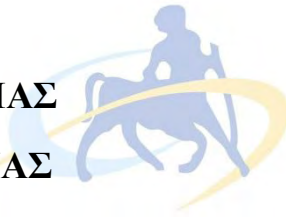


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Γενωμική και Φυλογενετική Ανάλυση της
Ε1 Γενωμικής Περιοχής Στελεχών HPV 16**



Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

ΔΑΡΜΗΣ ΦΡΑΓΚΙΣΚΟΣ

Λάρισα 2011

Στοιχεία πτυχιακής εργασίας

Το εργαστηριακό – πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο **“Γενομική και Φυλογενετική Ανάλυση της Ε1 Γενομικής Περιοχής Στελεχών HPV 16”** πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας - Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2009 – Δεκέμβριος 2010 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτου.

Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής : Π. Μαρκουλάτος
Δ. Μόσιαλος
Δ. Καρπούζας

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας : 16 Φεβρουαρίου 2011

Στους γονείς μου, Μιχάλη και Ήρα

Πρόλογος

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω δημοσίως τον καθηγητή μου, κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση και την επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για την καθοδήγησή και την βοήθειά του, και κυρίως, για όλες τις γνώσεις που μου μετέφερε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Ιδιαίτερα, όμως, θέλω να εκφράσω την εκτίμησή μου προς το πρόσωπό του και την ευγνωμοσύνη που νιώθω για την δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της ιολογίας και της μοριακής ογκογένεσης και κυρίως για την δυνατότητα που μου έδωσε να έρθω σε μία πρώτη επαφή με τον χώρο της επιστημονικής έρευνας.

Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτρη Καρπούζα και τον λέκτορα κ. Δημήτρη Μόσιαλο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας μου καθώς και για όλες τις γνώσεις που μου μετέφεραν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ πολύ επίσης, τον κ. Β. Σκορδά, την κα. Χ. Νέπκα και την κα. Ε. Πανοτοπούλου για την ευγενική προσφορά των κλινικών δειγμάτων.

Επιπλέον, θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες Δημήτρη Τσακογιάννη και Ειρήνη Ρούτερ, καθώς και στους διδάκτορες Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου και Βάια Πλιάκα για την αμέριστη βοήθειά τους, την συμπαράστασή τους και για το ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον που αναπτύξαμε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας στο εργαστήριο. Κυρίως, όμως, θέλω να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Τσακογιάννη για την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή του και την εμπιστοσύνη του απέναντί μου. Το ενδιαφέρον του και η φιλική του διάθεση ήταν εμφανή από την πρώτη κιόλας ημέρα, πράγμα που με βοήθησε ιδιαίτερα και για το οποίο τον εκτιμώ βαθύτατα.

Τέλος, θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους φοιτητές Τηλέμαχο Δημητρίου, Ιπποκράτη Πατάκο, Χαρά Αχιλλέως και όλους τους άλλους συναδέλφους για το εύθυμο κλίμα και για όλες τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί στον χώρο του εργαστηρίου.

Περιεχόμενα

Στοιχεία πτυχιακής εργασίας	2
Πρόλογος	4
Περιεχόμενα.....	5
Περίληψη	7
1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)	9
1.1. Ταξινόμηση των Papillomaviruses.....	9
1.1.1. Alpha-papillomavirus	10
1.1.2. Beta-papillomavirus.....	11
1.1.3. Gamma, Mu, Nu Papillomavirus	12
1.2. Γενικά χαρακτηριστικά του ιού.	12
2. Δομή των Human Papilloma Viruses (HPV)	16
2.1. Δομή του ιικού καψιδίου.....	16
2.2. Οργάνωση του ιικού γενώματος	18
2.2.1. Η ιική πρωτεΐνη E1	19
2.2.2. Η ιική πρωτεΐνη E2.....	21
2.2.3. Το ιικό γονίδιο E3.....	22
2.2.4. Η ιική πρωτεΐνη E4.....	22
2.2.5. Η ιική πρωτεΐνη E5	23
2.2.6. Η ιική πρωτεΐνη E6.....	24
2.2.7. Η ιική πρωτεΐνη E7.....	26
2.2.8. Το ιικό γονίδιο E8.....	28
2.3. Μορφή του ιικού γενώματος.....	30
3. Ο κύκλος ζωής των HPV.....	31
3.1. Είσοδος του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα.....	31
3.2. Αντιγραφή του ιικού γενώματος.....	32
3.3. Μεταγραφή του ιικού γενώματος.....	32
3.4. Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	34
3.5. Ιστολογικές αλλοιώσεις στην περιοχή της μήτρας.	35
4. Κλινικές Εκδηλώσεις.....	37

4.1.	Τρόπος μετάδοσης του HPV	37
4.2.	Στατιστικά στοιχεία.....	38
5.	Υλικά και Μέθοδοι.....	40
5.1.	Κλινικά Δείγματα.....	40
5.2.	Προετοιμασία DNA	42
5.3.	Εκκινητικά μόρια PCR για την ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων του E1 γονιδίου... ..	42
5.4.	Ενίσχυση του E1 γονιδίου με μεθόδους PCR	47
5.4.1.	Απλή PCR.....	47
5.4.2.	AutoNested PCR.....	48
5.5.	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR και AutoNested PCR.....	50
5.6.	Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA που συλλέχθηκαν	50
5.6.1.	AutoNested GoTaq PCR.....	51
5.6.2.	Απομόνωση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης.....	52
5.6.3.	Αντίδραση Λιγάσης	53
5.6.4.	Παραγωγή δεκτικών κυττάρων.....	53
5.6.5.	Μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων	54
5.6.6.	Κλωνοποίηση των μετασηματισμένων κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια	54
5.7.	Απομόνωση των φορέων από τα πλασμίδια.	55
5.8.	Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης	55
5.9.	Αλληλούχιση των προϊόντων	56
6.	Επεξεργασία των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής	57
7.	Αποτελέσματα	58
7.1.	Αποτελέσματα PCR και AutoNested PCR	58
7.2.	Αποτελέσματα Κλωνοποίησης.....	62
7.3.	Φυλογενετική ανάλυση της E1 περιοχής των στελεχών των κλινικών δειγμάτων.....	64
7.4.	Γενομική ανάλυση της E1 περιοχής των στελεχών των κλινικών δειγμάτων.....	69
8.	Συζήτηση	78
	Βιβλιογραφία	83

Περίληψη

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses – PVs) ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από τον Francis Peyton Rous και ανήκουν στην οικογένεια των papillomaviridae. Η ονομασία τους προέρχεται από την λατινική λέξη papilla που μεταφράζεται ως θηλή και την ελληνική κατάληξη oma, που σημαίνει όγκος. Πρόκειται για ομάδα ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα γύρω από το καψίδιό τους και με δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους περίπου 8.000 ζευγών βάσεων.

Μολύνουν μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα πτηνά μέχρι τα θαλάσσια θηλαστικά. Μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής και έχουν παγκόσμια κατανομή. Προσβάλλουν και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά σε κερατινοκύτταρα (επιθηλιότροποι ιοί) και μεταδίδονται εξαιρετικά σπάνια από ένα είδος σε ένα άλλο. Ορισμένοι τύποι του ιού ευθύνονται για την πρόκληση αλλοιώσεων στο επιθήλιο του δέρματος (θηλώματα) και στο επιθήλιο του βλεννογόνου (κονδυλώματα) οι οποίες είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε κακοήθη όγκο και στην εμφάνιση καρκίνου. Ο Ιός των Θηλωμάτων του Ανθρώπου (HPV) απέκτησε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον όταν διαπιστώθηκε ότι προκαλεί μια σειρά δερματικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο.

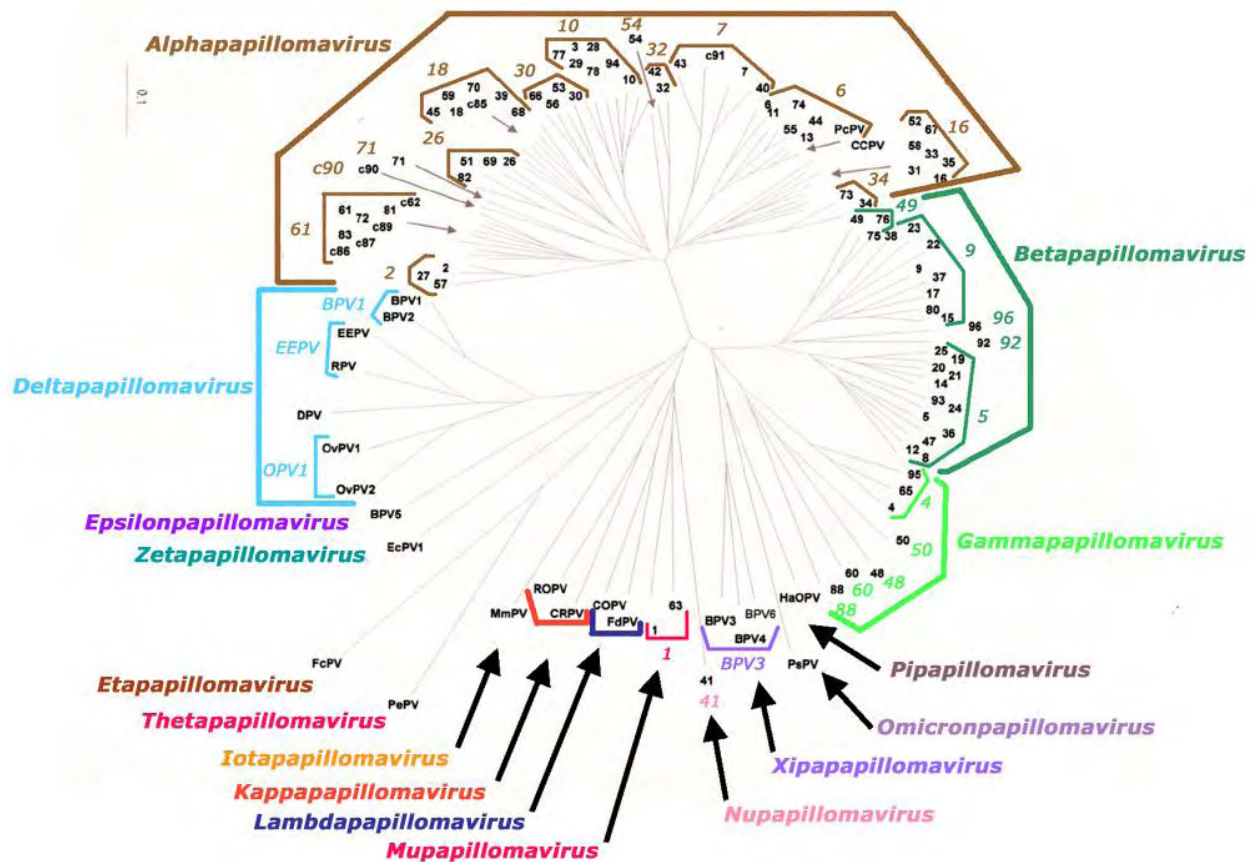
Έχουν αναγνωριστεί πλήρως περισσότεροι από 120 γενότυποι HPV και περίπου το ένα τρίτο από αυτούς μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και αναπτύσσεται στη γεννητική περιοχή των ατόμων. Οι περισσότερες λοιμώξεις από HPV είναι ασυμπτωματικές, όμως, κάποιοι ιοί HPV προκαλούν ένα ευρύ φάσμα από καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις στον άνθρωπο και είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση κοινών θηλωμάτων έως και την εμφάνιση καρκίνου στον τραχήλου της μήτρας, στο αιδοίο, στον πρωκτό και στο πέος. Οι ιοί HPV ταξινομούνται σε τύπους χαμηλής ή υψηλής επικινδυνότητας σύμφωνα με το βαθμό αλλοίωσης που προκαλούν στον ιστό που προσβάλλουν. Οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου σχετίζονται με το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, από τις οποίες ο HPV-16 ευθύνεται για το 50% αυτών ενώ ο HPV-18 για το 10 – 20%. Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά μόλυνσης παραμένουν αρκετά υψηλά. Για τον λόγο αυτό έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην μελέτη τους και γίνεται εκτεταμένη προσπάθεια στην ανάπτυξη κατάλληλων εμβολίων για την καταπολέμησή τους.

