

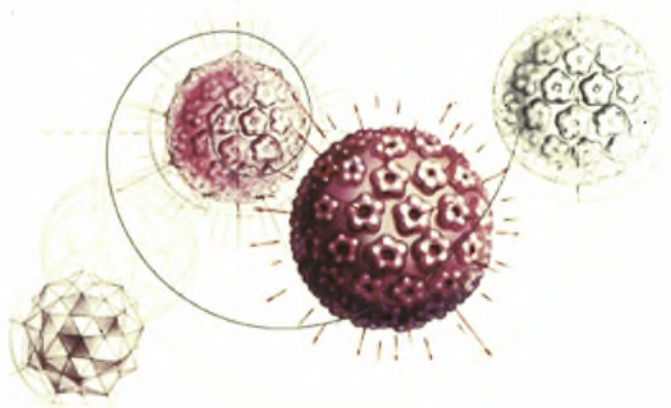
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας»**

**« ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

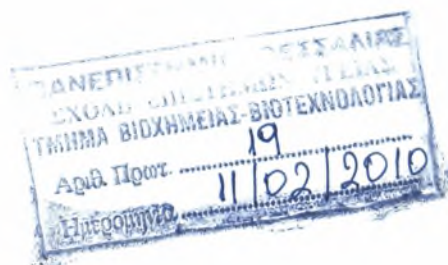
ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

**Μελέτη της ενσωμάτωσης του γονιδιώματος κλινικών στελεχών
HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα του ξενιστή. Αποτελεί η
ενσωμάτωση κατάλληλο μοριακό δείκτη νεοπλασίας;**



Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

2010



**Μελέτη της ενσωμάτωσης του γονιδιώματος κλινικών στελεχών
HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα του ξενιστή. Αποτελεί η
ενσωμάτωση κατάλληλο μοριακό δείκτη νεοπλασίας;**



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

Αριθ. Εισ.: 8127/1
Ημερ. Εισ.: 13-04-2010
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
579.244 5
ΤΣΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087114

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Π.Μαρκουλάτος: Καθηγητής-Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Ζ.Μαμούρης: Καθηγητής-Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Δ. Μόσιαλος: Λέκτορας-Βιοτεχνολογίας Μικροβίων.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
1. Βιολογία των Human Papilloma Virus (HPV)	9
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.2 Ταξινόμηση των Papillomavirus	10
1.2.1 Alpha –papillomavirus	12
1.2.2 Beta – papillomavirus	13
1.2.3 Gamma, Mu, Nu, papillomavirus	13
2. Δομή του Human Papilloma virus	14
2.1 Δομή καψιδίου	14
2.2 Οργάνωση γενώματος	16
2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1	17
2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2	18
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4	19
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5	20
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6	21
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7	22
2.3 Μορφή του γενώματος	25
3. Ο κύκλος ζωής των HPV	27
3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο	27
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος	28
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος	29
3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	30
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις	32
4. Κλινικές εκδηλώσεις	33
4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV	35
5. Υλικά και Μέθοδοι	36
5.1 Κλινικά δείγματα	36
5.2 Απομόνωση DNA και RNA	36
5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης	37
5.4 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του E2 γονιδίου	38

5.5 PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου	39
5.6 APOT assay	41
5.6.1 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	42
5.6.2 PCR	42
5.6.3 Nested PCR	43
5.6.4 Απομόνωση των PCR προϊόντων από gel αγαρόζης	44
5.6.5 PCR για την ανίχνευση τμημάτων των E4 και E7 γονιδίων	44
6 Αποτελέσματα	46
6.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης	46
6.2 PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου	47
6.3 Αποτελέσματα APOT	49
6.4 Αποτελέσματα ενίσχυσης των τμημάτων E7 και E4	51
7. Συζήτηση	54
8. Βιβλιογραφία	57

Πρόλογος

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση και την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας με θέμα “Μελέτη της ενσωμάτωσης του γονιδιώματος κλινικών στελεχών HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα του ξενιστή. Αποτελεί η ενσωμάτωση κατάλληλο μοριακό δείκτη νεοπλασίας;”. Κυρίως θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο, αλλά κυρίως για την υπομονή και τις γνώσεις που μου παρέχει καθημερινά. Επίπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ γιατί μου έδωσε την δυνατότητα να συνεχίσω το θέμα αυτό σε διδακτορικό επίπεδο δίνοντας μου την ευκαιρία να εισαχθώ στο χώρο της έρευνας και της επιστήμης και να πραγματοποιήσω έναν από τους στόχους μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Πλιάκα Βάια Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ρούτερ Ειρήνη για την συνεργασία τους στο εργαστήριο. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές καθώς επίσης τον φοιτητή Ιπποκράτη Πατάκο για την συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε όλο αυτό το χρονικό διάστημα στο εργαστήριο και την Αντωνία Θεοχαροπούλου για την συμβολή της στην συντέλεση τμήματος της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Ιωάννα και Κωνσταντίνο για την ηθική και οικονομική στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια και για τις αμέτρητες θυσίες που έχουν κάνει και συνεχίζουν να κάνουν για να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) είναι μια ομάδα επιθηλιοτροπικών DNA ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα που προκαλούν αλλοιώσεις στο επιθήλιο του δέρματος (θηλώματα) και στο επιθήλιο του βλεννογόνου (κονδυλώματα). Μολύνουν μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα πτηνά μέχρι τα θαλάσσια θηλαστικά. Ο ιός των θηλωμάτων απέκτησε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον όταν διαπιστώθηκε ότι προκαλεί μια σειρά δερματικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο.

Ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV) μεταδίδεται μέσω δερματικής επαφής, έχει παγκόσμια κατανομή και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα από καλοήθειες και κακοήθειες αλλοιώσεις στον άνθρωπο. Οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές. Έχουν πλήρως αναγνωριστεί περισσότεροι από 130 τύποι του ιού, ορισμένοι από τους οποίους ευθύνονται για την πρόκληση δερματικών κονδυλωμάτων, κυρίως των παλαμών και των πελμάτων. Το ένα τρίτο των τύπων του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και αναπτύσσεται στη γεννητική περιοχή των ατόμων. Με βάση το γεγονός ότι προκαλούν μια σειρά αλλοιώσεων στον άνθρωπο και κυρίως στην ανάπτυξη καρκίνου έχει δοθεί ιδιαίτερη ιατρική σημασία και μια εκτεταμένη προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίων.

Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει σαφώς ότι διάφοροι τύποι των HPV (HPV-υψηλού κινδύνου) αποτελούν βασική αιτία πρόκλησης καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας, ενώ ορισμένοι άλλοι τύποι HPV (HPV- χαμηλού κινδύνου) προκαλούν κοινά κονδυλώματα του γενετικού συστήματος. Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά παραμένουν αρκετά υψηλά.

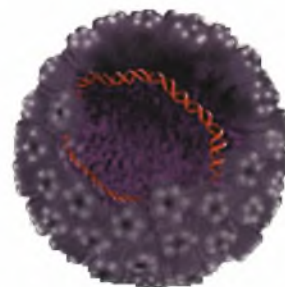
Πέρα από την δημιουργία κυτταρολογικών και μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση HPV στελεχών που προσβάλουν το γενετικό σύστημα, αποτελεί μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον η ανάπτυξη μεθόδων για τον εντοπισμό μοριακών δεικτών. Δείκτες οι οποίοι θα μπορούν να προβλέπουν σε πρώιμα στάδια της μόλυνσης, την εξέλιξη του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και την μεταβολή της αλλοίωσης σε καρκίνο. Η ανίχνευση της ενσωμάτωσης HPV τύπων υψηλής επικινδυνότητας στο κυτταρικό γονιδίωμα, καθώς επίσης και ο εντοπισμός της ακριβής θέσης ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα μπορεί να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον και αξιόπιστο μοριακό δείκτη με βασικό στόχο την πρόβλεψη της δημιουργίας τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και κυρίως την ανέλιξη της δυσπλασίας σε καρκίνο.

Για τον λόγο αυτό στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της κατάστασης του γονιδιώματος κλινικών στελεχών HPV-16 (ενσωματωμένη, υπό την μορφή επισώματος ή και οι δυο μορφές ταυτόχρονα). Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η ακεραιότητα του γονιδίου E2 το οποίο αποτελεί την συνηθέστερη θέση ρήξης και ενσωμάτωσης του ιϊκού DNA. Η μελέτη του γονιδίου E2 πραγματοποιήθηκε με την χρήση εκκινητικών μορίων, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Οι εκκινητές που κατασκευάστηκαν ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο καθώς επίσης και τα επιμέρους τμήματά του έτσι ώστε να εντοπιστεί η ακριβής θέση ρήξης εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή APOT assay, η οποία επιτρέπει την διάκριση των ιϊκών mRNAs, προερχόμενα από ενσωματωμένα ή επισωματικά ιϊκά μετάγραφα. Με την μέθοδο αυτή δίνεται η δυνατότητα να προσδιορίσουμε από ιϊκά μετάγραφα την μορφή του γονιδιώματος του ιού και από την αλληλουχία των μεταγράφων μπορούμε να προσδιορίσουμε πιο ιϊκό γονίδιο έχει υποστεί ρήξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από το γονίδιο E2, έχει παρατηρηθεί και σε μικρότερο ποσοστό ρήξη στα γονίδια E1 και E4. Τέλος από τις κυτταρικές αλληλουχίες που συμπεριλαμβάνονται στα μετάγραφα είναι δυνατός ο εντοπισμός της ακριβής θέσης ενσωμάτωσης του ιού στο χρωμόσωμα.

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. Προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη μιας σειράς βλαβών, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο του πέους (Zur Hausen 1996).



Εικόνα 1.1: Human Papilloma Virus (HPV)

Ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων με την βοήθεια ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήθη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε διάφοροι τύποι της ομάδας αυτής των ιών εντοπίστηκαν και συνδέθηκαν με την δημιουργία όγκων σε πολλά είδη μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 όταν ο Harald zur Hausen το 1983 απομόνωσε τον πρώτο HPV-16 σε γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα ανακαλύφθηκε, ότι συγκεκριμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papilloma Viruses) συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin et al 2000)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 100

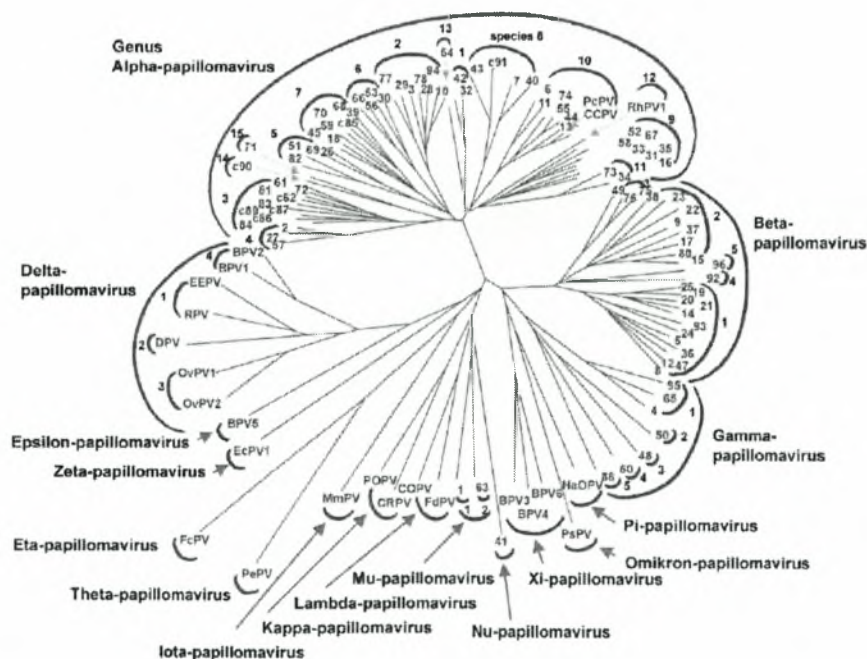
διαφορετικοί τύποι HPV, ενώ περισσότεροι από 120 θεωρητικά καινούργιοι τύποι έχουν εν μέρει χαρακτηριστεί (Zur Hausen 2000). Μια ομάδα 30 στελεχών του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλει το ουρογεννητικό σύστημα. (Gillison 2001). Οι HPV βάση του τροπισμού τους μπορούν να διαχωριστούν σε δερματικούς και στους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί HPV τύποι προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου προκαλούν αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας, στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα, τον οισοφάγο και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον οι HPV της τελευταίας αυτής τάξης ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες. Στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση 'επεκτατικού' καρκίνου συνήθως του ουρογεννητικού συστήματος. Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk) τα μέλη της οποίας εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο αλλά είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz N. et al 2003). Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV επίσης σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους papilloma ιούς στους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου

