 796 και για τα καθένα από τα δείγματα A13, A15, A17, A24, A38 προέκυψαν από 1 έως 3 κλώνοι. Οι κλώνοι που προέκυψαν καθώς και οι αλληλουχίες των διαφορετικών HPV-16 variants επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής MEGA και έτσι αποκαλύφθηκαν σημαντικές μεταλλάξεις σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για τις περιοχές E6 και E7.

Η πιο σημαντική μετάλλαξη εντοπίστηκε στην περιοχή E6 του ιού HPV 16 για όλους τους κλώνους από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας στη θέση G126C και προκαλεί την αμινοξική αλλαγή R15P. Είναι πολύ σημαντική μετάλλαξη καθώς δεν έχει αναφερθεί ξανά στην βιβλιογραφία. Όσον αφορά στην περιοχή E6 του ιού HPV 16 η μετάλλαξη στην θέση T350G η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλαγή του αμινοξέος L90V εμφανίστηκε με μεγάλη συχνότητα στα δείγματα ενώ έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά. Συγκεκριμένα υπάρχει στους κλώνους A13c1, A13c3, A15c1, A24c1, A24c2, A24c3, A38c1, A38c2, A38c3. Η ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης έχει συνδεθεί με την μετάβαση από ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τύπου CIN3 σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ICC. Μάλιστα αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι πολλά από τα δείγματα στα οποία εμφανίστηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη (A13, A15 και A38) οι αλλοιώσεις ήταν τύπου CIN3. Σχετικά με την περιοχή E7 του ιού HPV 16 η μετάλλαξη C749T για τον κλώνο A17c1 (A647G) οδήγησε στην αμινοξική αλλαγή N29S.

Μετά την ολοκλήρωση της μοριακής κλωνοποίησης ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με σκοπό την ταυτοποίηση των HPV-16 variants σε κάθε δείγμα που εξετάστηκε. Διαπιστώθηκε ότι για την περιοχή E6 τα δείγματα A13c3, A24c1, A13c1, A13c2, A24c2, A24c3, A38c3, A38c1, A38c2 ομαδοποιούνται με το European, τα A15c1, A15c2 ομαδοποιούνται με το Asian American ενώ το A17c1 ομαδοποιείται με το African type 1. Για την περιοχή E7 τα δείγματα A13c2 και A13c3 ομαδοποιούνται με το European, το A15c1 ομαδοποιείται με το Asian

American, το A15c2 ομαδοποιείται με το African type 1, το A17c1 ομαδοποιείται με το African type 2 και τέλος τα δείγματα A24c2, A38c1, A13c1, A38c2, A38c3, A24c1, A24c3 ομαδοποιούνται με το Asian.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν οι περιοχές E6 και E7 με σκοπό την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα δείγματα και στα HPV-16 variants. Επίσης κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα έτσι ώστε να βρεθεί με πιο HPV-16 variant ομαδοποιείται ο κάθε κλώνος. Μια μελλοντική ερευνητική προοπτική θα αποτελέσει η εξέταση ακόμα περισσότερων δειγμάτων για την ανίχνευση μεταλλάξεων, πιθανώς και για διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του HPV-16, με σκοπό τη συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με την πρόοδο των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων καθώς και με την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον, η περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων θα οδηγήσει στην ομοδοποίηση τους με τα HPV-16 variants με αποτέλεσμα την καλύτερη μελέτη τους. Έτσι η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με περαιτέρω βιβλιογραφικά στοιχεία μπορεί να αποκαλύψει την ογκογόνο δράση του HPV-16 ιού και να ωθήσει την ερευνητική δραστηριότητα με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε μοριακό επίπεδο.