1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)

1.1. Ταξινόμηση των Papillomaviruses

Αρχικά οι papilloma ιοί είχαν κατηγοριοποιηθεί μαζί με τους polyomaviruses σε μία μεγάλη υπερκογένεια, των Papovaviridae. Αυτή η σύνδεση βασιζόταν στην ύπαρξη παρόμοιων καψιδίων που στερούνται εξωτερικού περιβλήματος και στο παρόμοιο γένωμα κυκλικού δίκλωνου DNA. Αργότερα αποδείχθηκε ότι τα δύο είδη ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, τελείως διαφορετική οργάνωση γονιδιώματος και καμία σημαντική ομοιότητα νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών. Έτσι, πλέον αναγνωρίζονται ως δύο ξεχωριστές οικογένειες από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses – ICTV), τις οικογένειες των papillomaviridae και των polyomaviridae. Παρά την έλλειψη ομολογίας ανάμεσα στα ιικά γενώματα των δύο οικογενειών, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μοτίβο ελικάσης του γονιδίου E1 των papilloma ιών, περιοχή που εκτείνεται σε μέγεθος πάνω από 230 αμινοξέα, εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με το SV-40 T αντιγόνο, με την πρωτεΐνη NS1 των parvoviruses και ενός στοιχείου πλανάριας (Rebrikov et al., 2002). Παρά το γεγονός ότι τα αντίστοιχα μοτίβα ελικάσης είναι αναμφισβήτητα ομόλογα, δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι υπάρχει μονοφυλετική ύπαρξη αυτών των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων ιών.

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενομάτων (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 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 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 1.1: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών.

1.1.1. Alpha-papillomavirus

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο γένος και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Το γένος των Alpha-papillomaviruses συμπεριλαμβάνει επίσης και τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 40 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV 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)	16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68,73,82,83
Χαμηλού κινδύνου (Low risk)	26,53,66
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle risk)	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81

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

1.1.2. Beta-papillomavirus

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

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

1.1.3. 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 2.1) 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.

1.2. Γενικά χαρακτηριστικά του ιού.

Οι papilloma ιοί είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους περίπου 7900 bp και περιβάλλονται από εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο με 72 καψομερίδια. Οι PV στερούνται περιβλήματος και είναι κατά συνέπεια ανθεκτικοί σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. 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 και διαφόρων τύπων καρκίνοι.

Παρά το μικρό τους μέγεθος, η μοριακή βιολογία τους είναι αρκετά πολύπλοκη. Εν συντομία, τρία ογκογονίδια, τα E5, E6, και E7 επάγουν τις διαδικασίες των αλλοιώσεων, δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι E1 και E2, ρυθμίζουν την αντιγραφή και την μεταγραφή, και δύο δομικές πρωτεΐνες, οι L1 και L2, συνθέτουν το ιικό καψίδιο. Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των γονιδίων E1, E2, L1 και L2 είναι ιδιαίτερα διατηρημένα σε όλα τα μέλη της οικογένειας papillomaviridae. Τα περισσότερα cis ρυθμιστικά στοιχεία εντοπίζονται στην περιοχή LCR (Long Control Region) ενδιάμεσα των γονιδίων L1 και E6. Πρόκειται για μία περιοχή ελάχιστα συντηρημένη. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το γένωμα των PV είναι ιδιαίτερα στατικό και ότι η εμφάνιση μεταλλάξεων προκύπτει με ρυθμούς περίπου ίδιους με αυτούς των οργανισμών

ξενιστών. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αντιγραφή του ιικού γενώματος, με εξαίρεση την πρωτεΐνη E1 συντελείται αποκλειστικά από τους μηχανισμούς των κυττάρων – ξενιστών.

Μέχρι τον 19^ο αιώνα δεν είχε εντοπιστεί η προέλευση γενετικών αλλοιώσεων από τον ιό. Αν και οι αλλοιώσεις είχαν αναγνωριστεί ήδη από τους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, ομαδοποιήθηκαν με τις σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες όπως η σύφιλη και η γονόρροια. Αποδείχτηκε όμως από τις αρχές του 20ου αιώνα ότι ο ιός διαβιβάστηκε από διηθήματα κυττάρων και προσδιορίστηκε και σε διάφορα άλλα σπονδυλωτά είδη εκτός από τον άνθρωπο (Hoogy T. et al 2008). 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 από γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα ανακαλύφθηκε, ότι συγκεκριμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papilloma Viruses) σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως.

Σημαντική πρόοδο κατά τις δεκαετίες 1950-60 αποτελεί η απόδειξη ότι η αντιγραφή του ιού σχετίζεται με τη διαδικασία διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων που ο ιός μολύνει. Η μοριακή κλωνοποίηση επέτρεψε στους επιστήμονες να κλωνοποιήσουν τα γονιδιώματα των papillomaviruses και ως αποτέλεσμα ενισχύθηκε κατά ένα μεγάλο μέρος το ενδιαφέρον για τη μελέτη των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των ιών αυτών. Η αλληλούχιση επέτρεψε τον προσδιορισμό των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) που προέρχονται από γονίδια του ιού και η αντίστροφη γενετική επέτρεψε τον καθορισμό της λειτουργίας των γονιδίων (Howley P., Lowy D. 2007).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 120 διαφορετικοί τύποι HPV, ενώ πολυάριθμοι θεωρητικά καινούργιοι τύποι έχουν χαρακτηριστεί (Zur Hausen 2000). Περίπου το ένα τρίτο των 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 τύποι HPV προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι βλεννογόνοι HPV τύποι προσβάλλουν το βλεννογόνο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, του ανώτερου αναπνευστικού σωλήνα και του οισοφάγου και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα εμφάνισης ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Οι βλεννογόνοι HPV ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η πρώτη ομάδα είναι η ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση καρκίνου, συνήθως στο ουρογεννητικό σύστημα. Δεύτερη, είναι η ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος, ακολουθεί η ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk), τα μέλη της οποίας εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο, άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz N.et al 2003). Οι τύποι υψηλού κινδύνου ευθύνονται για το 90% των περιστατικών καρκίνου της μήτρας. Από αυτά τα περιστατικά, για το 50% ευθύνεται ο HPV-16, ενώ ο HPV-18 σχετίζεται με ένα ποσοστό της τάξεως του 10 – 20%. Ωστόσο, παρά το γεγονός πως η παρουσία ιών HPV “υψηλού κινδύνου” έχει προταθεί ως αναγκαία συνθήκη για την αθανатоποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, πειράματα in vitro έχουν δείξει πως η μόλυνση από μόνη της δεν είναι ικανή να οδηγήσει στον κακοήγη μετασχηματισμό του τραχήλου της μήτρας. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται στην κλινική πράξη, τόσο λόγω της χαμηλής επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με την ευρεία διασπορά των ιών HPV παγκόσμια, όσο και λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που διαρκεί η εξέλιξη της HPV-επαγόμενης νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας. Επιπρόσθετα, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων του κυττάρου ξενιστή, συμμετέχουν στην εξέλιξη της λοίμωξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Narisawa-Saito M, Kiyono T. 2007).

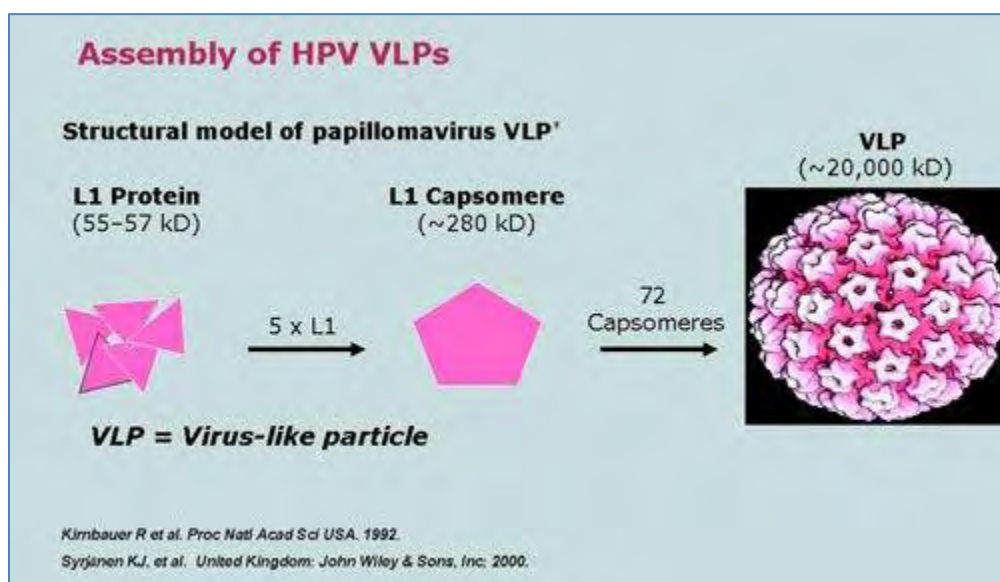
Εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ο HPV σχετίζεται επίσης, με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, του αιδοίου και του πρωκτού. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους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

Το τραχηλικό τεστ Παπανικολάου (pap test) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό κυτταρικών ανωμαλιών και την ύπαρξη του HPV στην περιοχή της μήτρας. Έτσι, καθίσταται δυνατή η χειρουργική αφαίρεση κονδυλωμάτων και προ-καρκινικών αλλοιώσεων, πριν εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Παρόλο που η χρήση του test pap έχει μειώσει την θνησιμότητα και την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου στις ανεπτυγμένες χώρες, η ασθένεια εξακολουθεί να αποτελεί αιτία θανάτου για χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο ανά τον κόσμο. Σύμφωνα με μελέτες του 2010, προκύπτουν ετησίως 400.000 κρούσματα καρκίνου της μήτρας

και 250.000 θάνατοι. Για αυτόν τον λόγο έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη ιατρική κοινότητα προς την διεξοδική μελέτη του ιού και στην προσπάθεια ανάπτυξης ικανών εμβολίων για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, τουλάχιστον από τους τύπους υψηλής επικινδυνότητας.

Πρόσφατα, εγκρίθηκε η χρήση δύο εμβολίων τα οποία αποτρέπουν την μόλυνση από τους πιο επικίνδυνους ογκογόνους τύπους HPV. Ο εμβολιασμός και η επακόλουθη ανάπτυξη αντισωμάτων προφυλάσσει από τους τύπους 16 και 18 κατά περίπου 100%, δηλαδή για τους δυο πιο επικίνδυνους για πρόκληση καρκίνου τύπους HPV, οι οποίοι ευθύνονται συνολικά για το 70% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου της μήτρας. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο συνδυασμός εμβολιασμού και τακτικού προληπτικού ελέγχου με το test pap μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας κατά 94%.

Το ικό καψίδιο συντίθεται από 72 πενταμερή (καψομερίδια) της πρωτεΐνης L1 με την συμβολή 12 ή περισσότερων αντιγράφων της πρωτεΐνης L2. Τα πενταμερή της κύριας όψιμης πρωτεΐνης, L1, έχουν την ιδιότητα να αυτό-συναρμολογούνται αυθόρμητα σε άδεια καψίδια τα οποία σταθεροποιούνται με ισχυρούς δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών L1 μορίων. Τα τελευταία αναφέρονται ως VLPs (Virus Like Particles). Τα VLPs είναι δομικά και ανοσολογικά όμοια με τους μολυσματικούς ιούς, όπως προκύπτει από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και από την δυνατότητά τους να συνδέονται με μονοκλωνικά αντισώματα εξαρτώμενα από την χωροδιάταξη (Brooke Bishop 2007) (Εικόνα 2.3).