1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά ομαδοποιήθηκαν μαζί με τους polyomaviruses και τον SV40 στην μεγάλη οικογένεια των Papovaviridae. Η ομαδοποίηση αυτή βασίστηκε στην ομοιότητα του καψιδίου των παραπάνω ιών, στην έλλειψη περιβλήματος καθώς επίσης στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA (Danos O et al 1989). Πρόσφατα όμως από την διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) έγινε αποδεκτό ότι οι ιοί των θηλωμάτων-papillomaviruses αποτελούν μια ξεχωριστή ταξινομική οικογένεια ιών των Papillomaviridae, η οποία δεν σχετίζεται καθόλου με τους polyomavirus και τον SV40. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε βάση της διαφοράς της οργάνωσης, του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των

papillomaviruses και των μελών της οικογένειας Papovaviridae (de villiers E.M et al 2004).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ικών τύπων γίνεται, βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al 1995). Οι papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Έτσι έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον κατά 10% ενώ μεταξύ υπότυπων και variants 2% -10% και 2% αντίστοιχα (de villiers E.M et al 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 1.2 περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Charles E. et al 2007, A.Antonson et al 2006)



Εικόνα 1.2: 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

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Το γένος των Alpha-papillomaviruses επίσης συμπεριλαμβάνει και τους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV όπως έχει αναφερθεί ταξινομούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (High risk). Ο HPV -16 και ο HPV-18 είναι οι κύριοι παράγοντες για την πρόκληση τραχηλικών αλλοιώσεων, που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου ανευρίσκεται DNA από HPV και περίπου σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του HPV-16 (Bosch et al 2001). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται, ως ενδιάμεσου κινδύνου (Mediate risk) και χαμηλού κινδύνου (Low risk), βάση της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί χαμηλού κινδύνου εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου πολύ σπάνια, άλλα ερευνητικά και διαγνωστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος. (Doorbar. J 2006).

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

Πίνακας 1.1. Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

1.2.2 Beta-papillomavirus

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

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

1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

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

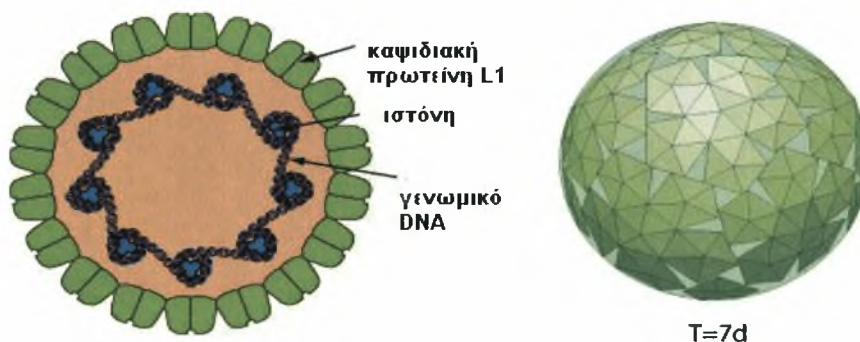
Γένος	Στέλεχος
Beta papillomavirus	HPV-2, 5, 8, 107
Gamma Papillomavirus	HPV-101, 103
Mu Papillomavirus	HPV-1, 63
Nu Papillomavirus	HPV-41

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

2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)

2.1 Δομή καψιδίου

Οι papilloma ιοί είναι μια ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών μεγέθους 7900 bp. Δεν περιλαμβάνουν εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο της τάξης των 50-60 nm (Zhi-Ming Zheng et al. 2006). Το ικό σωματίδιο στην εξωτερική του επιφάνεια αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1, σχηματίζοντας εικοσαεδρικά καψίδια με triangulation number $T=7$ (Baker et al 1991). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ικών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Yang R et al 2004). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της L1 και έχει άγνωστο δομικό ρόλο. Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της, με την L1 πρωτεΐνη. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 (Finnen R.L et al 2003). Βασική της λειτουργία είναι η συμβολή της μαζί με την ική πρωτεΐνη E2 στο πακετάρισμα του ικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ικά καψίδια (Buck C.B et al 2004). Οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γένωμα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA "μίνι-χρωμόσωμα" εντός του καψιδίου L1/L2. (Howley 1996).

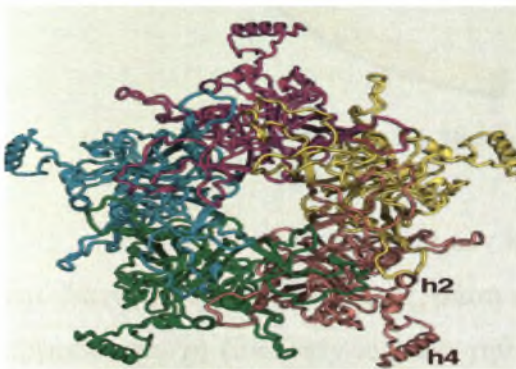


Εικόνα 2.1: $T=7$ HPV-16, αλληλεπίδραση ικού DNA με ιστόνες (Swiss institute of Bioinformatics).

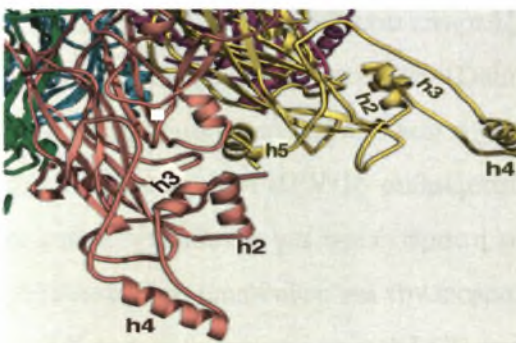
Η κατασκευή του $T=7$ papilloma ικού σωματιδίου δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Παρόλα αυτά, έχει διαπιστωθεί ότι η κρυσταλλική δομή της μικρότερης δομικής μονάδας, $T=1$ περιέχει δώδεκα L1 πενταμερή (Modis Y. et al 2002).

Η υψηλή ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της $T=1$ δομής αποκαλύπτει την L1 πενταμερή διαμόρφωση καθώς επίσης και την αλληλεπίδραση μεταξύ των πενταμερών, που αποτελεί βασική αρχή για την δημιουργία της $T=1$ δομής. Το L1 πενταμερές περιέχει πέντε θηλιές που μοιάζουν με παινές προεξοχές, οι οποίες αποτελούνται από 100 C-τελικά άκρα. (εικόνα 2.3). Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μια α -έλικα, η οποία είναι 'αγκιστρωμένη' στον δομικό πυρήνα του L1 πενταμερούς δια μέσου δύο ελίκων, την έλικα 2 και την έλικα 3, (εικόνα 2.4).

Τα πενταμερή είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς μεταξύ της έλικας 4 του ενός πενταμερούς με την έλικα 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της L1 για να σχηματίσουν την έλικα 5 (εικόνα 2.5) (Brooke Bishop et al 2007).



Εικόνα 2.3. Όψη ενός L1 πενταμερούς. Απεικονίζονται οι πλευρικές προεξοχές από κάθε ένα από τα πέντε μονομερή (το κάθε ένα με διαφορετικό χρώμα) (Brooke Bishop et al 2007)



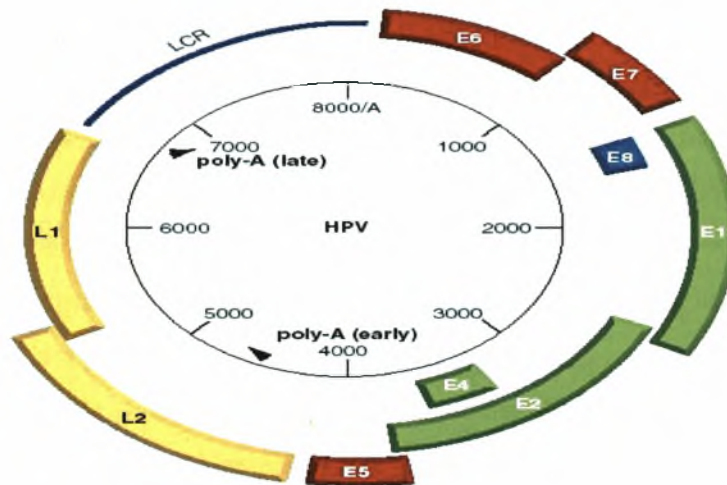
Εικόνα 2.4: Πιο κοντινή όψη των πλευρικών προεξοχών δύο μονομερών δείχνοντας την ακριβή θέση των ελίκων- 2, 3, 4, 5, και του C-τελικού άκρου της L1 (Brooke Bishop et al 2007).



Εικόνα 2.5: Η δια-πενταμερής έλικα-έλικα αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πενταμερών στο $T=1$. Η έλικα 4 του ενός πενταμερούς (κίτρινο) αλληλεπιδρά με την έλικα 2 και 4 άλλου πενταμερούς. (Brooke Bishop et al 2007).

2.2 Οργάνωση του γενώματος

Το γονιδίωμα των papilloma ιών, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.6 περιλαμβάνει 6 μη δομικά ικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια L1, L2 (Zhi-Ming Zheng et al 2006).



εικόνα 2.6: Παρουσίαση του γενώματος του HPV-16

Το γένωμα των papilloma ιών περιέχει οχτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF's) και διαχωρίζεται σε τρεις τομείς, βάση των λειτουργικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E= Early region), την όψιμη περιοχή (L=late region) και την ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos O et al 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο, τις L1 και L2. Η έκφραση του γενώματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Τον p97 υποκινητή που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (Smotkin et al 1986) και τον p670 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K et al 1996).

Τέλος η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6. Ακόμη η LCR περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιικού DNA (Demeret et al 1995, Shyh-Han Tan et al 2002).

2.2.1 Η υκή πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος. (Ustav and Stenlund, 1991). Παρουσιάζει μια εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού (Masky et al 1997, Clertant P 1984). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστικότητα ελικάσης, ATPάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

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

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

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



Εικόνα 2.7: Τριτοταγής δομή E1 πρωτεΐνης (www.pdb.com)

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

2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDa, δρα σαν διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιικού DNA (Laimins et al 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: C-τελική περιοχή, η οποία κωδικοποιεί και σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελιού που προσδένεται στο DNA (Hegde et al 1992). Μια περιοχή- αρμός (hinge region), και την N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μια α-έλικα (Anston et al 2000). Η N-τελική και η C-τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPV, ενώ η hinge περιοχή δείχνει μεγαλύτερη ετερογένεια (Francis et al 2000).



Εικόνα 2.8: E2 πρωτεΐνη. 1-200 N-τελική περιοχή, 200-285 hinge περιοχή, 285-365 C-τελική περιοχή

Η E2 πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης επιδρά στην ρύθμιση μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al 1987). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (Bouvard V. et al. 1994). Οι περιοχές αυτές είναι εντός της περιοχής LCR του HPV-16 και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin et al 1986). Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο TATA Box ακριβώς ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni et al 1991, Tan et al 1992). Οι άλλες δύο

θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham et al 1994).

Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται σε θέσεις που τοποθετούνται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger and Corbach, 1997). Όταν η συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή καταλαμβάνονται και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7. (Romanczuk et al 1990, Steger and Corbach 1997). Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 (Bechtold et al 2003).



Εικόνα 2.8: Ρυθμιστική περιοχή LCR. Αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη E2

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

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

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

Η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και την C-τελική περιοχή (Roberts et al 1994). Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1^{E4} αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του (Roberts et al 1994).

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

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

2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη που η λειτουργία της δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στην συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et al 1993). Στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών, η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et al 1986). Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με την ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών (BVP) και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al 1993).

Η E5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV-31 έχει αποδειχθεί ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα καθώς επίσης και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrmman et al 2003). Πιο συγκεκριμένα όμως η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας

ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores E.R et al 2000). Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al 2005).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη των ιών υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας αποτελείται περίπου από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι συντηρημένο μεταξύ των HPV και αποτελεί σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού (Cole and Danos, 1987). Η E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει την δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη αυτή από μόνη της είναι δυνατόν να μετασχηματίζει NIH3T3 κύτταρα και να δημιουργήσει αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα (Band et al 1991, Wazer et al 1995). Από μόνη της όμως η E6 δεν είναι ικανή να μετασχηματίζει κερατινοκύτταρα . Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7. (Hawley-Nelson et al. 1989).