8. Βιβλιογραφία

1. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, et al. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 2003;84:1881–6.
2. Antonsson A, McMillan NA 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol*. 87(Pt 11):3195-200.
3. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805–809.
4. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley P. M., 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61: 962-971.
5. Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R 1991. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol.* 12):6671-6.
6. Bedell, M. A., K. H. Jones, S. R. Grossman, and L. A. Laimins. 1989. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 63:1247–1255.
7. Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 8:1277-1286. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.
8. 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.
9. Bossis I, Roden RB, Gambhira R, et al. Meneses. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol* 2005;79:6723-6731.
 10. Bousarghin L, Touze A, Combita-Rojas AL, et al. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J Gen Virol* 2003;84:157-164 Bouwes Bavinck JN, Feltkamp MC. Milk of human kindness?—HAMLET, human papillomavirus, and warts. *N Engl J Med* 2004;350:2639-42.
 11. Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly *Virol J.* 4: 3.
 12. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7.
 13. C.E. Davy, D.J. Jackson, K. Raj, W.L. Peh, S.A. Southern, P. Das, R. Sorathia, P. Laskey, K. Middleton, T. Nakahara, Q. Wang, P.J. Masterson, P.F. Lambert, S. Cuthill, J.B. Millar and J. Doorbar, Human Papillomavirus Type 16 E1^{E4}- Induced G2 Arrest Is Associated with Cytoplasmic Retention of Active Cdk1/Cyclin B1 Complexes, *J Virol* 79 (2005), 3998-4011.
 14. C.E. Davy, M. Ayub, D.J. Jackson, P. Das, P. McIntosh and J. Doorbar, HPV16 E1^{E4} protein is phosphorylated by Cdk2/cyclin A and relocalizes this complex to the cytoplasm, *Virology* (2006).
 15. Chang, Y. E., and L. A. Laimins. 2000. Microarray analysis identifies interferon- inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 74:4174-4182.
 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 EY, Howley PM, Levinson AD, et al. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529–34.
18. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* 1907;48:12β€“17.
19. Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. and Wang, T. S. (1999) Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J. Biol. Chem.* 274, 2696–2705
 Christopher B. Buck, Naiqian Cheng, Cynthia D. Thompson, Douglas R. Lowy, Alasdair C. Steven, John T. Schiller, and Benes L. Trus 2008. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid.
20. Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67:6170–6178.
21. Danos O, Katinka M, Yaniv M 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*;1:231–236
22. Danos O, Engel LW, Chen EY, et al. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol* 1983;46:557–66. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *Embo J* 1982;1:231–6.
23. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol.* (1):142-50.
24. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1β€“11.

25. Day PM, Baker CC, Lowy DR, et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14252–14257.
26. de Boer, M. A., Peters, L. A. W., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S., Kolkman-Uljee, S. & Fleuren, G. J. (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* 94, 488–494.
27. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hauzen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17-27.
28. Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934–937
29. Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71:9343–9349.
30. 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
31. Dixon, E. P., G. L. Pahel, W. J. Rocque, J. A. Barnes, D. C. Lobe, M. H. Hanlon, K. A. Alexander, S. F. Chao, K. Lindley, and W. C. Phelps. 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270:345–357.
32. Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824–827.
33. Doorbar J 2006 Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541).

34. 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.
35. Edmonds, C., and K. H. Vousden. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 63:2650–2656. Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. Stenlund, and L. Joshua-Tor. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol. Cell* 6:149–158.
36. Evander M, Frazer IH, Payne E, et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449–2456.
37. Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, et al. Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol* 2006;44:4479–85.
38. Fehrman, 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.
39. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* (8):4818-26
40. 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.
41. Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid, and D. A. Galloway. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68:5698–5705.
42. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12398–12402.

43. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799–804.
44. Freeman H, Wingrove B. Excess Cervical Cancer Mortality:A Marker for Low Access to Health Care in Poor Communities. NIH Pub. No. 05-5282. Rockville, MD: National Cancer Institute, Center to Reduce Cancer HealthDisparities, 2005.
45. Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090-2100.
46. Gilbert DM, Cohen SN. Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* 1987;50:59–68.
47. 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.
48. Han, Y., Loo, Y. M., Militello, K. T. and Melendy, T.(1999) Interactions of the papovavirus DNA replicationinitiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication.
49. Harris, S. F., and M. R. Botchan. 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284:1673–1677.
50. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*(12):3905-10.
51. 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.

52. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2550–6.
53. Ho, L., Chan, S.-Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S.-K., Villa, L. L. & Bernard, H.-U. (1991). Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 29, 1765–1772. Howley, P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication, p.947–978. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
54. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:2299–354.
55. Hubbert, N. L., S. A. Sedman, and J. T. Schiller. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 66:6237–6241.
56. Hughes, F. J., and M. A. Romanos. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 21:5817–5823.
57. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10:4129–4135.
58. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13:775–784.
59. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1995;64:1–378
60. 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.

61. Hu X, Pang T, Guo Z, Ponten J, Nister M, Bernard Afink G 2001. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. *J pathol.* 195(3):307-11.
62. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999;274:5810β€“5822.
63. Kamper N, Day PM, Nowak T, et al. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 2006;80:759β€“768.
64. Kesis, T. D., R. J. Slebos, W. G. Nelson, M. B. Kastan, B. S. Plunkett, S. M. Han, A. T. Lorincz, L. Hedrick, and K. R. Cho. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3988–3992.
65. Kimbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12180-12184.
66. Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82
67. Ko, L., and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10: 1054–1072.
68. Krebs H. Premalignant lesions of the cervix. In: Copeland L,ed. *Textbook of Gynecology*. Philadelphia: WB Saunders 1994:959–87.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. 48(2): 340–351.
69. Kurman R, Solomon D. *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses*. New York: Springer-Verlag, 1994.

70. Kylie J. Watts, Carol H. Thompson, Yvonne E. Cossart, Barbara R. Rose 2002. Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolate from Australia and New Calendonia. *Int J. Cancer.* 97, 868-874.
71. Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Itoh, M. Yutsudo, H. Ariga, and M. Inoue. 2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28:669-677
72. 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.
73. Lancaster WD, Olson C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev* 1982;46:191–207.
74. Lechner, M. S., and L. A. Laimins. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 68:4262–4273.
75. 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.
76. Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 273:30704–30712.
77. Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091–2104.
78. Loo, Y. M. and Melendy, T. (2004) Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* 78,1605–1615.
79. Lowy DR. History of papillomavirus research. In: Garcea R,DimMaio D, eds. *The Papillomaviruses*. New York: Springer,2007:13–28.

80. Lu, J. Z., Y. N. Sun, R. C. Rose, W. Bonne, and D. J. McCance. 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J. Virol.* 67:7131–7139.
81. Luxton J, Shepherd P, 2001. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition.
82. Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:382–387.
83. Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1:194–202.
84. Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. and Romanos, M. A. (1998) A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. *J. Virol.* 72, 7407–7419 Michelle S. Longworth and Laimonis A. Laimins, 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 362–372.
85. Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber, and R. A. Weinberg. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785–795.
86. Muller, F., T. Giroglou, and M. Sapp. 1997. Characterization of the DNA binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J. Gen. Virol.* 78:911–915.
87. Munger, K., W. C. Phelps, V. Bub, P. M. Howley, and R. Schlegel. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are

- necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4417–4421.
88. 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.
 89. Park RB, Androphy EJ. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* 2002;76:11359–11364.
 90. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
 91. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, et al. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis* 2007;196:1128–36.
 92. Peter M. Howley, Douglas R. Lowy, *Fields of virology*, 5th edition, 2007. Table of Contents > Volume II > Section II - Specific Virus Families > Papillomaviridae > 62 – Papillomaviruses.
 93. Pfister, H. 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 52–56.
 94. Pim, D., A. Storey, M. Thomas, P. Massimi, and L. Banks. 1994. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 9:1869–1876.
 95. Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the world wide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18–29.
 96. Remm, M., A. Remm, and M. Ustav. 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J. Virol.* 73:3062–3070.

97. Reznikoff CA, Belair C, Savelieva E, et al. Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV-16 E7-, but not E6-immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev* 1994;8:2227-2240.
98. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969;105: 386-93.
99. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, et al. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1522-1527.
100. Riley, R. R., S. Duensing, T. Brake, K. Munger, P. F. Lambert, and J. M. Arbeit. 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 63:4862-4871.
101. 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.
102. Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum Pathol* 2004;35:971-82.
103. Rodriguez, M. I., M. E. Finbow, and A. Alonso. 2000. Binding of human VOL. 68, 2004 HPV PATHOGENESIS IN DIFFERENTIATING EPITHELIA 371 papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H₊-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19:3727-3732.
104. Scheffner, M., J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 1994. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8797-8801.
105. Schneider-Gadicke, A., and E. Schwarz. 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5:2285-2292.

106. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, et al. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991;65:4860-4866.
107. Sedman, J., and A. Stenlund. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72:6893-6897.
108. Seedorf, K., Kra"mmer, G., Du"rst, M., Suhai, S. & Ro"wekamp, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145, 181-185.
109. Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusk, and J. Hurwitz. 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:702-706.
110. Shafit-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 2003;77:13125-13135.
111. 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.
112. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med* 1933;58:607-624.
113. Smotkin D and F O Wettstein 1986 Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(13): 4680-4684.
114. Steger, G., and S. Corbach. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 71:50-58.
115. Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts

- and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67:4521–4532.
116. Straight, S. W., B. Herman, and D. J. McCance. 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69:3185–3192.
 117. Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216:219–222.
 118. Sundberg JP. Papillomavirus infections in animals. In: Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG, eds. *Papillomaviruses and Human Disease*. Berlin: Springer-Verlag, 1987
 119. Suzich, J. A., S. J. Ghim, F. J. Palmer-Hill, W. I. White, J. K. Tamura, J. A. Bell, J. A. Newsome, A. B. Jenson, and R. Schlegel. 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11553–11557.
 120. Talia Hoory, Archana Monie, Patti Gravitt, T.-C Wu, 2008. Molecular Epicemiology of Human Papillomaviruses. *Formos Med Assoc*, 107 (3): 198-217.
 121. The Papillomavirus, 2007 Mariet C.W. Feltkampa, □, Maurits N.C. de Koningb, Jan Nico Bouwes Bavinckc, Jan ter Schegget, 2008. Betapapillomaviruses: Innocent bystanders or causes of skin cancer. *Journal of Clinical Virology* 43, 353–360.
 122. Thomas MC, Chiang CM. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell* 2005;17:251β€“264.
 123. Thompson, D. A., G. Belinsky, T. H. Chang, D. L. Jones, R. Schlegel, and K. Munger. 1997. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 15:3025–3035.

124. Van G. Wilson, Michael West, Kelly Woutek, Dandapani Rangasamy, 2002. Pappilomavirus E1 Proteins, Form, Function and Features. *Virus Geness* 24:3, 275-290.
125. Veldman, T., X. Liu, H. Yuan, and R. Schlegel. 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8211–8216.
126. Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749
127. Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V. 1995. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A*.(9):3687-91
128. Weintraub, S. J., K. N. Chow, R. X. Luo, S. H. Zhang, S. He, and D. C. Dean. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 375: 812–815.
129. White A, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994;8:666β€“677.
130. Wright TJ, Kurman R, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman R, ed. *Blaustein’s Pathology of the Female Genital Tract*. New York: Springer-Verlag, 1994:229–77.
131. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol.* 87(Pt 5):1181-8.
132. Y Modis, Trus BL, Harrison SC 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* (18):4754-62.

133. Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X. & Wheeler, C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71, 2463–2472.
134. Yang, L., I. Mohr, E. Fouts, D. A. Lim, M. Nohaile, and M. Botchan. 1993. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5086–5090.
135. 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.
136. Yang BH, Bray FI, Parkin DM, et al. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer* 2004;109:418–24.
137. Yang YJ, Zhao J, Liao QP 2007. Association between human papillomavirus (HPV) type 16 infection and E6/E7 gene variant and the cervical lesions in Beijing. 2007 *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuanq Bing Du Xue Za Zhi.* 21(1):32-4.
138. Yoshioka, N., H. Inoue, K. Nakanishi, K. Oka, M. Yutsudo, A. Yamashita, A. Hakura, and H. Nojima. 2000. Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K- ras. *J. Virol.* 74:1008–1013.
139. Yuping Wu, Yulong Chen, Longyu Li, Guifang Yu, Ying He and Yanling Zhang (2006). Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *Journal of General Virology* (2006), 87, 1181–1188.
140. Zhang B, Li P, Wang E, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 2003;310:100–108.

141. Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation Front Biosci. 11: 2286–2302.
142. Zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta.1288(2):F55-78.
143. Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2:342–350.