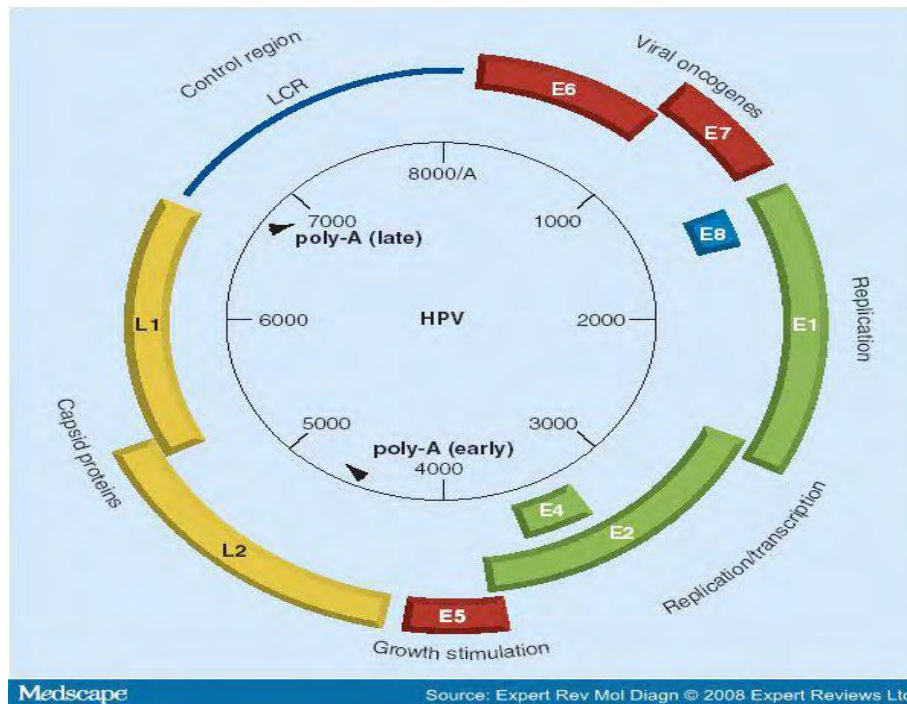
Εικόνα 2.3: Ο σχηματισμός των καψομεριδίων από πενταμερή L1 και η σύνθεση των VLPs.

Η πρωτεΐνη L2 βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή στο ιοσωμάτιο, με τα δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης να σχηματίζουν διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό. Η πρωτεΐνη L2 σε συνεργασία με την L1 φαίνεται ότι ευθύνεται για το πακετάρισμα του ιικού DNA στα ιοσώματα. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι L1 και L2 αλληλεπιδρούν με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες κατά την διαδικασία της μόλυνσης των κυττάρων από τον ιό.

Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του L1 είναι ιδιαίτερα συντηρημένο. Έτσι, εμβόλια που περιέχουν VLPs τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη L1 από διάφορους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας, έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά εναντίων μολύνσεων από τον ιό.

2.2. Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γονιδίωμα των Papilloma ιών όπως έχει αναφερθεί είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μεγέθους περίπου 7.900 ζευγών βάσεων. Στα ιικά σωματίδια το DNA βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια μορφή που μοιάζει με χρωματίνη (Howley P.M 1996). Το γονιδίωμα όλων των papilloma ιών φέρει συνήθως 8 κύρια ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF), τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNAs που μεταφράζονται από τον έναν κλώνο του DNA (Zhi-Ming Zheng et al 2006) (Michelle S. Longworth et al 200).



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του ιικού γενώματος.

Το γένωμα όλων των papilloma ιών αποτελείται από τρεις βασικές περιοχές. Αυτές οι περιοχές είναι η LCR (ή URR), η πρώιμη περιοχή (E) και η όψιμη περιοχή (L). Η LCR είναι μία ρυθμιστική περιοχή η οποία περιέχει αλληλουχίες που ρυθμίζουν την ιική αντιγραφή και μεταγραφή. 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 (Demeret et al 1995, Shyh-Han Tan et al 2002). Η πρώιμη περιοχή (E=Early) αποτελείται από ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF), τα E1, E2, E4, E5, E6 και E7,

τα οποία συμμετέχουν σε πολλαπλές λειτουργίες όπως η trans-ενεργοποίηση της μεταγραφής, ο μετασχηματισμός, η αντιγραφή του γενώματος και η προσαρμογή του ιού σε διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα (Danos O. et al 1982). Η όψιμη περιοχή (L=Late) κωδικοποιεί για τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες, όπως αναφέρθηκε, συνθέτουν τη δομή του ιοσώματος και συμμετέχουν στο πακετάρισμα του ιικού DNA.

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).

2.2.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Το πιο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης είναι αυτό που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E1. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολύ-λειτουργική 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). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστικότητα 3',5' ελικάσης, ATPάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α .

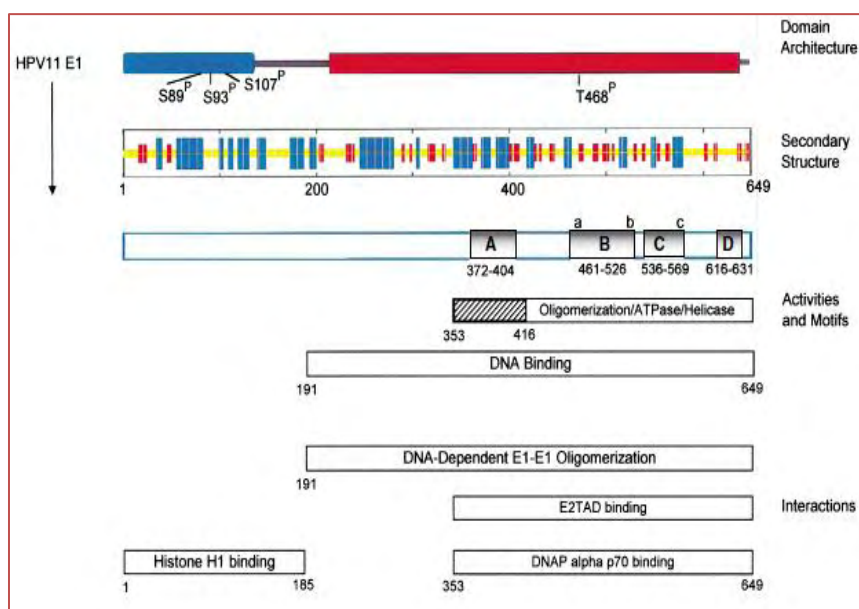
Παρουσία ATP, η E1 προσδένεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα A και T προκαλώντας δομικές αλλαγές (Shawn E. Holt and Van G. Wilson 1995) (Frattini et al 1994, Muller et al, 1997). Σαν πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους. Πρώτον, δρα σαν πρωτεΐνη πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον, δρα σαν ελικάση με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει το DNA στη θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρά η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et al 1995). 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).

Η E1 προσδένεται 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 (Sedman J et al 1998). Τα εξαμερή αυτά έχουν υψηλή συγγένεια με το DNA, το οποίο περνά από το κέντρο του εξαμερούς δακτυλίου, και έτσι, με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (chaperone proteins) ξετυλίγουν αποτελεσματικά τις αλυσίδες του DNA. Η E2 επομένως λειτουργεί σαν παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσής της και επιπρόσθετα σαν παράγοντας που συναρμολογεί τα E1 μονομερή (Liu J.S et al 1995).

Η E1 επίσης δεσμεύει την DNA πολυμεράση και βοηθά στην στρατολόγηση των κυτταρικών συμπλόκων στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μπορεί επίσης να στρατολογηθεί από την E1 ώστε να διαμορφωθεί το νουκλεόσωμα και να επιτραπεί η έναρξη της αντιγραφής. Η περιοχή του DNA όπου δεσμεύεται η E1, αποτελείται από μια εκτεταμένη θηλιά και μια α-έλικα που παίζουν ρόλο στην αναγνώριση του DNA. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της E1 και των κυκλικών A και E ρυθμίζει την δραστικότητα της E1. Επιπλέον, στην E1 βρίσκονται 4 θέσεις φωσφορυλίωσης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ενώ πιθανές μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές μειώνουν την δραστικότητα της E1 (Longworth M.S, Laimins L.A 2004).

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

Εικόνα 2.5: Γραμμική αναπαράσταση της E1 πρωτεΐνης του ιού HPV-11. Παρουσιάζονται οι περιοχές της πρωτεΐνης και οι λειτουργίες τους.



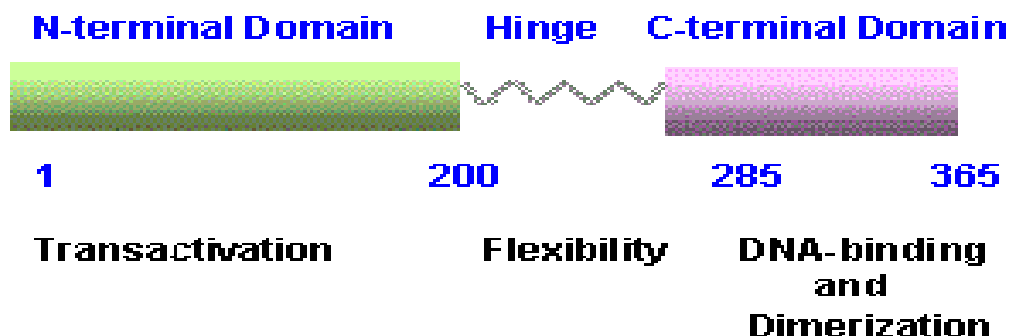
2.2.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 είναι αναγκαία για την αντιγραφή του ιικού γενόματος και για την ρύθμιση της μεταγραφής. Λειτουργεί ως κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής για ιικούς υποκινητές που βρίσκονται κυρίως στην περιοχή LCR. Οι πρωτεΐνες E2 έχουν μέγεθος περίπου 50 kDa και λειτουργούν ως διμερή. Το καρβοξυτελικό άκρο κωδικοποιεί για μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA, η οποία έχει κρυσταλλοποιηθεί και φαίνεται να σχηματίζεται από μία διμερή μορφή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA. Επίσης, το αμινοτελικό άκρο περιέχει μία περιοχή trans-ενεργοποίησης και το καρβοξυτελικό άκρο, προσδένεται στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής αφού πρώτα συνδεθεί με την πρωτεΐνη E1. Ανάμεσα στις δύο αυτές περιοχές υπάρχει μία περιοχή “άρθρωσης” (hinge) η οποία είναι σχετικά μη συντηρημένη. Η πρωτεΐνη E2 στρατολογεί μία κυτταρική πρωτεΐνη, την Brd4, για την ενσωμάτωση του ιικού γενόματος στα κυτταρικά χρωμοσώματα. Η ενσωμάτωση αυτή στον πυρήνα των κυττάρων εξασφαλίζει την διανομή του ιικού γενόματος σε κάθε θυγατρικό κύτταρο μετά την διαίρεσή του.