Μια βασική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με την p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας καταστολέας όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης p21 (Ko L. and C. Prives. 1996). Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, όπως βλάβη στο DNA η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S.E et al 2005). Όσον αφορά την σύνδεση του μονοπατιού αυτού με τον HPV έχει διαπιστωθεί, ότι η E6 προσδένεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6AP (Huibregtse et al 1991). Ο σχηματισμός αυτός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουτινίωση της p53 και την αποδόμησή της στο 26 S πρωτεάσωμα. Ακόμη η E6 μπορεί να αναστείλει την δράση της p53 έμμεσα μέσω σύνδεσης της με την p300/CBP, που είναι συνενεργοποιητής της p53 (Huibregtse et al 1991).

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

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για την δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Klingelutz et al 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια της δράσης της τελομεράσης επιδρά στην σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση οδηγώντας σταδιακά στην γήρανση των κυττάρων και τον θάνατο (Liu J.P. 1999). Η E6 φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT μέσω συνδυαστικής δράσης μέσω c-myc και Sp1 (Kyo et al 2001). Αυτή η εκτεταμένη ενεργοποίηση της hTERT έχει σαν αποτέλεσμα την διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντας την κυτταρική γήρανση με άμεση συνέπεια τα κύτταρα να γίνονται αθάνατα (Artandi S.E et al 2005).

2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την δημιουργία αθάνατων κυττάρων καθώς επίσης και με την ιική παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μέγεθος 100 αμινοξέων και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές. Την CR1, CR2 και την CR3 (Barbosa M.S et al 1990, Dyson et al 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλει στην σύνδεση της E7 με το ρετινοβλάστωμα (Dyson et al 1992). Τέλος η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Η έκφραση μόνο της E7 απουσία της E6 μπορεί να δημιουργήσει αθάνατα NIH 3T3 κύτταρα και σε χαμηλό ποσοστό να δημιουργήσει αθάνατα κερατινοκύτταρα (Munger et al 1989). Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητα της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος περιλαμβάνει επίσης την p107 και p103 (Dyson et al 1989). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του

κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F με συνέπεια να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά την δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος. (Berezutskaya et al 1997, Wang et al 2001). Η πρόσδεση της E7 στην Rb έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλίνω-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ'επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Funk J.O et al 1997).

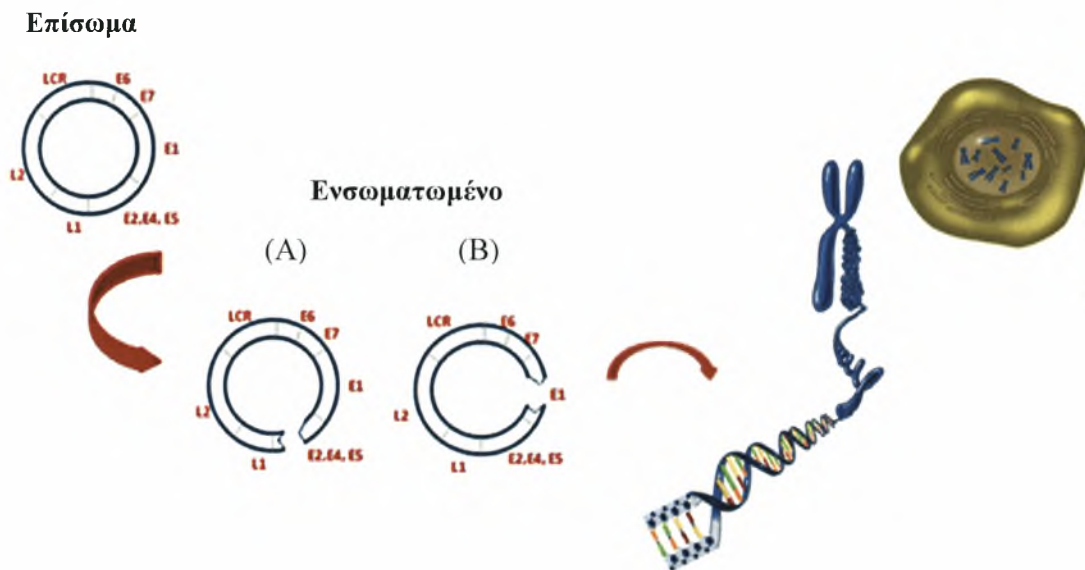
Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρά με την E7 είναι η απακετυλάση των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν επιπρόσθετα να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας την λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί ότι η σύνδεση της E7 στην HDAC αναστέλλει την σύνδεση της Rb-HDAC με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η λειτουργία της. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση της E7 στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth M.S et al 2004, Brehm A et al 1999). Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) αναγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες όλων των πρωτεϊνών του ιού.

Γονίδιο:	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμύκησης 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 φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Πλεονάζουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Ελάσσων καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

Πίνακας 2: Περιληπτική αναφορά όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

2.3 Μορφή του γενώματος.

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Σε μολυσμένα κύτταρα στα οποία ο ιός έχει “εγκατασταθεί”, διατηρεί το γονιδίωμα του υπό την μορφή πλασμιδίου. Το γονιδίωμα του ιού αντιγράφεται με συχνότητα μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο στην φάση S. Με αυτό τον τρόπο αντιγραφής ο ιός εξασφαλίζει την διατήρηση της μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας.



Εικόνα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της ρήξης των γονιδίων E1 και E2 και της ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα

Η ενσωμάτωση του DNA των HPV μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή σταθεροποιεί την έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 σε υψηλά επίπεδα και συνδέεται με πιο σοβαρές αλλοιώσεις. Σε μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή σε αλλοιώσεις τύπου CIN1 και συνδέεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 ενώ εμφανίζεται ως ενσωματωμένος στο 5% των αλλοιώσεων CIN2, στο 16% των αλλοιώσεων CIN3 και στο 87% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου (Klaes R et al 1999).

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

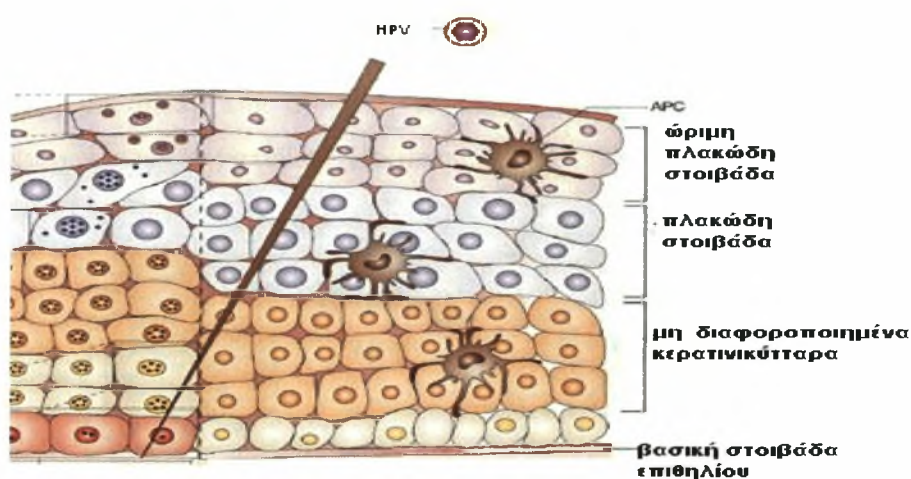
γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 και με μικρότερη συχνότητα στο γονίδιο E4 (Arias- Pulido H. et al 2006, Klaes et al 1999). Η διάσπαση του E2 γονιδίου είναι ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς μετά την μόλυνση του κυττάρου από τον ιό. Επιπλέον είναι ένα κρίσιμο σημείο για την έναρξη τραχηλικής νεοπλασίας και ένας πιθανός μοριακός δείκτης της εξέλιξης της νόσου. Η θραύση των γονιδίων E2 και E1 απορυθμίζει τον έλεγχο της μεταγραφής των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα να μεταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακόμη τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων είναι πιο σταθερά καθώς περιλαμβάνουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες (Lehn H. et al 1988, Couturier J. et al 1991). Από όλα τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι τα τραχηλικά κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένα ιϊκά ογκογονίδια έχουν ένα ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα στο να μετατραπούν σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα.

Επιπλέον σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται διάφορες κυτταρογενετικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια ή κέρδος λειτουργίας πολλών κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες κυτταρογενετικές αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του HPV με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών γονιδίων. Μερικά γονίδια γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου έχει παρατηρηθεί ότι διαρρηγνύονται λόγω ενσωμάτωσης του HPV. Μερικά από αυτά είναι τα MYC, TP63, NR4A2, APM-1, FANCC, TNFAIP2 και hTERT (Wentzensen N. et al 2004). Πιο συγκεκριμένα η ενσωμάτωση του HPV-16 κοντά στο πρώτο-ογκογονίδιο c-myc, συναντάται στο 10% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σχετίζεται με την αυξημένη έκφρασή του πρώτο-ογκογονιδίου (Durst M. et al 1987, Herrick J. et al 2005, Wentzensen N. et al 2004). Επομένως εκτός από την εκτεταμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων E6 και E7, η θέση στο κυτταρικό χρωμόσωμα όπου ο ιός έχει ενσωματωθεί προφανώς παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων.

3. Ο κύκλος ζωής των HPV

3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (εικόνα 3.1). Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσης του με την θειϊκή ηπαρίνη η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S et al 2003). Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon Cs et al 2001). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμινίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp TD et al 2006).



Εικόνα 3.1. Είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας

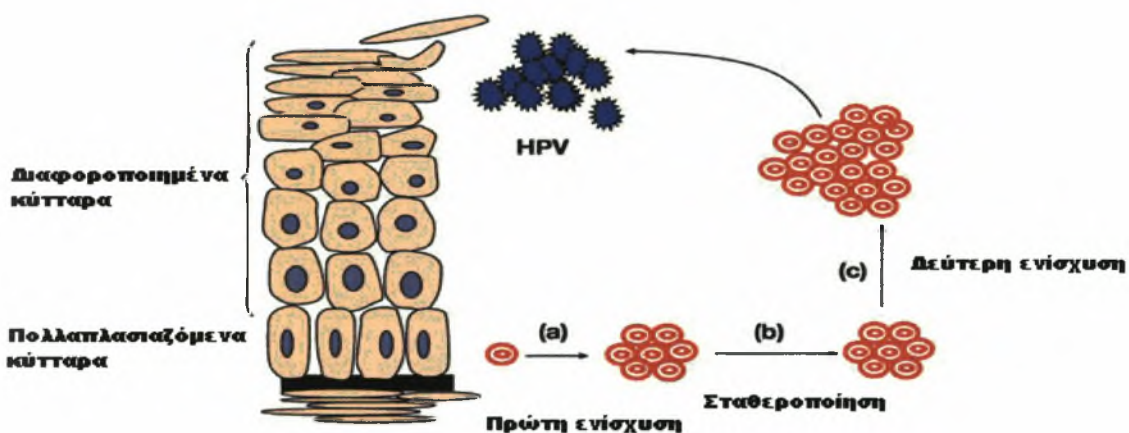
Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έχει προταθεί ότι οι HPV-16 και HPV-58 εισέρχονται σε κυστίδια κλαθρίνης ενώ ο HPV-31 συνδέεται με κυστίδια καβεολίνης (Bousarghin L. et al 2003). Έπειτα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA

μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2. (Day P.M et al. 2004).

3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Οι papilloma ιοί αντιγράφουν το γένωμα τους σε διαφορετικές περιόδους κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους και με διαφορετική συχνότητα. Σε πρώτο επίπεδο έχει προταθεί, ότι όταν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολυνθούν από τον ιό παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γενώματος μεταξύ 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο (Fields et al 1996). Σε αυτό το σημείο το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος συμβαίνει κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S. Στην φάση αυτή το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο.

Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R et al 2006)



Εικόνα 3.2. a) Μια πρώτη ενίσχυση του ιικού γενώματος γίνεται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, με την παραγωγή 50-400 αντιγράφων του σε κάθε κύτταρο. b) Στην συνέχεια έχουμε σταθεροποίηση του ιικού γενώματος και η αντιγραφή του γίνεται παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S. c) Τέλος στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων παρατηρείται μια παρατεταμένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού με στόχο την παραγωγή πολυάριθμων μορίων ιικού DNA για την σύνθεση νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων.

Τα πρώτα γονίδια τα οποία εκφράζονται μετά από την μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα οποία όπως έχει αναφερθεί στην προηγούμενη ενότητα επάγουν την αντιγραφή του DNA, με την πρωτεΐνη E2 να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας την δράση των γονιδίων E6 και E7.

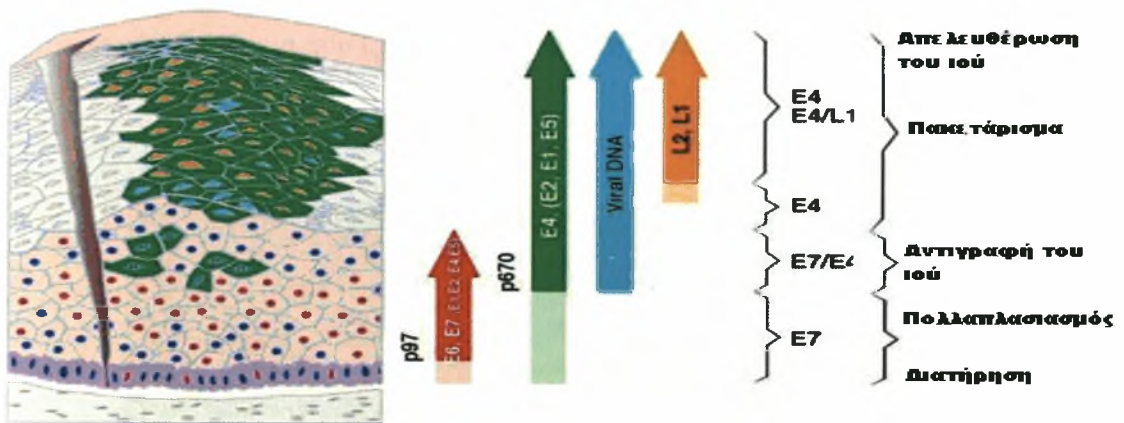
Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) (Corden S. A. et al 1999, Pett M. R. et al 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με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

3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Οι papilloma ιοί προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zhi-Ming Zheng et al 2006).

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 σωματίδια. 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 ικών γονιδίων (Grassmann K et al. 1996).



Εικόνα 3.3: Τα πρώιμα ικά 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 ικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των papilloma ιών περιλαμβάνει την τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και την σύνθεση των ικών σωματιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ικών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και 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).

Η ωρίμανση των ικών σωματίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέρθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 3.4).

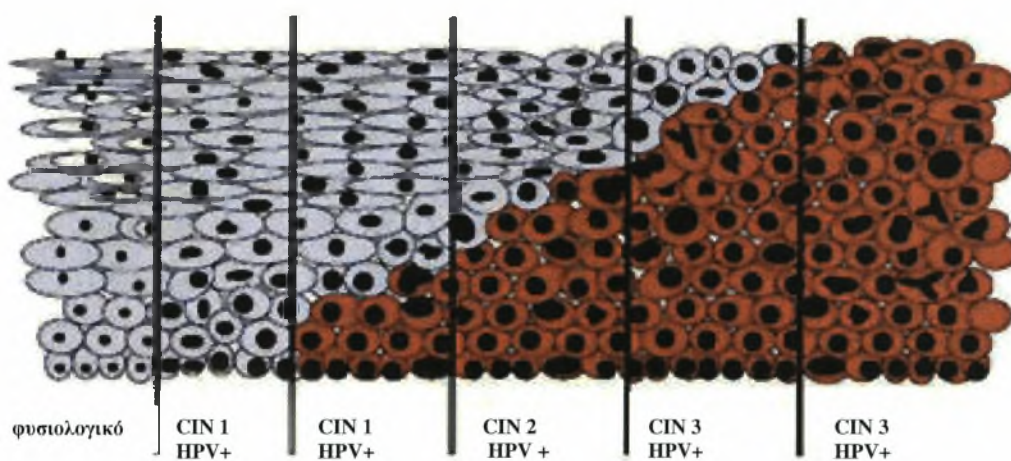


Εικόνα 3.4: Απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στα μολυσμένα κύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας.

Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr E et al 2004). Στην διαδικασία αυτή μπορεί να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1[^]E4. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια από το κύτταρο (Roberts S. et al 1997).

3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις.

Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A et al 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήτης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A. et al 2003).



Εικόνα 3.5 Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τράχηλου της μήτρας (CIN)

4. Κλινικές Εκδηλώσεις

Η μόλυνση από HPV είναι μια σεξουαλικά μεταδιδόμενη διαδικασία και επηρεάζει περισσότερες από 400.000 γυναίκες ετησίως σε όλο τον κόσμο ενώ αντιπροσωπεύει την δεύτερη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του μαστού (Ferlay et al 2001), Πιν 4.1. Στις ΗΠΑ ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στον τράχηλο έχει αυξηθεί κατά 80% τα τελευταία 50 χρόνια (Singer et al 1995). Κάθε χρόνο σχεδόν 10.000 γυναίκες είναι θετικές στην εξέταση για καρκίνο του τραχήλου ενώ 5.000 γυναίκες πεθαίνουν από την ασθένεια (Parkin et al 2001). Μελέτες έχουν υπολογίσει ότι περίπου 6 εκατομμύρια νέες HPV μολύνσεις συμβαίνουν κάθε χρόνο μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και ένας στους πέντε ενήλικους αμερικάνους θα μολυνθούν από HPV. Προβλέπεται ότι στον γενικό πληθυσμό το 75% των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχουν ήδη μολυνθεί με HPV που προσβάλλουν το γενετικό σύστημα (Cates W Jr et al 1999).

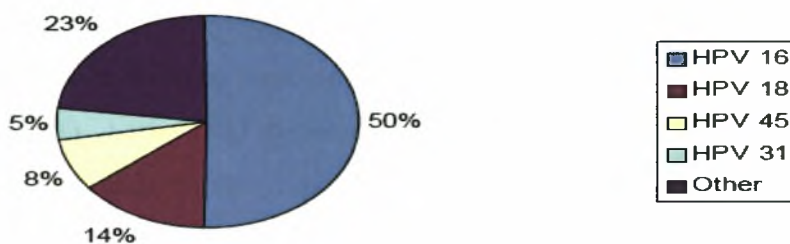


Εικόνα 4.1: Παγγόσμια περιστατικά καρκίνου του τραχήλου ανά 100.000 γυναίκες όλων των ηλικιών.

Η μόλυνση από τους HPV εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες και αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ανάπτυξης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) που μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Όλοι οι HPV προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου του δέρματος ή του βλεννογόνου. Όπως και πολλά από τα υπόλοιπα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, οι HPV συνήθως

προκαλούν σε αρχικό στάδιο ασυμπτωτική μόλυνση του ασθενή. Έτσι η λοίμωξη δεν διαπιστώνεται και κατ'επέκταση δεν αντιμετωπίζεται, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να μεταδίδεται στον πληθυσμό. Στις περισσότερες μελέτες η συνηθέστερη ηλικία HPV μόλυνσης είναι μικρότερη των 25 ετών ενώ η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται στην ηλικία των 50 ετών (Munoz et al 2004). Παρόλα αυτά ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μεταξύ τριών εβδομάδων και οχτώ μηνών μετά την μόλυνση με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των συμπτωμάτων στους τρεις μήνες.

Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ'επέκταση καρκίνο είναι οι HPV-16 και HPV-18 σε ποσοστό 50% και 23 % αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%.



Πίνακας 4.1: Αναγράφονται τα ποσοστά των τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (<http://www-depodb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>)

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τύποι HPV-16 και HPV-18 προκαλούν το 70% των περιστατικών καρκίνου του τραχήλου παγκοσμίως. Παρόλα αυτά παρατηρείται μια γεωγραφική και ειδική για κάθε χώρα μεταβλητότητα. Όπως για παράδειγμα στην υπό-Σαχάρια Αφρική και την Λατινική Αμερική όπου οι HPV-16 και HPV-18 είναι υπεύθυνοι για το 65% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου. Επιπλέον έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι οι τύποι των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στην Δυτική Αφρική ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν με μεγαλύτερη συχνότητα οι HPV-39 και HPV-54 (Bosh et al 1995).

4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.

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

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

Μόλυνση με τους τύπους HPV υψηλής επικυδυνότητας (High risk) και πιο συγκεκριμένα με τους τύπους 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, και 68, μπορεί να προκαλέσουν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου (*CIN*), ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του αιδοίου (*VIN*), ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πέους (*PIN*) και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πρωκτού (*AIN*). Αυτές είναι προ-καρκινικές δυσπλασίες και μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο. Εκτός από τους τύπους των HPV που προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι τύποι των papilloma ιών που σχετίζονται με την εμφάνιση μιας σειράς δερματικών παθήσεων που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος.

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Κλινικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 9 κλινικά δείγματα υψηλού και χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (High grade και Low grade) από τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία συλλέχτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Ο προσδιορισμός της αλλοίωσης έγινε με την μέθοδο του test pap στο εργαστήριο Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ η ταυτοποίηση των δειγμάτων ως HPV-16 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας Μικροβιολογίας με την μέθοδο της Nested Multiplex PCR σύμφωνα με την δημοσίευση του K.Sotlar και των συνεργατών του, το 2004. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 5.1

Δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας	
Δείγματα	Κλινική Εικόνα
A3	HG (CIN III in situ)
A4	HG (CIN III)
A6	HG (CIN III in situ)
A13	HG (CIN III in situ)
A15	HG (CIN III in situ)
A17	LG (CIN I)
A24	LG (CIN I)
A31	HG
A38	HG

Πίνακας: 5.1: Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων συνοδευόμενα με τον βαθμό τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

5.2 Απομόνωση DNA και RNA.

Η απομόνωση RNA και DNA από την καλυπτρίδα πάνω στην οποία είχαν μονιμοποιηθεί κύτταρα για την εξέταση test pap έγινε με την χρήση πρωτεΐνάσης K. Από κάθε καλυπτρίδα απομακρύνθηκαν τα κύτταρα με νυστέρι, τοποθετήθηκαν μέσα σε σωληνάρια Eppendorf και αναμειχθηκαν με 0,5 έως 1,5 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων που απομονώθηκαν. Στην συνέχεια

ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου ενώ το ίζημα διαλύθηκε με την προσθήκη 1 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και επώαστηκε στους 4°C για 1 ώρα. Με το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min, 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) και προσθήκη 1µl πρωτεΐνάσης K (20µg/µl). Το μείγμα με το ένζυμο παρέμειναν στους 55°C για 60 min ενώ ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 95°C για 10 min για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 5 min και συλλογή του υπερκείμενου το οποίο πλέον περιέχει RNA και DNA.

Στην συνέχεια για να αυξήσουμε την ποιότητα του υπερκείμενου και να απομακρύνουμε επιπλέον κύτταρα και πρωτεΐνες που είχαν παραμείνει μετά το τέλος της πρώτης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη σε σειρά απομόνωση DNA και RNA.

Η διαδικασία αυτή έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I. et al, 1996. Κάθε υπερκείμενο της πρώτης αντίδρασης που αντιστοιχεί σε διαφορετικό κλινικό δείγμα, αναμίχθηκε με γλυκογόνο 20µg/tube και Lysis Buffer 600µl (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 ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ικό DNA επαναδιαλύθηκε σε 100 µl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA και RNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β- γλοβουλίνης

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA και για την διαπίστωση 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 (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
PC04/GH20	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 94°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 40°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 60sec } 35 cycles

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

5.4 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του E2 γονιδίου.

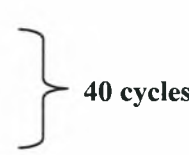
Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Συνολικά δημιουργήθηκαν 6 ζευγάρια εκκινητών με βάση την πρότυπη αλληλουχία του E2 γονιδίου που είναι καταχωρημένη στο Gene Bank. Πιο συγκεκριμένα κατασκευάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου E2 ενώ άλλα 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητών ενισχύουν εσωτερικά το γονίδιο με απώτερο στόχο, εάν υπάρχει να προσδιοριστεί η ακριβής θέση ρήξης του γονιδίου. Η αλληλουχία των εκκινητικών μορίων και το μέγεθος των προϊόντων της PCR που προκύπτουν αναγράφονται στον πίνακα 6.