Τα διμερή της E2 δεσμεύονται στις παλινδρομικές αλληλουχίες ACCN6GGT που ονομάζονται E2BSs. Υπάρχουν 4 από αυτές τις αλληλουχίες στην περιοχή LCR ενώ 3 από αυτές πλαισιώνουν τις ακολουθίες αναγνώρισης E1 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής (Longworth M.S, Laimins L.A 2004). Κατά τη μόλυνση, η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων ενεργοποιείται αρχικά από κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται στις ακολουθίες στην περιοχή LCR (Steger et al, 1997). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 ενεργοποιεί περαιτέρω την έκφραση των πρώιμων γονιδίων ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων, όπως των TFIID και Sp1 στις E2BSs. Η E2 δρα, επίσης, ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Demeret et al 1997, Dostatni et al 1991). Η ρύθμιση της ιικής έκφρασης συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στη διαφοροποίηση υπάρχει μια αλλαγή στον όψιμο υποκινητή, ο οποίος δεν καταστέλλεται από την E2, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη έκφραση των E1 και E2 που οδηγεί στην ενίσχυση του ιικού DNA. Η E2 σχηματίζει, επίσης, σύμπλοκα με τους C/EBP μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλούς υποκινητές που παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση.

Θεωρείται ότι η E2 (όπως και η E1) δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7 στα βασικά κερατινοκύτταρα. Γενετικές αλλαγές, όπως η ενσωμάτωση του ιικού DNA στα χρωμοσώματα του ξενιστή, που απενεργοποιούν την έκφραση της E2,

τείνουν να οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό των κυττάρων και πιθανόν, περαιτέρω γενετική αποσταθεροποίηση. Εκτός από το ρόλο της στη ρύθμιση της μεταγραφής, η υπερέκφραση της E2 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση μέσω ενός ανεξάρτητου μηχανισμού της p53 (Longworth M.S, Laimins L.A 2004).



Εικόνα 2.6: Γραμμική αναπαράσταση της E2 πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται οι τρεις βασικές περιοχές της πρωτεΐνης και οι βασικές λειτουργίες τους.

2.2.3. Το μικρό γονίδιο E3

Αυτό το μικρό γονίδιο ανευρίσκεται μόνο σε μερικούς τύπους papilloma ιών. Δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ότι το γονίδιο μεταγράφεται σε κάποια πρωτεΐνη, και δεν φαίνεται να εκτελεί κάποια λειτουργία.

2.2.4. Η ιική πρωτεΐνη E4

Παρόλο που οι πρωτεΐνες E4 εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα κατά την πρώιμη φάση της ιικής μόλυνσης, η έκφρασή τους αυξάνεται δραματικά κατά την όψιμη φάση της μόλυνσης. Με άλλα λόγια, ο χαρακτηρισμός της ως πρωτεΐνη “E”, δηλαδή πρώιμη, είναι ίσως λανθασμένος. Στην περίπτωση του ιού HPV-1, οι πρωτεΐνες E4 αποτελούν ως και το 30% της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών στην επιφάνεια των θηλωμάτων. 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, 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).

Επίσης, 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 2004). Ιικά μεταλλάγματα ανάμεσα να εκφράσουν την πρωτεΐνη E4 εμφανίζουν ιδιαίτερα μειωμένη αντιγραφική ικανότητα, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό το πώς συμμετέχουν κατά την αντιγραφή του ιικού DNA. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η E4 συμμετέχει στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2. (Davy C.E et al 2002).

2.2.5. Η ιική πρωτεΐνη E5

Οι E5 είναι μικρές, ιδιαίτερα υδρόφοβες πρωτεΐνες οι οποίες αποσταθεροποιούν την λειτουργία πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών των μολυσμένων κυττάρων. Τοποθετούνται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στην συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et al 1993).

Η E5 πρωτεΐνη κάποιων τύπων που προσβάλλουν ζώα (κυρίως του BPV-1) λειτουργεί ως ογκογονίδιο κυρίως ενεργοποιώντας το μεταγωγικό μονοπάτι κυτταρικής αύξησης των αιμοπεταλίου-εξαρτώμενων υποδοχέων κυτταρικής αύξησης. Οι E5 πρωτεΐνες των HPV που σχετίζονται με καρκίνο ωστόσο, φαίνεται ότι ενεργοποιούν τον καταρράκτη σήματος που ξεκινά από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) μέσω σύνδεσης με τον προσδέτη. Αυτό

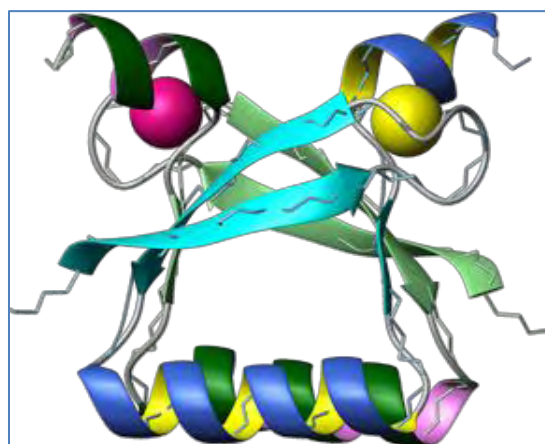
βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al 1993).

Η E5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολοκλήρου του γενώματος του HPV-31 έχει αποδειχθεί ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα καθώς επίσης και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrmann et al 2003). Πιο συγκεκριμένα όμως, η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores E.R et al 2000).

Οι E5 πρωτεΐνες των HPV-16 και HPV-2 φαίνεται ότι, επίσης, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση των επιφανειακών πρωτεϊνών του μείζονος συμπλόκων ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I. Αυτό ίσως προκαλεί ανθεκτικότητα των μολυσμένων κυττάρων ενάντια στα T κυτταροτοξικά κύτταρα.

2.2.6. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 151 αμινοξέα και περιέχει δύο χαρακτηριστικά μοτίβα δαχτύλων ψευδαργύρου. 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 είναι πρωτεΐνη ιδιαίτερης σημασίας διότι φαίνεται να διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους στα κύτταρα και να αντιδρά με μεγάλο αριθμό άλλων πρωτεϊνών.



Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης E6. Διακρίνονται τα δύο δάχτυλα Zn. (<http://nmr.imb-jena.de>)

Ο κύριος ρόλος της, ωστόσο, είναι να μεσολαβεί για την αποδόμηση της πρωτεΐνης 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

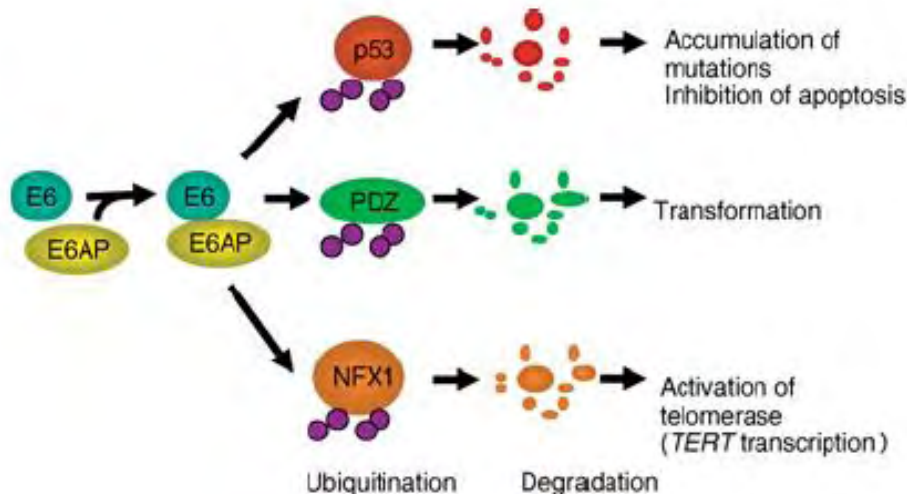
ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S.E et al 2005). Όσον αφορά στην σύνδεση του μονοπατιού αυτού με τον HPV, έχει διαπιστωθεί, ότι η E6 προσδέεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6AP (Huibregtse et al 1991). Ο σχηματισμός αυτού 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 συν-ενεργοποιητής της p53 (Huibregtse et al 1991). Αυτές οι επιδράσεις της E6 στην p53 οδηγούν σε μείωση της ικανότητας του κυττάρου να αντιδρά σε αλλοιώσεις του DNA.

Η E6 επίσης, φαίνεται να επιδρά και σε άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες μεταβάλλοντας έτσι διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Ένας τέτοιος στόχος είναι ο NFX1-91 που σε φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλει την παραγωγή τελομεράσης. Βασική δράση της τελομεράσης 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 θάνατό τους (Liu J.P. 1999). Όταν ο NFX1-91 αποδομείται από την E6, τα επίπεδα τελομεράσης αυξάνονται, απενεργοποιώντας έτσι, έναν βασικό μηχανισμό ελέγχου της κυτταρικής αύξησης.

Μια άλλη σημαντική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ που έχουν ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσής 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). Η E6 επίσης, αντιδρά με την οικογένεια πρωτεϊνών MAGUK (Membrane Associated GUanylate Kinase family). Πρόκειται για δομικές πρωτεΐνες που βοηθούν στη μεταγωγή σημάτων. Όταν οι πρωτεΐνες E6 συνδέονται με αυτές τις πρωτεΐνες αλλοιώνουν τη στερεοδιαμόρφωσή τους και έτσι εμποδίζεται η λειτουργία τους (Glaunsinger et al. 2000).

Επιπλέον, η E6 μπορεί να λειτουργήσει ως μεταγραφικός συμπαράγοντας, και ειδικότερα ως ενισχυτής της μεταγραφής, αντιδρώντας με τον κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα E2F1/DP1. Σε γενικές γραμμές, η πρωτεΐνη E6 δρα εμποδίζοντας την ομαλή λειτουργία πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει την αύξηση και την διαίρεση των κυττάρων στους αυξημένους ρυθμούς που είναι χαρακτηριστικοί σε περιπτώσεις καρκίνου. Καθώς η έκφραση

της E6 είναι αυστηρά απαραίτητη για την εμφάνιση κακοήθους φαινοτύπου σε καρκίνους από HPV, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ελκυστικό στόχο για την κατασκευή θεραπευτικών εμβολίων, σχεδιασμένων έτσι ώστε να απαλείφουν καρκινικούς όγκους στην μήτρα.



Εικόνα 2.8: Παρουσιάζονται σχηματικά οι κυριότερες λειτουργίες της πρωτεΐνης E6.

2.2.7. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα, ανευρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές. Αυτές είναι οι CR1, CR2 και 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 την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Dyson et al 1992). 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 αθάνατα κερατινοκύτταρα (Munger et al 1989).

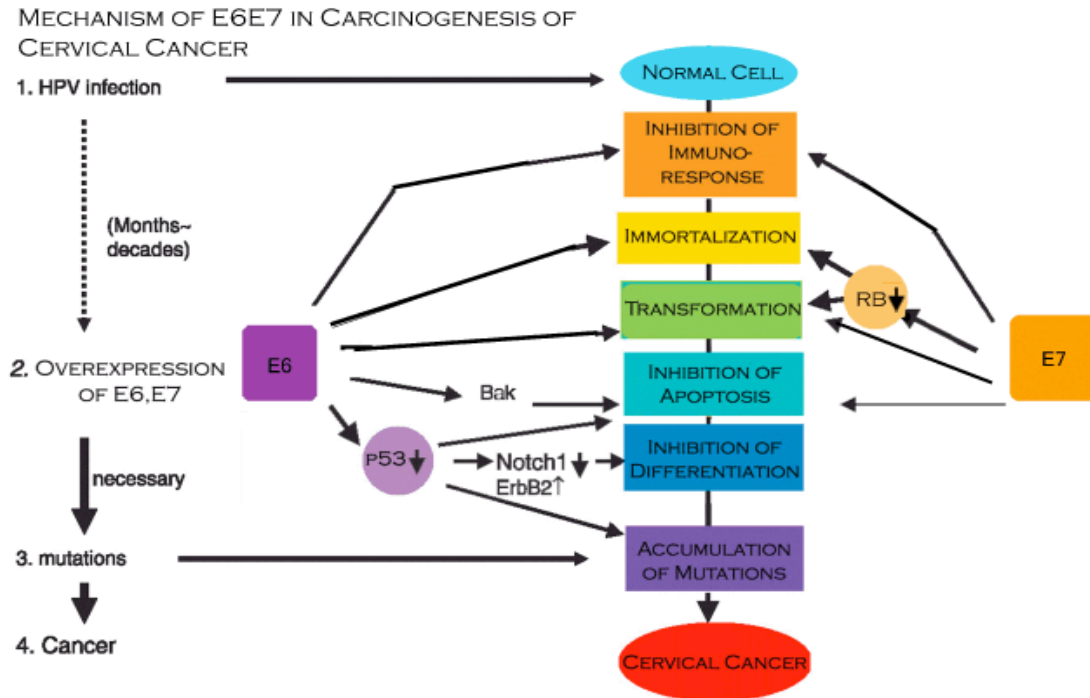
Στους περισσότερους τύπους papilloma ιών, η κύρια λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι να απενεργοποιεί τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών pRb που διαθέτουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα 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 από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Αυτό έχει ως συνέπεια την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Η E7 έχει την δυνατότητα να συνδέεται με την Rb οδηγώντας έτσι στην αποικοδόμηση της 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 έχει την δυνατότητα να συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης και με τους αναστολείς των κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Σε γενικές γραμμές, η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και έτσι παρεμποδίζεται η δράση των p21 και p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb. Όπως αναφέρθηκε, αυτό επιτρέπει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου. (Funk J.O et al 1997).