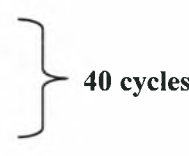
Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR
HPV-16 2734	2734	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1176 bp
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
HPV-16 2736	2736	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1162 bp
HPV-16 3862	3862	Antisense	GCAAAAAGCACGCCAGTAAT	
HPV-16 2732	2732	Sense	GAGGACGAGGACAAGKAAAA	632 bp
HPV-16 3364	3364	Antisense	CGTTGCTGCTAAACACAGATG	
HPV-16 2931	2931	Sense	CCAACACTGGCTGTATCAAAGA	980 bp
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
HPV-16 3312	3312	Sense	ATGCGGGTGGTCAGGTAAT	598 bp
HPV-16 3912	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
HPV-16 3442	3442	Sense	CACCGAAGAAACACAGACGA	468 bp

Πίνακας 6: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς επίσης η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους, η πολικότητά τους και το μέγεθος του προϊόντος της PCR

5.5 PCR για την Ενίσχυση του E2 γονιδίου

Στην συνέχεια όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου, ολόκληρου και των εσωτερικών τμημάτων του, με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή MJ minicycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 56°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 40sec.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
2734-3912 2736-3862	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 56°C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40sec 

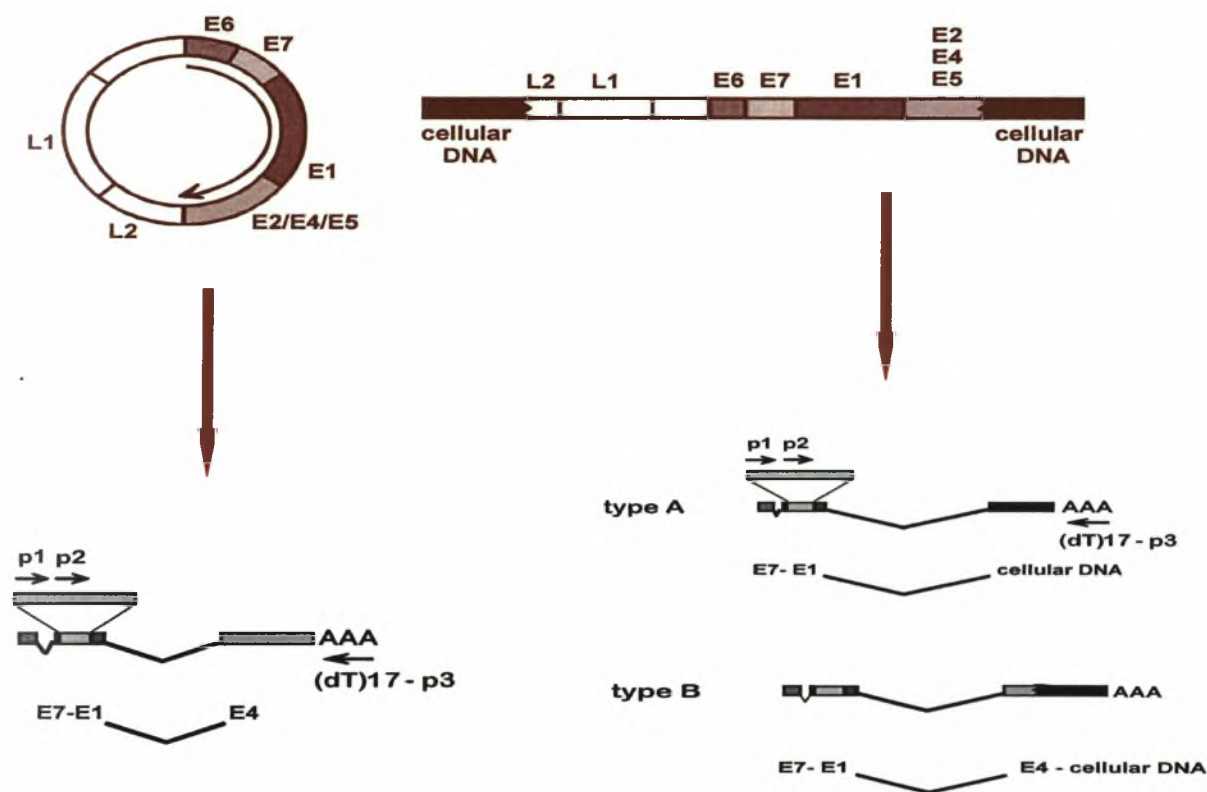
Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
2732-3364 2931-3912 3312-3912 3442-3912	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 56°C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec 

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

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν κάθε PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 200V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

5.6 APOT assay- Μέθοδος ενίσχυσης μεταγράφων προερχόμενα από ενσωματωμένα ιικά ογκογονίδια.

Η μέθοδος APOT είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την ενίσχυση HPV μεταγράφων με την χρήση των μεθόδων RT και PCR, επιτρέποντας τον διαχωρισμό ικών mRNAs που προέρχονται από επισωματικό ή ενσωματωμένο HPV γονιδίωμα (Klaes R. et al., 1999). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στο 3' άκρο μεταξύ των μεταγράφων.



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση των τύπων των μεταγράφων που προκύπτουν όταν το γονιδίωμα του HPV-16 βρίσκεται στην επισωματική και ενσωματωμένη του μορφή.

Στο παραπάνω σχεδιάγραμμα βλέπουμε ότι όταν το γένωμα του ιού είναι σε επισωματική μορφή παίρνουμε ένα μετάγραφο το οποίο περιέχει αλληλουχίες από τα γονίδια E7, E1 και E4, δίνοντας μια ζώνη ενίσχυσης μεγέθους 1050bp. Αντιθέτως όταν το γονιδίωμα του ιού είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή παρατηρούνται δύο τύποι μεταγράφων. Ο τύπος A, ο οποίος περιλαμβάνει τμήματα των γονιδίων E7, E1 και


κυτταρικού DNA ενώ ο τύπος B περιλαμβάνει τμήματα των γονιδίων E7, E1, E4 και κυτταρικές αλληλουχίες δίνοντας μια σειρά ζωνών ενίσχυσης κάτω από 650bp.

5.6.1 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

RNA (5 µl) από τα εννιά κλινικά δείγματα υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή (RT) χρησιμοποιώντας ένα oligo(dT)₁₇ εκκινητικό μόριο συνδεδεμένο με μία αλληλουχία προσαρμοστή (linker) [(dT)₁₇-p3: 5'-GACTCGAGTCGACATCGA-TTTTTTTTTTTTTTTTT TT-3'] και 200U (Units) από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (Invitrogen superscript II) για 52 min στους 42°C σε τελικό όγκο 20 µl.

5.6.2 PCR


Η μέθοδος APOT περιλαμβάνει δύο στην σειρά αντιδράσεις PCR στις οποίες υποβάλλονται τα cDNA που προέκυψαν από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT). Η πρώτη αντίδραση πραγματοποιείται με την χρήση του ζεύγους των εκκινητικών μορίων p1-16 (5'-CGGACACAGAGCCCATTACAAT-3') και p3 (5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'), τα οποία είναι σχεδιασμένα ειδικά για τον HPV-16. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50µl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 µl cDNA από κάθε δείγμα, 2 µl από το ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5µl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 µl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50µl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 59°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
p1-16/ p3	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 59°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 

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

5.6.3 Nested PCR

Η δεύτερη PCR της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος των εκκινητών p2-16 (5'-CTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACG-3') και (dT)₁₇-p3 που χρησιμοποιήθηκε στην RT. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 5μl από το προϊόν ενίσχυσης της 1ης PCR, 2 μl από το ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 67°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
p2-16/p3	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 67°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά.

Επιπλέον για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και για την αύξηση της ποσότητας του προϊόντος της PCR πραγματοποιήθηκε Auto Nested PCR για 25 επιπλέον κύκλους. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε gel αγαρόζης 2%, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.5.

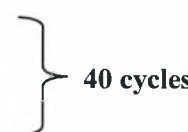
5.6.4 Απομόνωση των PCR προϊόντων από gel αγαρόζης.

Τα προϊόντα της Nested PCR όγκου 50μl, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120Volts. Στην συνέχεια οι επιθυμητές ζώνες απομακρύνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε σωλήνες Eppendorf των 2ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.6.5 PCR για την ανίχνευση τμημάτων των E7 και E4 γονιδίων.

Για την ανίχνευση των ειδικών HPV μεταγράφων πραγματοποιήθηκαν PCR για την ενίσχυση μικρών τμημάτων των γονιδίων E7 και E4 που περιέχονται στα ικά μετάγραφα συνολικού μεγέθους 138bp και 251bp αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στις ζώνες ενίσχυσης που απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν για το κομμάτι του γονιδίου E7 το ζευγάρι των εκκινητών HPV-16 700 [5'- CGGACAGAGCCC ATTACAATA -3'] και HPV-16 838 [5'- TGGGGCACACAATTCCCTAGT -3'] ενώ για το τμήμα του E4 γονιδίου το ζευγάρι HPV-16 3347 [5'-TCTGTGTTTAGCAGCAACGAA-3'] και HPV-16 3598 [5'- AATCCGTCCTTTGTGTGAF-3'].

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και για τις δύο PCR σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό περιείχε για κάθε αντίδραση: 3 μl DNA από κάθε απομονωμένη ζώνη ενίσχυσης, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 55°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30sec.

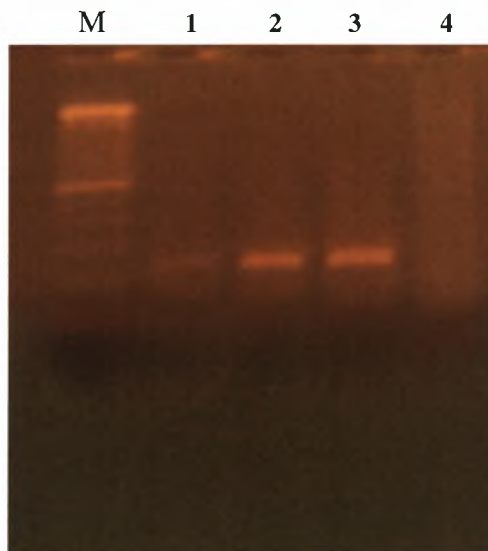
Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
700-838 3347-3598	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec 

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά

6. Αποτελέσματα

6.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης.

Στην εικόνα 6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης δύο ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων. Όλα τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν στην διαδικασία αυτή για τον έλεγχο της ύπαρξης DNA καθώς επίσης και για τον έλεγχο της ποιότητας του κυτταρικού DNA.



Εικόνα 6.1. Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι τα κλινικά δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς όλες οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο σωστό ύψος των 250bp σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους των 100bp της εταιρίας Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους της Invitrogen δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Στις θέσεις 1 και 2 είναι τοποθετημένα τα δείγματα A3 και A4 ενώ στην θέση 3 και 4 υπάρχει θετικός μάρτυρας, ο οποίος είναι εκχυλισμένο δείγμα από κύτταρα Rd και αρνητικός μάρτυρας που είναι ddH₂O. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

6.2 PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου

Από τα εννέα συνολικά κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία σε δύο κλινικά δείγματα υψηλής αλλοίωσης (high grade) και σε ένα δείγμα χαμηλής αλλοίωσης (low grade) ενισχύθηκε ολόκληρο το γονίδιο E2 με τα δύο εξωτερικά ζεύγη εκκινητικών μορίων HPV-16-2734-3912 και HPV-16-2736-3862. Στον παρακάτω πίνακα 6.1 αναγράφονται τα ζεύγη των εκκινητών, το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης, καθώς επίσης και τα δείγματα τα οποία έδωσαν το επιθυμητό προϊόν.

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

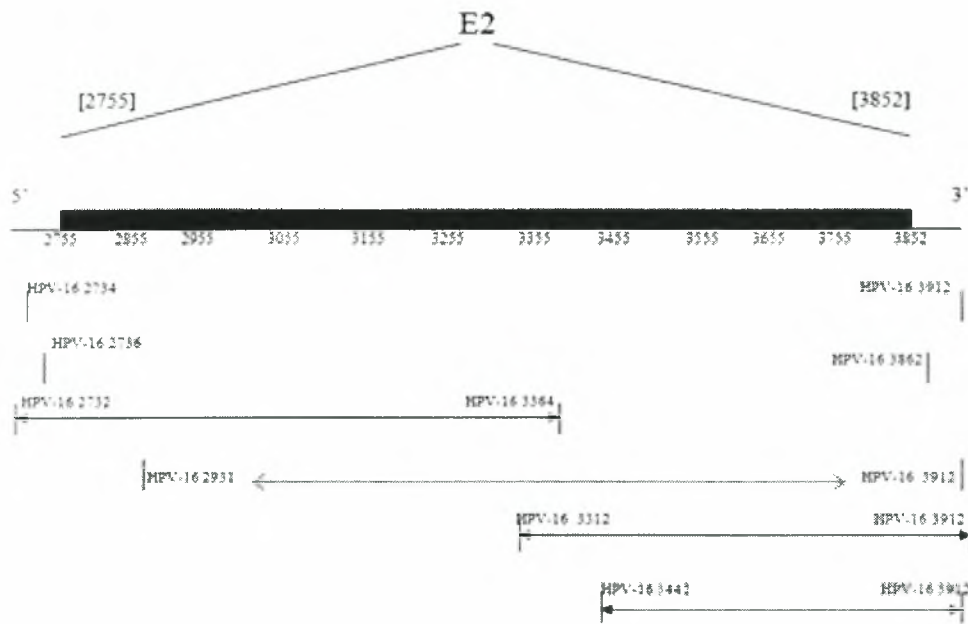
Πίνακας 6.1: Εκκινητές και δείγματα που έδωσαν το επιθυμητό προϊόν ενίσχυσης.

Τα υπόλοιπα έξι κλινικά δείγματα τα οποία είναι υψηλής αλλοίωσης (HG) δεν ενισχύθηκαν με τα εξωτερικά εκκινητικά μόρια αλλά μόνο με τα εσωτερικά αλληλοεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα και τα έξι δείγματα ενισχύθηκαν με τα ζεύγη HPV-16 2732-3364, 3312-3912 και 3442-3912 ενώ τα δείγματα A13 και A15 ενισχύθηκαν μόνο με τους εκκινητές HPV-16 2931-3912.

Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα ζεύγη των εσωτερικών εκκινητών και τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε η επιθυμητή περιοχή. Στην εικόνα 6.1 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση των εκκινητικών μορίων και του μεγέθους των ζωνών ενίσχυσης για τα έξι HG δείγματα όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων της PCR.

Εκκινητές	Δείγματα
2732-3364 632 bp	A3,A4,A6,A13,A15A31
3312-3912 598 bp	A3,A4,A6,A13,A15,A31
3442-3912 468 bp	A3,A4,A6,A13,A15,A31
2931-3912 980 bp	A13,A15

Πίνακας 6.2. Δείγματα και ζεύγη εκκινητών με τους οποίους ενισχύθηκαν



Εικόνα 6.1: Σχηματική αναφορά των αποτελεσμάτων της PCR για τα HG δείγματα. Τα δείγματα A3, A4, A6, A13, A15, A31 ενισχύονται με τα εκκινητικά μόρια HPV-16 2732-3364, 3312-3912, και 3442-3912 όπως φαίνονται με την μαύρη γραμμή. Τα δείγματα A13 και A15 ενισχύονται και με το ζεύγος HPV-16 2931-3912, όπως φαίνεται με την μπλε γραμμή.

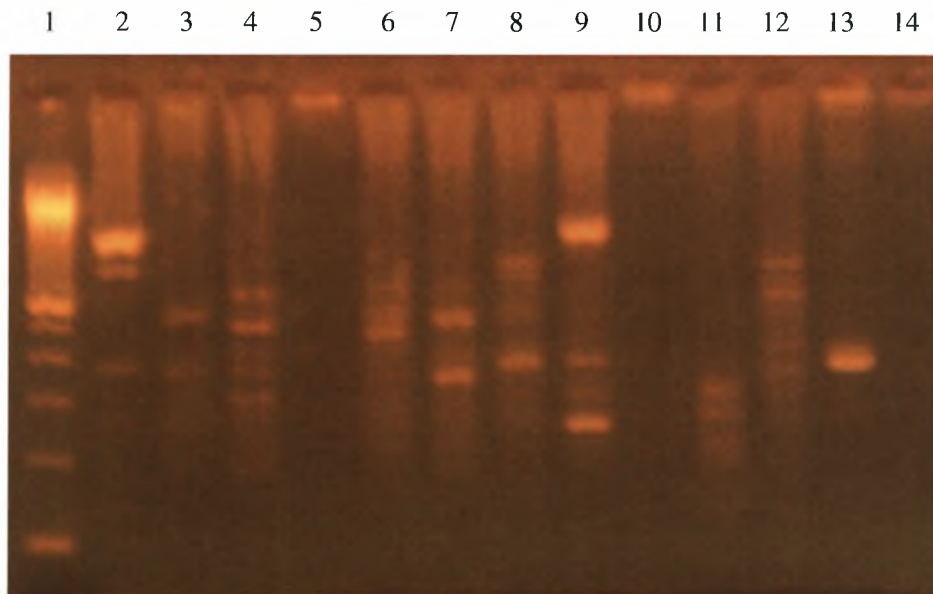
Το γεγονός ότι τα δείγματα υψηλής αλλοίωσης ενισχύονται μόνο από τα εσωτερικά μόνο ζεύγη εκκινητών, υποδηλώνει ότι η περιοχή E2 (συνηθέστερη θέση ρήξης και ενσωμάτωσης του HPV-16) έχει υποστεί ρήξη εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και κατά συνέπεια ο ιός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή εντός του κυττάρου ξενιστή. Το πρότυπο αυτό ενίσχυσης παρατηρείται μόνο στα κλινικά δείγματα υψηλής αλλοίωσης με εξαίρεση το δείγμα A38 στο οποίο όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα φέρει την E2 σε ακέραιη κατάσταση.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα στα HG δείγματα ενισχύεται η περιοχή E2 με την βοήθεια των αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών. Από την μοριακή κλωνοποίηση και αλληλούχηση που διεξήχθη από μελέτη που πραγματοποιήθηκε παράλληλα με την παρούσα εργασία στο εργαστήριο ευρέθη, ότι στις περιοχές στις οποίες προσδένονται οι εξωτερικοί εκκινητές (HPV-16-2734-3912 και HPV-16-2736-3862) δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις που να αποτρέπουν τον υβριδισμό των μορίων και την αναστολή της PCR. Ακόμα στις θέσεις όπου προσδένονται οι εκκινητές HPV-16 2931-3912 οι οποίοι εμπλέκονται μόνο σε δύο δείγματα HG (A13, A15) δεν παρατηρήθηκαν επίσης νουκλεοτιδικές αλλαγές που να

αναπέμπουν την PCR στα δείγματα A3, A4, A6, A31. Από τα δεδομένα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι σε δείγματα HG διαφορετικά στελέχη HPV-16 έχουν υποστεί ρήξη σε διαφορετικές θέσεις εντός της αλληλουχίας του γονιδίου E2. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην ενισχύεται το E2 γονίδιο με τους εξωτερικούς εκκινητές καθώς δεν υπάρχει ολόκληρο το ORF του γονιδίου και να ενισχύονται μόνο συγκεκριμένα τμήματα του, τα οποία έχουν παραμείνει ακέραια μετά την διάσπαση του γενετικού τόπου E2 και την ενσωμάτωση του ιού στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή.

6.3 Αποτελέσματα APOΤ

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 6.2) στο πήκτωμα αγαρόζης έχουν ηλεκτροφορηθεί όλα τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (HG και LG) και υποβλήθηκαν στην μέθοδο APOΤ που περιγράφηκε στην ενότητα 6.5. Οι ζώνες ενίσχυσης που φαίνονται στη εικόνα είναι μετά από τη auto nested PCR στους 25 κύκλους.



Εικόνα 6.2: Πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί τα αποτελέσματα της μεθόδου APOΤ. Δύο δείγματα LG στις θέσεις 8 και 9 και έξι δείγματα HG στις θέσεις 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12. Στις θέσεις 5, 10 και 14 είναι τοποθετημένοι αρνητικοί μάρτυρες ddH₂O.

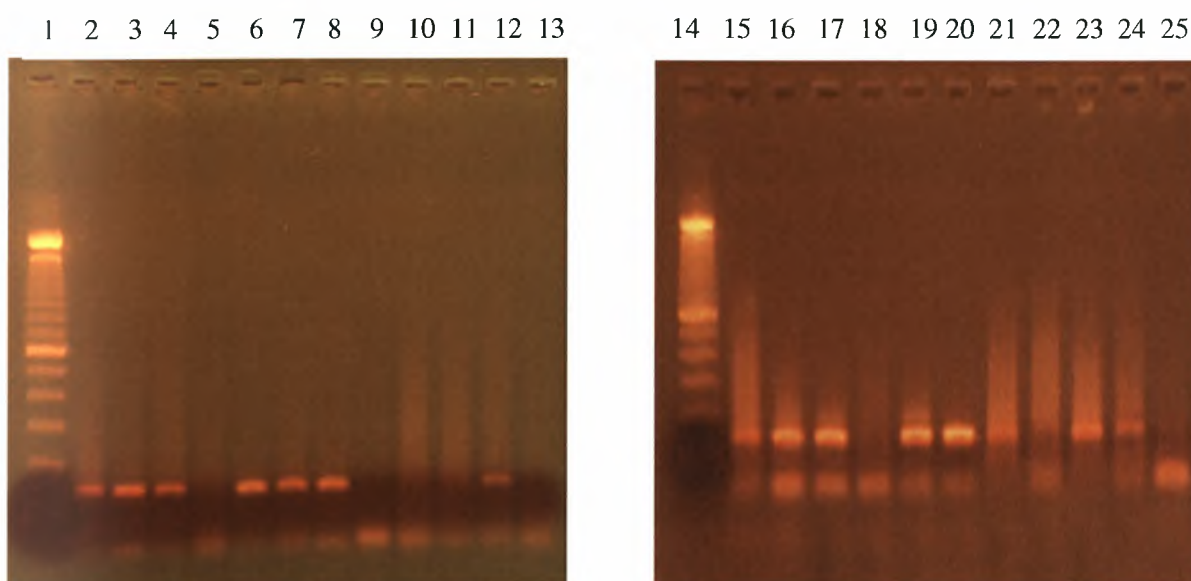
Στην παραπάνω εικόνα έχουν ηλεκτροφορηθεί τα προϊόντα που έχουν προκύψει από την διαδικασία της μεθόδου APOT. Όπως έχει αναφερθεί και στην βιβλιογραφία οι ζώνες οι οποίες βρίσκονται στο ύψος των 1100bp υποδηλώνουν ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται σε επισωματική μορφή, καθώς ενισχύεται το μετάγραφο το οποίο περιέχει αλληλουχίες από τα γονίδια E7, E1 και E4. Όλες οι άλλες ζώνες κάτω από 650 βάσεις υποδηλώνουν ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται σε ενσωματωμένη κατάσταση, καθώς ενισχύεται ένας από τους δύο τύπους μεταγράφων (Klaes et al. 1999).

Βάσει των στοιχείων αυτών το προϊόν στην θέση 2 στην οποία αντιστοιχεί το δείγμα A3 (HG) έχει τρεις ζώνες. Μια ζώνη στην θέση 1100bp στην θέση 800bp και μια αχνή ζώνη στην θέση 350bp. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στο δείγμα A3 το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται ταυτόχρονα σε επισωματική (1100bp) και σε ενσωματωμένη μορφή (350bp). Το δείγμα A4 στην θέση 3 φέρει μία ζώνη ενίσχυσης στις 500bp επομένως ο ιός βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή. Τα δείγματα A6, A13, A15, A17 (LG), A31 και A38 στις θέσεις 4, 6, 7, 8, 11, και 12 αντίστοιχα φέρουν διάφορες ζώνες ενίσχυσης κάτω από τις 800 bp άρα ο ιός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή. Τέλος το δείγμα A24 στην θέση 9 φέρει μία ζώνη ενίσχυσης στις 1100bp (επισωματική μορφή) και στα ύψη των 700bp, 400bp και 250bp (ενσωματωμένη μορφή).

Το γεγονός ότι υπάρχει διακύμανση στο μέγεθος των ζωνών ενίσχυσης κάτω των 800bp ίσως να οφείλεται στο ότι κάποια από τα μετάγραφα που ενισχύθηκαν είναι μη ειδικά, προερχόμενα από κυτταρικές αλληλουχίες ή λόγω εναλλακτικού ματίσματος που υφίστανται τα mRNAs του HPV-16. Επομένως για να απομονώσουμε μόνο τα ειδικά ιικά μετάγραφα και να διευκρινίσουμε με ακρίβεια την μορφή του γονιδιώματος του ιού, πραγματοποιήθηκε PCR για συγκεκριμένα τμήματα των γονιδίων E7 και E4 του HPV-16 όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5.6.5.

6.4 Αποτελέσματα ενίσχυσης των τμημάτων E7 και E4.

Στις παρακάτω εικόνες (εικόνες 6.3 και 6.4) που ακολουθούν, φαίνονται οι ζώνες ενίσχυσης που έχουν προκύψει μετά από την απομόνωση μόνο των PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης της auto nested PCR (απομόνωση μόνο των έντονων ζωνών ενίσχυσης) και υποβολή των απομονωμένων ζωνών σε PCR με εκκινητικά μόρια που ενισχύουν μικρά τμήματα των γονιδίων E7 και E4.