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η 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 κυττάρου και κατ' επέκταση του ιικού γενώματος (Longworth M.S et al 2004, Brehm A et al 1999).

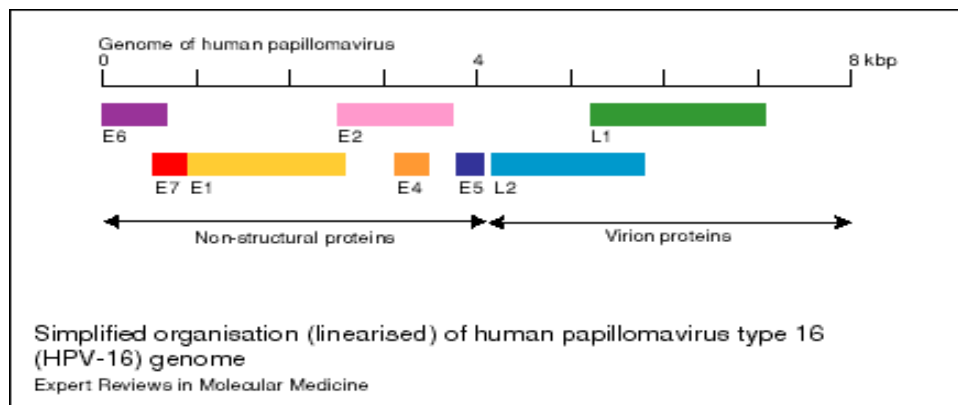
Μαζί με την E6, η E7 δρα με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και να ενισχύει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιώντας έτσι τα κύτταρα για την αντιγραφή του ιικού DNA. Η E7 συμμετέχει, ακόμα, στην αθανатоποίηση των μολυσμένων κυττάρων ενεργοποιώντας την κυτταρική τελομεράση. Όπως και με την E6, η συνεχής έκφραση της E7 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των επαγόμενων από HPV καρκινικών κυτταρικών σειρών.



Εικόνα 2.9: Παρουσιάζονται οι μηχανισμοί των πρωτεϊνών E6 και E7 με τους οποίους επάγεται καρκινογένεση στην περιοχή της μήτρας. (<http://oncohealthcorp.com/technology.html>)

2.2.8. Το ιικό γονίδιο E8

Λίγοι μόνο τύποι ιών papilloma εκφράζουν μία μικρή πρωτεΐνη προερχόμενη από το E8 γονίδιο. Στην περίπτωση του BPV-4, το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο της E8 μπορεί να αντικαταστήσει το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του E6, το οποίο απουσιάζει από το συγκεκριμένο γένος. Αυτά τα E8 γονίδια είναι χημικά και λειτουργικά όμοια με τα E5 γονίδια μερικών HPV. Για αυτόν τον λόγο ονομάζονται επίσης και E5/E8



Εικόνα 2.10: Γραμμική απεικόνιση του γονιδιώματος των ιών HPV-16

Γονίδιο	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης 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 2.1: Περιληπτική αναφορά των λειτουργιών όλων των πρωτεϊνών του ιού.

3.2. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Όσον αφορά στην αντιγραφή του γενετικού υλικού των HPV, ο κύκλος ζωής τους χωρίζεται σε τρεις ξεχωριστές φάσεις.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, το γένωμα του HPV μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και παρατηρείται πολλαπλασιασμός του ιικού γενετικού υλικού της τάξης των 50-100 αντιγράφων ανά κύτταρο. Στο σημείο αυτό, το ιικό γένωμα παραμένει στον πυρήνα σε μορφή επισώματος. Στη δεύτερη φάση, το ιικό γενετικό υλικό πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μαζί με το κυτταρικό DNA στη φάση S. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται δύο αντίγραφα, ένα για κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και ο αριθμός των αντιγράφων του ιικού γενώματος, πιστεύεται ότι διατηρούνται σε ένα σταθερό επίπεδο στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό τη σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει στο εσωτερικό των νεοσχηματισμένων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R. et al 2006).

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

3.3. Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού είναι συνυφασμένη με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Ο μηχανισμός, ωστόσο, με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως

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 ικού 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 ικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B et al 2004).

Η έκφραση των όψιμων γονιδίων L1 και L2 του ιού εκτελείται αποκλειστικά σε διαφοροποιούμενα κύτταρα των εξωτερικών στοιβάδων των δερματικών ή βλεννογόνων επιφανειών. Η αυξημένη έκφραση των L1 και L2 γενικά σχετίζεται με δραματική αύξηση του αριθμού αντιγράφων του ικού γενώματος. 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 3.3). Καθώς οι εξωτερικές στοιβάδες των πλακώδων επιθηλίων βρίσκονται υπό σχετικά περιορισμένο έλεγχο από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, πιστεύεται ότι ο λόγος που τα όψιμα ικά γονίδια εκφράζονται σε αυτό το στάδιο αποτελεί τακτική υπεκφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Οι νέοι μολυσματικοί ιοί συναρμολογούνται στον κυτταρικό πυρήνα. Οι papilloma ιοί έχουν εξελίξει ένα μηχανισμό για την απελευθέρωση των ισομάτων στο περιβάλλον. Άλλοι ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα ενεργοποιούν μία λυτική διαδικασία κατά την οποία θανατώνονται τα κύτταρα – ξενιστές, κάτι που επιτρέπει την απελευθέρωση των ισομάτων. Αυτή η λυτική διαδικασία σχετίζεται συχνά με εμφάνιση λοίμωξης η οποία ενδέχεται να ενεργοποιήσει ανοσολογική απόκριση εναντίον του ιού. Οι ιοί papilloma, αντίθετα, εκμεταλλεύονται τη φυσική διαδικασία της απολέπισης (ανανέωση κυττάρων και απομάκρυνση των παλιών) ως μηχανισμό κρυφής απελευθέρωσης χωρίς ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος.

4. Κλινικές Εκδηλώσεις

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 ασυμπτωματική μόλυνση του ασθενή. Έτσι, η λοίμωξη δεν διαπιστώνεται και δεν αντιμετωπίζεται, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να μεταδίδεται στον πληθυσμό. Στις περισσότερες μελέτες η συνηθέστερη ηλικία HPV μόλυνσης είναι κάτω των 25 ετών, ενώ η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται γύρω στην ηλικία των 50 ετών (Munoz et al 2003). Ωστόσο, 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.

Μόλυνση με τους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας (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.

4.1. Τρόπος μετάδοσης του 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:

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

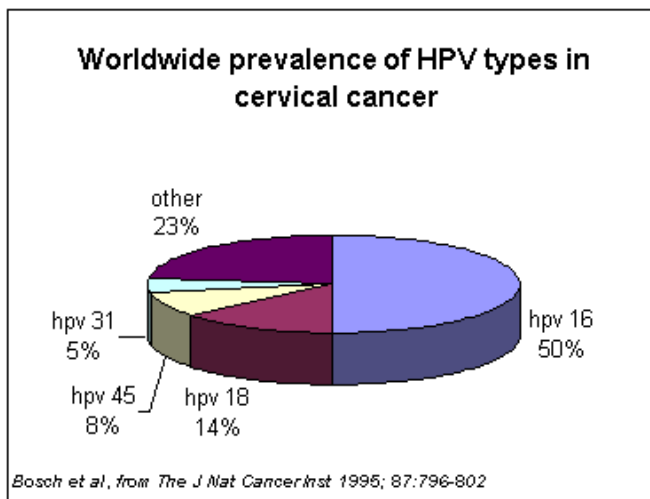
4.2. Στατιστικά στοιχεία

Η μόλυνση από HPV αντιπροσωπεύει την δεύτερη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του μαστού (Ferlay et al 2000) και εξακολουθεί να αποτελεί αιτία θανάτου για χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο ανά τον κόσμο. Έχει καταγραφεί ότι τριάντα εκατομμύρια νέες περιπτώσεις HPV μολύνσεων προκύπτουν ανά έτος σε όλο τον κόσμο (De Schryver A. et al 1990). Επίσης, σύμφωνα με μελέτες του 2010, προκύπτουν ετησίως 400.000 κρούσματα καρκίνου της μήτρας και 250.000 θάνατοι. Μεγαλύτερα ποσοστά μολύνσεων εμφανίζονται σε νεαρές γυναίκες, κυρίως από χώρες της Αφρικής ή από Ισπανόφωνες περιοχές. Επιπλέον, γυναίκες με μεγάλο αριθμό σεξουαλικών συντρόφων ή γυναίκες με ιστορικό μόλυνσης από ερπητοϊούς στα γεννητικά όργανα έχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από HPV (Ho GY. et al 1998, Moscicki A.B. et al 2001, Giuliano A.R. et al 2002, Winer R.L. et al 2003, Sellors J.W. et al 2003). Προβλέπεται ότι στον γενικό πληθυσμό περίπου 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).

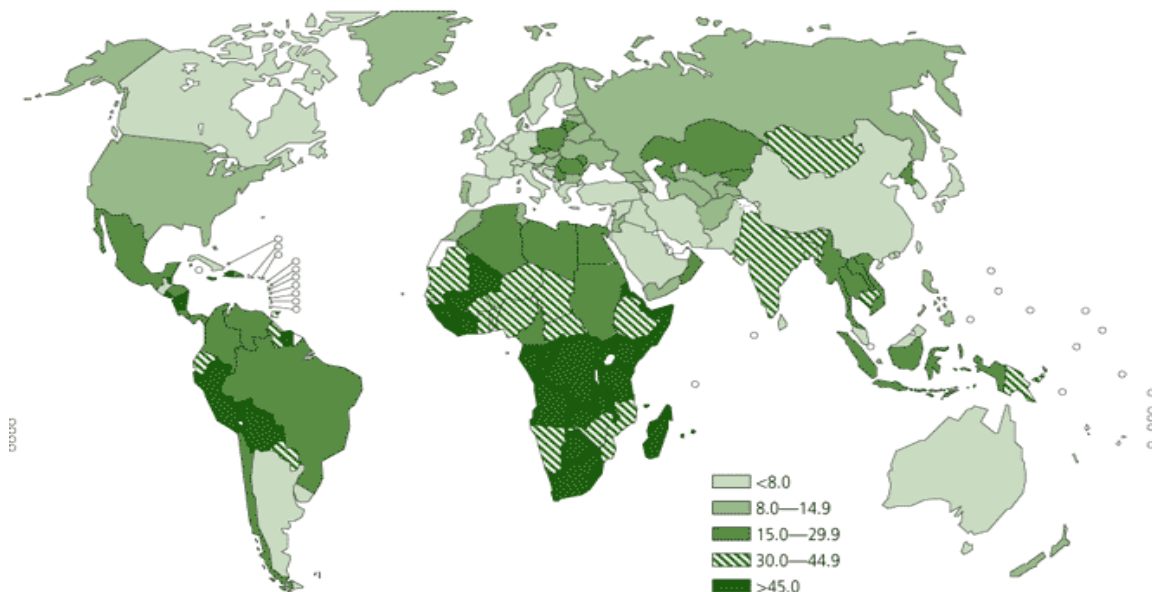
Οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου σχετίζονται με το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, από τις οποίες ο HPV-16 ευθύνεται για το 50% αυτών ενώ ο HPV-18 για το 10-20%. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι παρατηρείται γεωγραφική και ειδική για κάθε χώρα μεταβλητότητα όσον αφορά στην διάδοση του κάθε τύπου του ιού. 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).