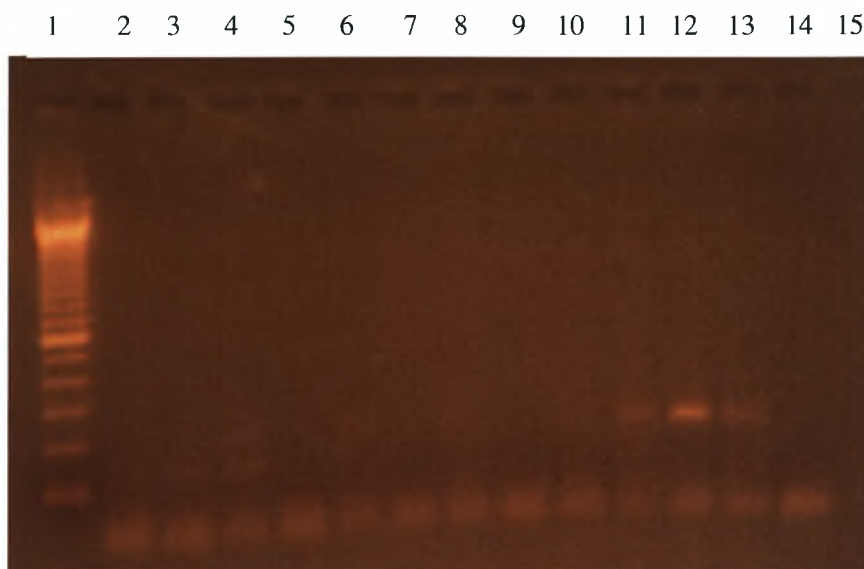


Εικόνα 6.3: Αποτελέσματα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης από την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου E7 από την θέση 700 έως την θέση 838. Συνολικό μέγεθος προϊόντων PCR 138 bp.

Στην εικόνα 6.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ενίσχυση τμήματος του E7 γονιδίου συνολικού μεγέθους 138bp. Οι εκκινητές υβριδίζονται και ενισχύουν την περιοχή του E7 γονιδίου από την θέση 700 έως την θέση 838. Στις θέσεις 5, 9, 13, 18 και 22 είναι τοποθετημένοι αρνητικοί μάρτυρες (ddH₂O). Στα υπόλοιπα “πηγαδάκια” αντιστοιχούν τα αποτελέσματα ενίσχυσης από τις απομονωμένες ζώνες όπως φαίνονται στην εικόνα 6.2. Στις θέσεις 2 και 3 είναι οι ζώνες του δείγματος A3 των 1100bp και 750bp αντίστοιχα, στην θέση 4 είναι η ζώνη του δείγματος A4 των 500bp. Στις θέσεις 6 και 7 βρίσκονται οι ζώνες του δείγματος A6 των 500bp και 550bp, στην θέση 8 και 10 το δείγμα A13 των 300bp και 750bp ενώ στις θέσεις 11 και 12 το δείγμα A15 των 350bp και 550bp. Επιπλέον στις θέσεις 15, 16, 17 είναι οι ζώνες του δείγματος A17 των 300bp, 850bp και 900bp αντίστοιχα στις θέσεις 19 και 20 το δείγμα A24 των 1100bp και 250bp, στις θέσεις 21 και 23 το δείγμα A31

των 300bp και 350bp και τέλος στις θέσεις 24, 25 το δείγμα A38 των 700 και 800bp αντίστοιχα.

Επιπλέον όλα τα δείγματα και οι ζώνες ενίσχυσης της *autonested* PCR που αναφέρθηκαν παραπάνω υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου E4 γονιδίου συνολικού μεγέθους 251bp. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο πήκτωμα αγαρόζης της εικόνα 6.4.



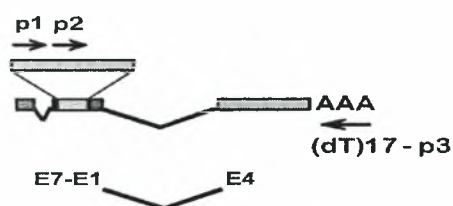
Εικόνα 6.4: Αποτελέσματα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης από την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου E4 από την θέση 3347 έως την θέση 3598. Συνολικό μέγεθος προϊόντων PCR 251bp.

Στις θέσεις 5, 9, 15 είναι τοποθετημένοι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης της PCR (ddH₂O). Από την όλη διαδικασία τα δείγματα που έδωσαν αποτελέσματα στην περιοχή του γονιδίου E4 είναι οι ζώνες στην θέση 4 που βρίσκεται το δείγμα A17 (900bp), στην θέση 6 το δείγμα A24 (1100bp), στην θέση 10 το δείγμα A31 (350bp) και στις θέσεις 11, 12, 13 το δείγμα A38 (700bp, 800bp, 750bp).

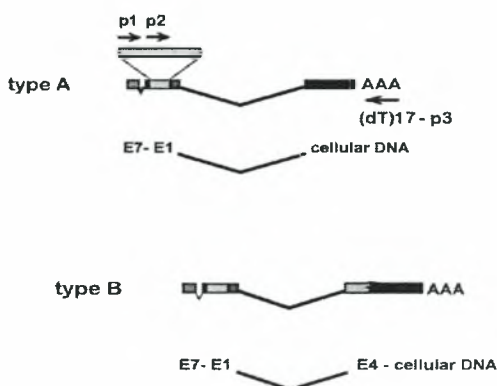
Συνολικά από τα παραπάνω αποτελέσματα που πήραμε συμπεραίνουμε ποιες ζώνες ενίσχυσης που προέκυψαν από την μέθοδο APOT ανήκουν στον HPV-16. Πιο συγκεκριμένα σχεδόν όλες οι ζώνες που καταφέραμε να απομονώσουμε από το πήκτωμα έδωσαν ζώνες ενίσχυσης για το τμήμα του γονιδίου E7 εκτός από το δείγμα A13 στις 750bp. Επομένως η ζώνη αυτή αποτελεί μη ειδικό προϊόν της μεθόδου APOT. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.5 όλα τα ικά μετάγραφα, που προέρχονται είτε από ενσωματωμένο είτε από επισωματικό ιικό γένωμα, φέρουν τμήματα του γονιδίου E7.

Από την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου E4 μεγέθους 251bp δεν δούλεψαν όλα τα δείγματα παρά μόνο τέσσερα (A17, A24, A31 και A38) από τα συνολικά εννιά που χρησιμοποιήθηκαν. Παρατηρούμε ότι ενισχύθηκαν για την περιοχή του γονιδίου E4, ζώνες που έχουν μέγεθος πάνω από 700bp με εξαίρεση το δείγμα A31 ενώ δύο από αυτά τα δείγματα τα A17 και A24 προέρχονται από χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις.

**Μετάγραφο προερχόμενο από
επισωματικό HPV-16 γένωμα**



**Μετάγραφο προερχόμενο από
ενσωματωμένο HPV-16 γένωμα**



Εικόνα 6.5: ιικά μετάγραφα προερχόμενα από επισωματικά και ενσωματωμένα HPV-16 γενώματα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την διαδικασία που ακολουθήσαμε για τον προσδιορισμό της κατάστασης του E2 γονιδίου και από την μέθοδο APOΤ παρατηρούμε ότι ο ιός μπορεί να βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές (επισωματική και ενσωματωμένη). Χαρακτηριστικά παρατηρήσαμε ότι στα δείγματα LG η περιοχή του E2 γονιδίου βρίσκεται ολόκληρη συμπεραίνοντας σε ένα πρώτο επίπεδο ότι ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή. Επιπλέον από την διαδικασία της APOΤ τα δείγματα αυτά δίνουν ενδείξεις ότι ο ιός ταυτόχρονα βρίσκεται και σε ενσωματωμένη κατάσταση. Επομένως βλέπουμε ότι ο ιός σε χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις βρίσκεται ταυτόχρονα και στις δύο μορφές ενώ σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις βρίσκεται κυρίως ενσωματωμένος. Στον πίνακα 6.3 αναγράφονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ενίσχυση του E2 γονιδίου και τα αποτελέσματα από την μέθοδο APOΤ.

Κλινικά δείγματα	Κλινική εικόνα	Κατάσταση E2 γονιδίου	Αποτελέσματα ΑΡΟΤ	Ενίσχυση τμήματος E4 μετά από ΑΡΟΤ (251bp)	Ενίσχυση τμήματος E7 μετά από ΑΡΟΤ (138bp)
A3	HG (CIN III)	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	-	+
A4	HG (CIN III)	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	-	+
A6	HG (CIN III)	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	-	+
A13	HG (CIN III)	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	-	+
A15	HG (CIN III)	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	-	+
A17	LG (CIN I)	Ολόκληρο το ORF	Επίσωμα και ενσωματωμένο	+	+
A24	LG (CIN I)	Ολόκληρο το ORF	Επίσωμα και ενσωματωμένο	+	+
A31	HG	Ρήξη εντός ORF	Ενσωματωμένο	+	+
A38	HG	Ολόκληρο το ORF	Επίσωμα και ενσωματωμένο	+	+

Πίνακας 6.3: Στον πίνακα αναφέρονται συνοπτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ενίσχυση του E2 γονιδίου και τα αποτελέσματα από την πραγματοποίηση της διαδικασίας ΑΡΟΤ. Ταυτόχρονα αναγράφονται τα αποτελέσματα από τις PCR για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων των γονιδίων E4 και E7 για την ταυτοποίηση των ειδικών HPV-16 μεταγράφων.

7. Συζήτηση

Η έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 είναι αναγκαία προϋπόθεση για την έναρξη καρκίνου του αναπαραγωγικού συστήματος. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας το γονιδίωμα των HPV ιών υψηλής επικινδυνότητας είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Η ενσωμάτωση του ιού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την απορύθμιση της έκφρασης των HPV ογκογονιδίων στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου και οδηγεί σε μία εκτεταμένη χρωμοσωμική αστάθεια στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της δυσπλασίας. Η αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος του ευκαριωτικού κυττάρου έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση μιας σειράς ποιοτικών και ποσοτικών μεταλλάξεων που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου.

Πολλά *in vitro* πειράματα έχουν αποδείξει ότι η ενσωμάτωση του ιού οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των E6 και E7 ογκογονιδίων και σε αύξηση της σταθερότητας των ιικών-κυτταρικών μεταγράφων (Doeberitz et al 1991, Jeon S. al 1995). Επομένως, η ενσωμάτωση του ιού δίνει ένα εξαιρετικό πλεονέκτημα για τον πολλαπλασιασμό των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων και αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο ανάπτυξης δυσπλασίας που προκαλείται από HPV στελέχη υψηλού κινδύνου. Για τον λόγο αυτό η ανίχνευση ενσωματωμένων HPV γονιδιωμάτων μπορεί να αποτελέσει ένα κατάλληλο μοριακό δείκτη για την πρόγνωση της δυνατότητας μετατροπής προνεοπλαστικών τραχηλικών αλλοιώσεων σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Για τον σκοπό αυτό στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τον προσδιορισμό της κατάστασης του γονιδιώματος του στελέχους HPV-16, το οποίο απαντάται με συχνότητα σχεδόν 50% σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η μελέτη έγινε σε συνολικά εννιά κλινικά δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος, εκ των οποίων επτα προέρχονταν από υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CINII, CINIII) και δύο από χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (CINI). Μελετήσαμε σε ένα πρώτο στάδιο την κατάσταση του γονιδίου E2, το οποίο όπως έχει αναφερθεί αποτελεί την συνηθέστερη θέση στην οποία ο HPV-16 υφίσταται ρήξη και ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου ξενιστή (M. Cricca et al 2009). Για τον λόγο αυτό, σχεδιάσαμε εκκινητικά μόρια με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV-16, που είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων. Συνολικά σχεδιάστηκαν έξι ζεύγη εκκινητικών μορίων δύο εκ των οποίων συμβάλουν στην ενίσχυση ολόκληρου του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E2 γονιδίου. Τα υπόλοιπα τέσσερα εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητών συμβάλουν στην ενίσχυση των επιμέρους

τμημάτων του E2 γονιδίου με βασικό στόχο να προσδιοριστεί η θέση ρήξης του γονιδιώματος του ιού.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ενίσχυση του E2 γενετικού τόπου παρατηρήθηκε, ότι στα δύο κλινικά δείγματα LG (A17 και A24) και σε ένα δείγμα HG (A38) ενισχύθηκε ολόκληρη η αλληλουχία του E2 γονιδίου. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή. Αντιθέτως σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα HG παρατηρήθηκε ότι ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος εντός του DNA του κυττάρου, καθώς ενισχύθηκαν μόνο συγκεκριμένα επιμέρους τμήματα του γονιδίου από τους εσωτερικούς εκκινητές δίνοντας ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ενίσχυσης. Από τα δεδομένα αυτά συμπεράναμε ότι διαφορετικά στελέχη HPV-16 διαρρηγνύονται σε διαφορετικές θέσεις εντός της αλληλουχίας του E2 γονιδίου. Βάση της υπόθεσης αυτής, τα τμήματα του E2 γονιδίου που ενισχύθηκαν από τις αντιδράσεις της PCR προφανώς προέρχονται από διαφορετικά ιικά στελέχη HPV-16. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε με τα δεδομένα που προέκυψαν από παράλληλη εργασία σύμφωνα με την οποία δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στις θέσεις υβριδισμού των εξωτερικών εκκινητικών μορίων, που ίσως να ανέστελλαν τις αντιδράσεις των PCR για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω την μορφή του γονιδιώματος του ιού χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο APOT, την πλέον διαδεδομένη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μορφής του DNA του HPV-16. Η διαδικασία αυτή διαχωρίζει τα ιικά μετάγραφα που προέρχονται από διαφορετικές μορφές ιικών γονιδιωμάτων (επισωματικά ή ενσωματωμένα). Η όλη μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση μεταγράφων του ιού, χρησιμοποιώντας έναν poly-A εκκινητή συνδεδεμένο με ένα μόριο “προσαρμοστή” (linker) για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής. Επιπλέον για την ενίσχυση των μεταγράφων πραγματοποιήθηκε PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδίζονται σε αλληλουχία του E7 γονιδίου και της αλληλουχίας του “προσαρμοστή”.

Από τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου με βάση το μέγεθος της ζώνης ενίσχυσης παρατηρείται ότι ο ιός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή στις HG αλλοιώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα από την ενίσχυση του E2 γονιδίου. Αντιθέτως στις LG αλλοιώσεις παρατηρήσαμε ότι ο ιός βρίσκεται ταυτόχρονα σε επισωματική και ενσωματωμένη μορφή και ότι ο ιός φέρει ακέραιη την αλληλουχία του E2 γονιδίου. Επομένως η θέση ρήξης του ιού στα ενσωματωμένα στελέχη των δειγμάτων αυτών είναι πιθανόν να συμβαίνει εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E1 καθώς όπως έχει αναφερθεί αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή θέση ρήξης του γονιδιώματος του HPV-16.

Για τον λόγο αυτό ένας μελλοντικός στόχος είναι η παράλληλη μελέτη του γονιδίου E1. Συμπεραίνουμε ότι για να προσδιορίσουμε με ακρίβεια την κατάσταση του γονιδιώματος του ιού είναι αναγκαία η μελέτη των γονιδίων E1 και E2 σε συνδυασμό με την μέθοδο APOΤ.

Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνουμε ότι καθώς αυξάνεται ο βαθμός αλλοίωσης ο ιός βρίσκεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ενσωματωμένη κατάσταση, ενώ σε χαμηλού βαθμού δυσπλασίες ο ιός βρίσκεται ταυτόχρονα και στις δύο μορφές επισωματική και ενσωματωμένη. Παράλληλα παρατηρήσαμε ότι η ρήξη συμβαίνει σε τυχαίες περιοχές εντός του γονιδίου E2, ενώ η απόκλιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της μελέτης του E2 γονιδίου και της μεθόδου APOΤ σε κλινικά δείγματα χαμηλής αλλοίωσης, ίσως να οφείλεται λόγω ταυτόχρονης ρήξης του γονιδιώματος του HPV-16 εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και άλλων γενωμικών περιοχών εκτός του γονιδίου E2 όπως το γονίδιο E1. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ενσωμάτωση αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι ο προσδιορισμός της ενσωμάτωσης του στελέχους HPV-16 μπορεί να αποτελέσει ένα καλό μοριακό δείκτη για την εμφάνιση νεοπλασίας.

Τέλος μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και ένας μελλοντικός στόχος είναι ο προσδιορισμός της περιοχής ενσωμάτωσης του ιού στο χρωμόσωμα του ξενιστή με στόχο να μελετηθεί ο ρόλος που μπορεί να παίζει η θέση αυτή στην ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και την εμφάνιση καρκίνου. Ο στόχος αυτός είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την διαδικασία της APOΤ. Τα μετάγραφα που προέρχονται από ενσωματωμένα ιικά γονιδιώματα φέρουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες. Η απομόνωση των προϊόντων της PCR και η αλληλούχηση μπορούν να μας δώσουν την κυτταρική αλληλουχία έτσι ώστε να προσδιορίσουμε με την βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής την ακριβή περιοχή ένθεσης του ιού.

8. Βιβλιογραφία

- 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.
- Antonsson A, McMillan NA, 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM, 2006 . Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer *J Clin Microbiol.*(5):1755-62.
- Artandi SE, Attardi LD, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*(3):881-90.
- Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS, 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res.* (1-2):208-11.
- Baker T.S., Newcomb,W.W., Olson,N.H., Cowser,L.M., Olson,C. and Brown,J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60:, 1445–1456.
- 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.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT, 1991. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential *J Virol.* (1):292-8.
- Bechtold V, Beard P, Raj K., 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* (3):2021-8.
- 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, 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
- Bosch, FX 1995.Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst;* 87:796-802.
- Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol.* (6):3846-50.

- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes EMBO J.(22):5451-9.
- Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. EMBO J. 18:2449-2458.
- Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen, 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. Virol J. 4: 3.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004 Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J Virol. (2):751-7.
- Cates W Jr, and the American Social Health Association Panel. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. Sex Transm Dis.1999;26(4suppl):S2-S7.
- 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.
- Clertant P, Seif I, 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? Nature. 311(5983):276-9.
- Cole ST, Danos O., 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. J Mol Biol. 4):599-608.
- 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.
- Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG , 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. Mol Pathol. (5):275-82.
- Couturier J., Sastre-Garau X., Schneider-Maunoury S., Labib A., Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. J. Virol., 65: 4534-4538, 1991.
- Monica Crica, Simona Ventrucoli, Elisa Leo, Silvano Costa, Monica Musiani, Marialuisa Zerbini. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. Journal of Virological Methods 158 (2009) 180-183.
- Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid III, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. EMBO J. 6:3745-3753.

- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND., 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells 1: J Virol. (18):8940-50.
- 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.
- Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J, 2002. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. J Virol. (19):9806-18.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT, 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. Proc Natl Acad Sci U S A. (39):14252-7.
- 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.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hauzen H., 2004. Classification of papillomaviruses . Virology. 324:17-27.
- 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.
- Von Knebel Doeberitz, M.,Bauknecht, T.,Bartsch, D., and Zur Hauzen, H. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1411-1415, 1991.
- Doorbar J, 2006 Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer Clinical Science 110, (525–541).
- 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.
- Durst M, Croce C, Gissmann L, et al. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84.
- Dyson N. Guida P, Münger K, Harlow E. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins J Virol. Dec;66(12):6893-902.
- 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.

- Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK. 2006. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology*. (2):271-9.
- Fay A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J., 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol*. (24):13447-54.
- Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins., 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol*. 77:2819-2831.
- Ferlay, J., F. Bray, P. Pisani, and D. M. Parkin., 2001. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC Press, Lyon, France.
- Fields, B. N., D. Knipe, and P. M. Howley (ed.), 1996. *Fields virology*, 3rd ed., p. 2060. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. (8):4818-26.
- 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.
- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. 2002 .Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. (19):10009-14.
- Fraiser, LD et al 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360.
- Francis DA, Schmid SI, Howley PM, 2000. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol*.(6):2679-86.
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 11:2090-2100.
- Howley P.M, 1996 *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication*. Raven Press, New York, NY.
- Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M, 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol*. 44(6):2025-31.
- Gillison, 2001. *J. National Cancer inst*.
- 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.

- Gravitt, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple., 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38:357-361
- Ham J, Steger G, Yaniv M., 1994. Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.*(1):147-57.
- 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.
- 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.
- Heise A., 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19.
- Herrick J, Conti C, Teissier S, et al. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65.
- Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* (9):4431-9.
- Holt SE, Wilson VG, 1995 .Mutational analysis of the 18-base-pair inverted repeat element at the bovine papillomavirus origin of replication: identification of critical sequences for E1 binding and in vivo replication. *J Virol.* (10):6525-32
- Howley P., 1996 *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.
- 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.
- 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.
- Jacobs, M. V., A. M. de Roda Husman, A. J. van den Brule, P. J. Snijders, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers., 1995. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 33:901-905.
- Jeon, S., and Lambert, P.F. Integration of human papilloma virus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1654-1658, 1995.

- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59.
- Kleter, B., L. J. van Doorn, L. Schrauwen, A. Molijn, S. Sastrowijoto, J. ter Schegget, J. Lindeman, B. ter Harmsel, M. Burger, and W. Quint. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 37:2508-2517.
- 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.
- Ko, L., and C. Prives. ,1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lehn H., Villa L. L., Marziona F., Hilgarth M., Hillemans H. G., Sauer G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J. Gen. Virol.*, 69: 187-196, 1988.
- Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D., 2004. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol.* (3):478-83.
- Liu, J. P. ,1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
- 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.
- Longworth, M. S., and L. A. Laimins., 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541.
- Mahdavi A, Monk BJ. ,2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
- Mansky KC, Batiza A, Lambert PF, 1997. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol.* 10:7600-8.

- Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA, 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit J Virol.72(9):7407-19.
- Munger, K., B. Werness, N. Dyson, W. Phelps, E. Harlow, and P. Howley., 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J. 8:4099-4105.
- Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer N Engl J Med.348(6):518-27.
- Mupoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D,et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate andscreen? The international perspective. Int J Cancer 2004;111:278-85.
- 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.
- Parkin D.M., Bray,F.I. and Devesa,S.S. ,2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur. J. Cancer, 37:, S4-S66.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int. J. Cancer 94:153-156.
- Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N, 2006. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response .Proc Natl Acad Sci U S A. (10):3822-7.
- Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault , Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault, 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 29, 26765-26772.
- Pfister, H., 2003. Human papillomavirus and skin cancer. J. Natl. Cancer. Inst. Monogr. 31, 52-56.
- Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P, 2004. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. J Virol. (13):7199-207.
- Roberto Flores-Munguia, Erin Siegel,Walter T. Klimecki, and Anna R. Giuliano, 2004. Performance Assessment of Eight High-Throughput PCR Assays for Viral Load Quantitation of Oncogenic HPV Types. Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 6, No. 2,
- Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. ,1997. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable

for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol.*(5):3554-62.

- 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.
- Romanczuk H, Thierry F, Howley PM, 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol.* Jun;64(6):2849-59.
- Sasagawa, T., Y. Minemoto, W. Basha, H. Yamazaki, M. Nakamura, H. Yoshimoto, J. Sakaike, and M. Inoue. ,2000. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res.* 67:127-139.
- 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.
- Sedman J, Stenlund A., 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol.* (8):6893-7.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R., 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* (24):13125-35.
- 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.
- Singer, A., L. Ho, G. Terry, and T. S. Kwie., 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, p. 105-129. In A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection.* Edward Arnold, London, United Kingdom.
- 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.
- Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B., 2004. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.*74(1):107-16.
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B., 2004 Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42(7):3176-84.
- 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.

- 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.
- Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU, 2002. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology.* 305(2):486-501.
- Tan SH, Gloss B, Bernard HU, 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.*(2):251-6.
- Titolo S., E. Welchner, P. W. White, and J. Archambault , 2003. Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy. *J Virol.* (9): 5512–5518.
- Thorner LK, Lim DA, Botchan MR, 1993 . DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol.* (10):6000-14.
- Ustav M, Stenlund A, 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames *EMBO J.*(2):449-57.
- 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.
- 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.
- Weimin Qu, Gang Jiang, Yvette Cruz, Chee Jen Chang, Gloria Y. F. Ho, Roberts S. Klein, and Robert D. Burk. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems.
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64
- Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA., 2005. Role of the E1--E4 protein in the
- differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* (11):6732-40.
- Y Modis, Trus BL, Harrison SC, 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* (18):4754-62.
- 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.

- Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW., 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):668-73.
- Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
- Zur Hausen, H, 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.*1288(2):F55-78.
- Zur Hausen, H, 2000 *J. National Cancer inst.*
- Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.