Ο εμβολιασμός και η επακόλουθη ανάπτυξη αντισωμάτων προφυλάσσει από τους τύπους 16 και 18 κατά περίπου 100%, δηλαδή για τους δυο πιο επικίνδυνους για πρόκληση καρκίνου τύπους HPV, οι οποίοι ευθύνονται συνολικά για το 70% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου της

μήτρας. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο συνδυασμός εμβολιασμού και τακτικού προληπτικού ελέγχου με το test pap μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας κατά 94%.



Εικόνα 4.1: Παρουσιάζονται σε γράφημα τα ποσοστά των τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας



Εικόνα 4.2: Παγκόσμια περιστατικά καρκίνου του τραχήλου ανά 100.000 γυναίκες όλων των ηλικιών.

(<http://www.scielosp.org>)

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Κλινικά Δείγματα

Για την εκπόνηση της ερευνητικής μελέτης εξετάσθηκαν συνολικά 17 κλινικά δείγματα υψηλού και χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (High Grade και Low Grade). Από αυτά 9 παραχωρήθηκαν από το ιδιωτικό ιατρείο του κυρίου Σκορδά ως δείγματα εμβαπτισμένα σε παραφίνη, τα 3 συλλέχθηκαν με την βοήθεια της κυρίας Χ. Νέγκα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας ως δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων και τα 5 προσφέρθηκαν από την κυρία Ε. Πανοτοπούλου από το αντικαρκινικό νοσοκομείο των Αθηνών Άγιος Σάββας από δείγματα εξετάσεων test-pap (Thin prep). Τα δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV16 σε παλαιότερες μελέτες. Η προέλευση των δειγμάτων, η κλινική εικόνα τους καθώς και η κωδικοποίησή τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Προέλευση Δειγμάτων	Κωδικοποίηση	Κλινική Εικόνα
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ2	CIN 3
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ7	CIN 1-2
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ13	HG (CIN 3)
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ14	HG (CIN 3)
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ15	HG (CIN 3)
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ16	CIN 3
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ30	CIN 1-2
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ34	LGSIL
Ιδιωτικό Ιατρείο	Δ42	CIN 1-2
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A17	LG (CIN 1)
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A24	LG (CIN 1)
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A38	HG
Άγιος Σάββας	793	LG
Άγιος Σάββας	796	LG
Άγιος Σάββας	858	LG
Άγιος Σάββας	868	LG
Άγιος Σάββας	747	LG

Πίνακας 5.1: Κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων συνοδευόμενα με τον βαθμό τραχηλικής αλλοίωσής τους και την προέλευσή τους.

5.2. Προετοιμασία DNA

Για την απομόνωση του DNA των κλινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι για κάθε ομάδα δειγμάτων. Για τα Thin prep pap δείγματα από το αντικαρκινικό νοσοκομείο Άγιος Σάββας η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με την μέθοδο του Casas I. et al, 1996. Το DNA από τα δείγματα βιοψίας τραχηλικών επιχρισμάτων εκχυλίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγραφεί από τον Puramen M. et al. 1995. Τέλος, τα δείγματα ιστού από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας εκχυλίστηκαν με την βοήθεια πρωτεΐνάσης K από καλυπτρίδες στις οποίες βρίσκονταν μονιμοποιημένα κύτταρα, με την μέθοδο που περιγράφεται σύντομα στη συνέχεια.

Αρχικά, λήφθηκαν τομές διαμέτρου 5-10μm με την βοήθεια νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνάρια (tubes) χωρητικότητας 0,5ml. Κάθε τομή καθαρίστηκε από την παραφίνη με ξυλένιο, ξεπλύθηκε με 96% αιθανόλη, ιζιματοποιήθηκε και αφέθηκε να στεγνώσει. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl 1X extraction buffer (το οποίο περιείχε 20μg ανά μl πρωτεΐνάσης K), 100μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 X PCR buffer (Stratagene, La Jolla USA) καθώς και αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 1 ml. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C overnight ή, εναλλακτικά, στους 55°C για 3 ώρες. Κατόπιν, τοποθετήθηκαν στους 95°C για 15 min ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν τα κυτταρικά κατάλοιπα με σύντομη ανάδευση και το απομονωμένο DNA (υπερκείμενο) αποθηκεύτηκε σε νέα σωληνάρια στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.3. Εκκινητικά μόρια PCR για την ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων του E1 γονιδίου

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν αρχικά τρία ζευγάρια εκκινητών με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV-16 η οποία είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων Gene Bank. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3. Τα ζεύγη εκκινητών ενισχύουν εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου E1. Το ζεύγος HPV-16/787 – HPV-16/1689 ενισχύει τμήμα μεγέθους 902bp, το ζεύγος HPV-16/1556 – HPV-16/2412 ενισχύει τμήμα μεγέθους 856 bp και το ζεύγος HPV-16/2287 – HPV-16/2906 ενισχύει τμήμα μεγέθους 619. Η κωδικοποίηση των εκκινητών έγινε με βάση την θέση υβριδισμού τους στο ικό γονιδίωμα.

Τα δείγματα στα οποία κατέστη δυνατή η ενίσχυση με τα παραπάνω εκκινητικά μόρια ήταν λίγα. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα τμήματα προς ενίσχυση ήταν αρκετά μεγάλα και η ενίσχυση ήταν πιο δύσκολη. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν και νέα ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν μικρότερα τμήματα. Τα εκκινητικά αυτά ζεύγη είχαν χρησιμοποιηθεί στην εργασία των Hugo Arias-Pulido et al., 2006.

Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες μαζί με τις αλληλουχίες τους και το μήκος του προϊόντος της περιοχής του γονιδίου E1 που ενισχύουν.

Εκκινητές	Πολικότητα	Αλληλουχία	Μήκος προϊόντος PCR
787	Sense	CATTCGTACTTTGGAAGACCTG	902 bp
1689	Antisense	CACAACCATTCCCCATGAAC	
1556	Sense	AACGTGTTGCGATTGGTGTA	856 bp
2412	Antisense	TGGCATCTGCTAATGGTTGT	
2287	Sense	CTATATGGTGCAGCTAACACAGG	619 bp
2906	Antisense	ATCCCATTTCTCTGGCCTTG	

Πίνακας 5.2: Εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PRIMER 3

Εκκινητές	Πολικότητα	Θέση στο γονιδίωμα	Αλληλουχία	Μήκος προϊόντος PCR
E1F1	Sense	CAGGTACCAATGGGGAAGA	878 – 896	241
E1R1	Antisense	ACCTGTACTGCATCTCTATGTTGT	1095 – 1118	
E1F2	Sense	GACAGCACATGCGTTGTTTAC	1059 – 1079	265
E1R2	Antisense	AGTCTCATGGCGCCCTTC	1306 – 1323	
E1F3	Sense	CGCCATGAGACTGAAACAC	1312 – 1330	212
E1R3	Antisense	GAAAAACTCACCCCGTATAAC	1503 – 1523	
E1F4	Sense	GTTATACGGGGTGAGTTTTTC	1503 – 1523	282
E1R4	Antisense	ATCATCATAACACATTGGAGACA	1763 – 1784	
E1F5	Sense	GTGTGTCTCCAATGTGTATGATG	1760 – 1782	232
E1R5	Antisense	GCAATTTCACTATCGTCTACTATG	1968 – 1991	
E1F6	Sense	GGGCCTACGATAATGACATAGTA	1952 – 1974	235
E1R6	Antisense	TGCTTCCAATCACCTCCAT	2168 – 2186	
E1F7	Sense	GGAGGTGATTGGAAGCAA	2170 – 2187	316
E1R7	Antisense	CCAATGCATTTCTTAAATTGTC	2464 – 2485	
E1F8	Sense	CCCTGTTGGAACACTACATAGATGAC	2443 – 2466	301
E1R8	Antisense	CCTCGTCCTCGTGCAAACACT	2725 – 2743	
E1F9	Sense	CCAGTGTATGAGCTTAATGATAAGA	2662 – 2686	187
E2R9	Antisense	GTCTATATGGTCACGTAGGTCTGTA	2824 - 2848	

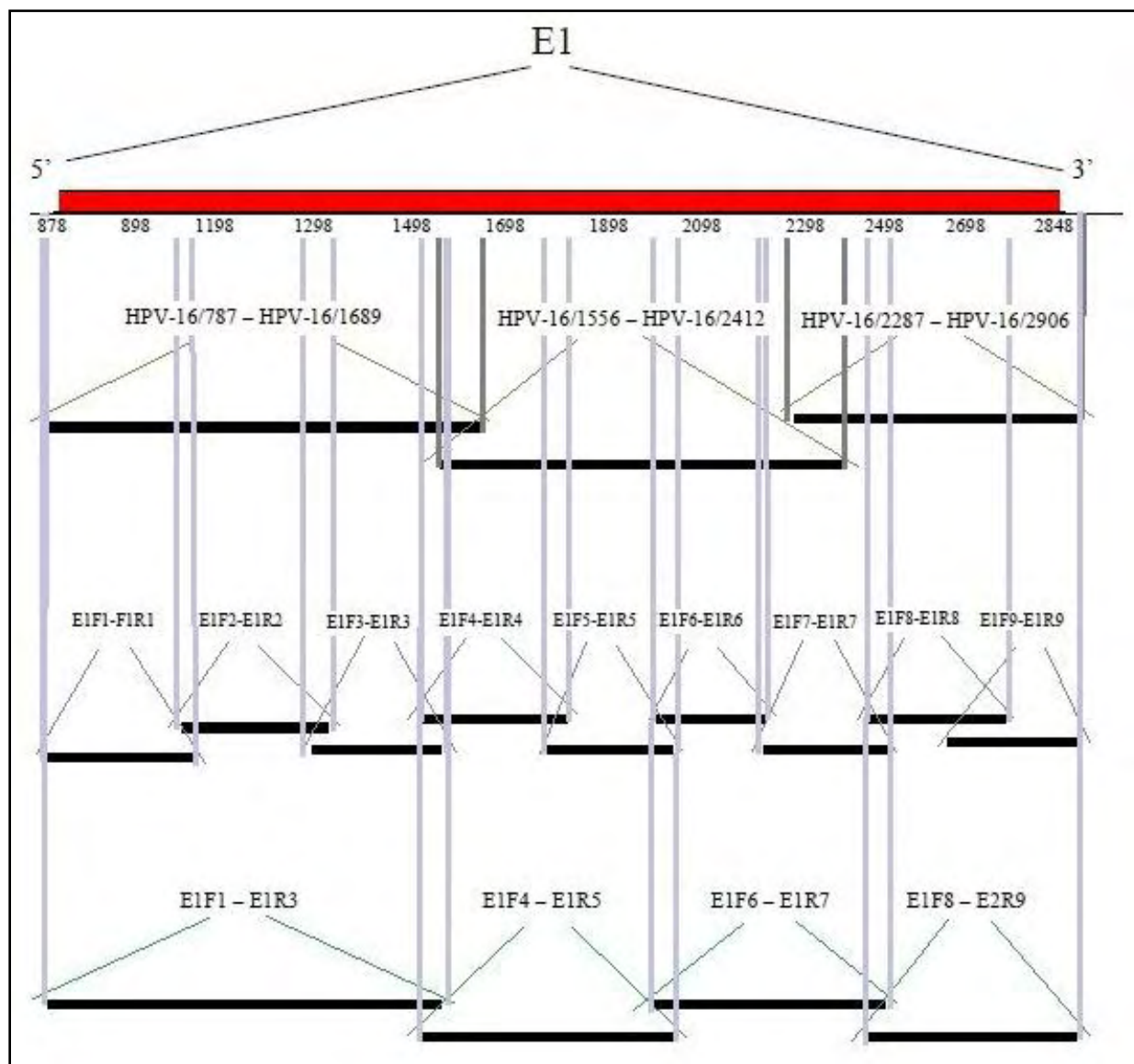
Πίνακας 5.3: Εκκινητικά μόρια από την δημοσίευση των Hugo Arias-Pulido et al., 2006

Επειδή τα ενισχυμένα τμήματα θα ήταν πάρα πολλά για όλα τα δείγματα που δεν ενισχύθηκαν με την πρώτη ομάδα εκκινητών του πίνακα 5.2, τα εκκινητικά μόρια του πίνακα 5.3 ομαδοποιήθηκαν για να καταστεί η μετέπειτα διαδικασία της κλωνοποίησης πιο πρακτική και λιγότερο επίπονη. Η ομαδοποίηση αυτή παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητές	Πολικότητα	Θέση στο γονιδίωμα	Αλληλουχία	Μήκος προϊόντος PCR
E1F1	Sense	CAGGTACCAATGGGGAAGA	878 – 896	645
E1R3	Antisense	GAAAAACTCACCCCGTATAAC	1503 – 1523	
E1F4	Sense	GTTATACGGGGTGAGTTTTTC	1503 – 1523	488
E1R5	Antisense	GCAATTTCACTATCGTCTACTATG	1968 – 1991	
E1F6	Sense	GGGCCTACGATAATGACATAGTA	1952 – 1974	533
E1R7	Antisense	CCAATGCATTTCTTAAATTGTC	2464 – 2485	
E1F8	Sense	CCCTGTTGGA ACTACATAGATGAC	2443 – 2466	405
E2R9	Antisense	GTCTATATGGTCACGTAGGTCTGTA	2824 - 2848	

Πίνακας 5.4: Ομαδοποίηση εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης των Hugo Arias-Pulido et al., 2006

Παρακάτω, ακολουθεί σχηματική απεικόνιση του E1 γονιδίου, τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη καθώς και τα σημεία στα οποία αντιστοιχούν.



Εικόνα 5.1: Απεικονίζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν στη παρούσα ερευνητική μελέτη καθώς και οι περιοχές του γονιδίου E1 του HPV-16 στις οποίες συνδέονται.

5.4. Ενίσχυση του E1 γονιδίου με μεθόδους PCR

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τα παραπάνω εκκινητικά μόρια με σκοπό την ενίσχυση των αντίστοιχων επιμέρους τμημάτων του γονιδίου E1 του ιού. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή με ελεγχόμενες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας για το κάθε στάδιο της αντίδρασης.

5.4.1. Απλή PCR

Για κάθε δείγμα με κάθε ζεύγος εκκινητών πραγματοποιήθηκε μία πρώτη αντίδραση PCR με ένζυμο αντιγραφής την Paq 5000 DNA Polymerase Stratagene. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μ l. Κάθε PCR tube περιείχε:

- 3 μ l DNA από το υπό εξέταση δείγμα,
- 2 μ l ενός ζεύγους εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol,
- 6 μ l dNTPs συγκέντρωσης 10mM, 5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος Paq Reaction Buffer 10x,
- 2,5 units/tube Paq DNA πολυμεράση
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μ l.

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή “RoboCycler Gradient 96” της εταιρίας Stratagene. Η διαδικασία έλαβε χώρα ως εξής:

- i. Αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95°C για 2 min
- ii. 40 κύκλοι αποδιάταξης - υβριδοποίησης - επιμήκυνσης του DNA στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Στάδιο Αντίδρασης	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη Κλώνων	95°C	40 sec
Υβριδοποίηση Κλώνων DNA	50°C	30 sec
Επιμύκηση Κλώνων DNA	72°C	30 sec

} 40 Κύκλοι

iii. Επώαση των κλώνων του ενισχυμένου τμήματος στους 72°C για 5 min.

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 3 μl H₂O (αντί των 3 μl δείγματος DNA) ελεύθερου από DNases και RNases.

5.4.2. AutoNested PCR

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR που δεν εμφάνισαν ικανοποιητική ενίσχυση της αλληλουχίας υποβλήθηκαν σε αντίδραση AutoNested PCR με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση του σήματος της πρώτης αντίδρασης PCR, καθώς οι κλώνοι των τμημάτων DNA επρόκειτο να κλωνοποιηθούν. Πρόκειται για μία αντίδραση PCR που χρησιμοποιεί ως δείγμα DNA το προϊόν της πρώτης PCR με το ίδιο ζεύγος εκκινητών. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα με τελικό όγκο 50 μl. Το μείγμα σε κάθε PCR tube περιείχε:

- 2μl από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR για κάθε δείγμα DNA,
- 2 μl από το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών με το οποίο πραγματοποιήθηκε η πρώτη αντίδραση, συγκέντρωσης 50 pmol,
- 5 μl dNTPs συγκέντρωσης 10mM,
- 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος Paq Reaction Buffer 10x, 2,5 units/tube Paq DNA πολυμεράση
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μl.

Όλες οι αντιδράσεις AutoNested PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή “RoboCycler Gradient 96” της εταιρίας Stratagene. Η διαδικασία έλαβε χώρα ως εξής:

- i. Αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95°C για 2 min
- ii. 20 κύκλοι αποδιάταξης - υβριδοποίησης - επιμήκυνσης του DNA στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

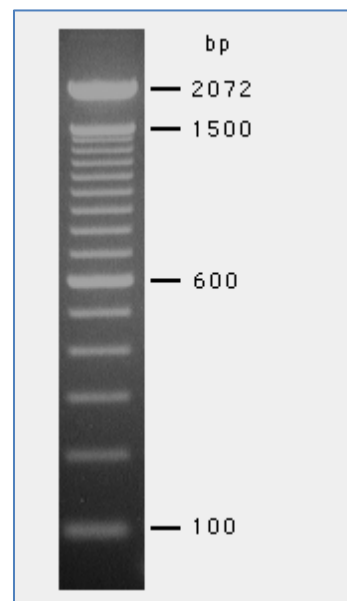
<u>Στάδιο Αντίδρασης</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>	} 20 Κύκλοι
Αποδιάταξη Κλώνων	95°C	40 sec	
Υβριδοποίηση Κλώνων DNA	50°C	30 sec	
Επιμήκυνση Κλώνων DNA	72°C	30 sec	

- iii. Επώαση των κλώνων του ενισχυμένου τμήματος στους 72°C για 5 min.

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 2 μl H₂O (αντί των 2 μl προϊόντος από την πρώτη PCR) ελεύθερου από DNases και RNases.

5.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR και AutoNested PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από τις αντιδράσεις PCR και AutoNested PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο με σκοπό τη δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων υπό επιβολή υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν σε διαμορφωμένα πηγάδια 10 μl από κάθε προϊόν των αντιδράσεων PCR και AutoNested PCR αφού πρώτα αναμίχθηκαν με 2-3 μl χρωστικής ουσίας. Εν συνεχεία, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 100-140 V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Το “ύψος” σε ζεύγη βάσεων των τμημάτων εξακριβώθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).



Εικόνα 5.2: 100 bp DNA Ladder, 0.5 μg/lane
2% agarose gel stained with ethidium bromide

5.6. Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA που συλλέχθηκαν

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR, τα οποία αντιπροσωπεύουν τμήματα (ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά) από κάθε κλινικό δείγμα που εξετάστηκε, υποβλήθηκαν σε κλωνοποίηση ώστε να καταστεί δυνατή η αλληλούχισή τους. Για να γίνουν ικανά να κλωνοποιηθούν, τα τμήματα DNA που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR επεξεργάστηκαν έτσι ώστε να μπορούν να εισαχθούν επιτυχώς σε φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια). Κατόπιν, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα (βακτήρια) τα οποία είχαν επεξεργασθεί κατάλληλα με σκοπό να γίνουν δεκτικά προς τους φορείς και να καταστεί έτσι δυνατός ο τελικός μετασχηματισμός τους. Έπειτα, ακολούθησε καλλιέργεια και

επώαση των μετασχηματισμένων βακτηρίων στις κατάλληλες συνθήκες για την κλωνοποίησή τους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συλλογή των επιθυμητών αποικιών – κλώνων και η απομόνωση των φορέων από τα βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, με μία πέψη των πλασμιδιακών φορέων με ένζυμα περιορισμού ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της διαδικασίας.

5.6.1. AutoNested GoTaq PCR

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν η επεξεργασία των τμημάτων DNA που είχαμε ενισχύσει με PCR με σκοπό την εισαγωγή poly(A) μονόκλωνων άκρων στα 3' και 5' άκρα των ενισχυμένων τμημάτων. Τα μονόκλιωνα αυτά άκρα είναι συμπληρωματικά προς την πολυδύναμη θέση ένθεσης των πλασμιδιακών φορέων. Η εισαγωγή αυτή επιτυγχάνεται με πραγματοποίηση μίας ειδικής AutoNested PCR που κάνει χρήση του ενζύμου GoTaq Flexi DNA polymerase Promega το οποίο προσθέτει poly(A) ουρές στα άκρα των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα με τελικό όγκο 50 μl. Το μείγμα σε κάθε PCR tube περιείχε:

- 2 μl προϊόντος DNA που προέκυψε από την τελευταία αντίδραση PCR,
- 2 μl από το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών από το οποίο προέκυψε το κάθε τμήμα συγκέντρωσης 50 pmol,
- 6 μl dNTPs συγκέντρωσης 10 mM,
- 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος Colorless GoTaq Flexi Buffer 5x,
- Διάλυμα MgCl₂ συγκέντρωσης 25 mM, 1,25 units/tube ενζύμου GoTaq DNA πολυμεράση,
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μl.

Όλες οι αντιδράσεις GoTaq PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή “RoboCycler Gradient 96” της εταιρίας Stratagene. Η διαδικασία έλαβε χώρα ως εξής:

- i. Αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95°C για 2 min
- ii. 25 κύκλοι αποδιάταξης - υβριδοποίησης - επιμήκυνσης του DNA στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

<u>Στάδιο Αντίδρασης</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
Αποδιάταξη Κλώνων	95°C	40 sec
Υβριδοποίηση Κλώνων DNA	50°C	30 sec
Επιμήκυνση Κλώνων DNA	72°C	60 sec

} 25 Κύκλοι

- iii. Επώαση των κλώνων του ενισχυμένου τμήματος στους 72°C για 5 min.

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 2 μl H₂O (αντί των 2 μl προϊόντος DNA) ελεύθερου από DNases και RNases. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης αξιολογήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

5.6.2. Απομόνωση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης AutoNested GoTaq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης, ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα από κάθε προϊόν. Στη συνέχεια, οι επιθυμητές μπάντες αποκόπηκαν από το πήκτωμα με χρήση νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα tubes των 2 ml. Η απομάκρυνση της αγαρόζης και ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.6.3. Αντίδραση Λιγάσης

Αφού οι αλληλουχίες προετοιμάστηκαν με την προσθήκη poly-(A) άκρων μετά την AutoNested GoTaq PCR και καθαρίστηκαν, ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA). Κατά την αντίδραση αυτή, οι poly-(A) ουρές στα 3' και 5' άκρα των αλληλουχιών συνδέονται με τα αντίστοιχα poly-(T) άκρα του φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA Ligase. Το μείγμα της αντίδρασης ήταν τελικού όγκου 10μl για κάθε αλληλουχία και περιείχε:

- 1μl πλασμιδιακού φορέα pGEM®-T Easy Vector 50ng
- 3μl προϊόντος AutoNested GoTaq PCR
- 1μl ενζύμου T4 DNA Ligase (3units/μl)
- 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Rapid Ligation Buffer 2x

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 ώρες.

5.6.4. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων

Αναγκαία για την διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν η παραγωγή δεκτικών κύτταρων προς τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5a, που επεξεργασθήκαν με κατάλληλη χημική μέθοδο (γλωριούχο ασβέστιο – CaCl₂).

Από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολούθησε επώαση για 16 ώρες (overnight) στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, η καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν τακτικές λήψεις 1ml από την καλλιέργεια με σκοπό να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση του διαλύματος σε OD₆₀₀ ώστε να διακοπεί η κυτταρική ανάπτυξη όταν τα βακτήρια βρεθούν σε φάση εκθετική αύξησης, δηλαδή σε επίπεδα οπτικής απορρόφησης A=0,450-0,550. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης, τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 min ώστε να αδρανοποιηθούν. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση

του διαλύματος στις 4000 rpm για 10min στους 4°C, μετά το πέρας της οποίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε σε 10ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 10 min στους 4°C, στο τέλος της οποίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε ξανά σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M (0,55g CaCl₂, Sigma, USA, διαλύονται σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 ml).

5.6.5. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για κάθε αλληλουχία μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes) 200 μl από το stock δεκτικών κυττάρων και 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση, και τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 min (heat shock). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από όπου ήταν δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα μικροσωληνάρια σε αντίστοιχα falcon που περιείχαν 800μl θρεπτικού μέσου LB Broth και επώστηκαν στους 37°C σε 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων – “επούλωση”).

5.6.6. Κλωνοποίηση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια

Από κάθε falcon λήφθηκαν 300μl υγρής καλλιέργειας και επιστρώθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε ποσότητα 1,5 μl ανά ml LB Agar (6,6mg/ml). Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν επίσης 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA), και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την

άχρωμη χημική ουσία X-gal η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος που χρωματίζει τις αποικίες-κλώνους. Ωστόσο, όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι λευκές διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατός ο οπτικός έλεγχος της επιτυχίας ένθεσης αλληλουχίας στα πλασμίδια κάθε αποικίας. Έτσι, από κάθε τρυβλίο συλλέχθηκαν δύο λευκές αποικίες, δηλαδή δύο κλώνοι από κάθε αλληλουχία. Στη συνέχεια, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2ml θρεπτικού μέσου LB Broth (20 g/L) το οποίο περιείχε αμικικιλίνη σε ποσότητα 1,5μl ανά ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

5.7. Απομόνωση των φορέων από τα πλασμίδια.

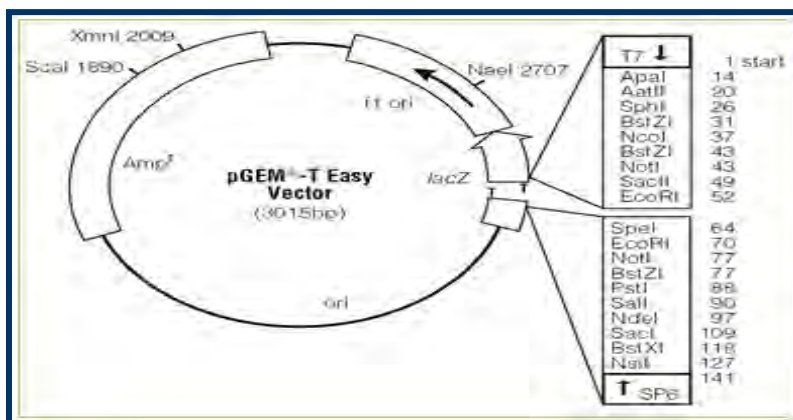
Για να καταστεί δυνατή η αλληλούχιση των ενθεμάτων απαιτείται απομόνωση των φορέων κλωνοποίησης από τα βακτηριακά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin® Plasmid extraction kit (Macherey-Nagel, Germany).

5.8. Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη μικρής ποσότητας με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, η αλληλουχία που αποκόπτεται από τον φορέα με το ένζυμο αφορά μόνο το ένθεμα. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- 2μl από κάθε εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA
- 2μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x H Buffer
- 1μl ενζύμου Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan)
- 15μl ddH₂O, ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl

Ακολούθησε επώαση η οποία έλαβε χώρα στους 37°C για 2 ώρες και μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Κατόπιν, η ποσότητα αυτή ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα για να πραγματοποιηθεί οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 5.3: Ο φορέας κλωνοποίησης της pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη και της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. Από www.promega.com.

5.9. Αλληλούχιση των προϊόντων

Η αλληλούχιση των προϊόντων των κλωνοποιήσεων που πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen Inc. στα εργαστήριά της στη Νότια Κορέα.

6. Επεξεργασία των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες που συλλέχθηκαν συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες στην βάση δεδομένων (GeneBank) με την βοήθεια του προγράμματος BLAST. Η επεξεργασία των αλληλουχιών, η εύρεση μεταλλάξεων και η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για την γενωμική και φυλογενετική ανάλυση που ακολούθησε πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια των προγραμμάτων Chromas, GeneRunner και Mega και Clustal.

7. Αποτελέσματα

7.1. Αποτελέσματα PCR και AutoNested PCR

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με όλα τα ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων του E1 γονιδίου. Ακολουθούν πίνακες στους οποίους παρουσιάζονται τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε η επιθυμητή περιοχή και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Ζεύγος εκκινητών	Δείγματα
HPV-16/787 – HPV-16/1689	793, 796, 868
HPV-16/1556 – HPV-16/2412	868
HPV-16/2287 – HPV-16/2906	793, 796, 868
E1F1 – E1R3	Δ14, Δ15, Δ30, Δ34, Δ42, A17, A24, A38, 858
E1F4 – E1R5	Δ2, Δ7, Δ13, Δ14, Δ15, Δ16, Δ30, Δ34, Δ42, A17, A24, A38, 747, 793, 796, 858
E1F6 – E1R7	Δ2, Δ7, Δ13, Δ14, Δ15, Δ16, Δ30, Δ34, Δ42, A17, A24, A38, 747, 793, 796, 858
E1F8 – E2R9	Δ2, Δ7, Δ13, Δ14, Δ15, Δ16, Δ30, Δ34, Δ42, A17, A24, A38, 747, 858

Πίνακας 7.1: Κλινικά δείγματα και τα ζεύγη εκκινητών με τα οποία ενισχύθηκαν

Δείγμα	Κλινική εικόνα	E1F1-E1R3 645bp	E1F4-E1R5 488bp	E1F6-E1R7 533bp	E1F8-E2R9 405bp
Δ2	CIN 3	X	√	√	√
Δ7	CIN 1-2	X	√	√	√
Δ13	HG (CIN 3)	X	√	√	√
Δ14	HG (CIN 3)	√	√	√	√
Δ15	HG (CIN 3)	√	√	√	√
Δ16	CIN 3	X	√	√	√
Δ30	CIN 1-2	√	√	√	√
Δ34	LGSIL	√	√	√	√
Δ42	CIN 1-2	√	√	√	√
A17	LG (CIN 1)	√	√	√	√
A24	LG (CIN 1)	√	√	√	√
A38	HG	√	√	√	√
747	LG	X	√	√	√
793	LG	–	√	√	–
796	LG	–	√	√	–
858	LG	√	√	√	√

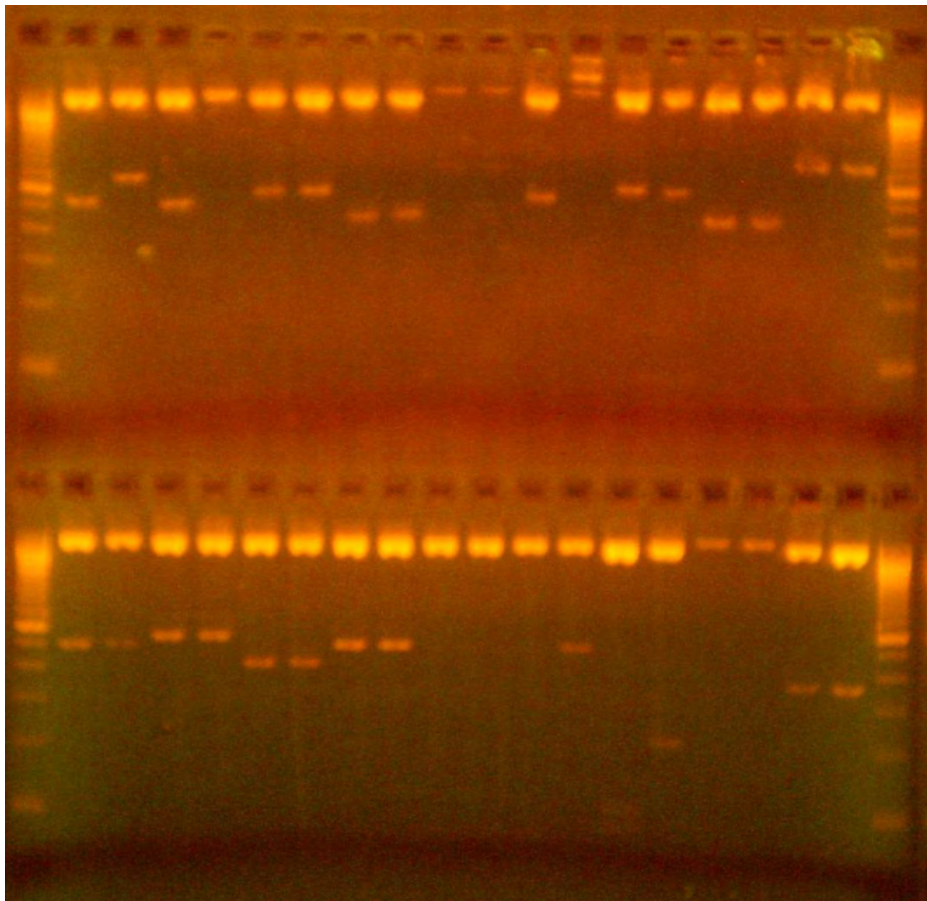
Δείγμα	Κλινική εικόνα	HPV-16/787 – HPV-16/1689	HPV-16/1556 – HPV-16/2412	HPV-16/2287 – HPV-16/2906
793	LG	√	–	√
796	LG	√	–	√
868	LG	√	√	√

Πίνακες 7.2 και 7.3: Συγκεντρωτικοί πίνακες επιτυχίας ενίσχυσης των περιοχών των δειγμάτων

7.2. Αποτελέσματα Κλωνοποίησης

Όσα δείγματα καταφέραμε να ενισχύσουμε με PCR και με GoTaq PCR κλωνοποιήθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα.

Παρακάτω ακολουθεί ενδεικτική φωτογραφία από ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη RFLP των προϊόντων κλωνοποίησης με το ένζυμο περιορισμού EcoR1. Οι μπάντες που βρίσκονται σε περιοχές ύψους 400 – 700 bp αντιστοιχούν στις αλληλουχίες που κλωνοποιήσαμε ανάλογα με το ζεύγος εκκινήτων με το οποίο είχαν επεξεργασθεί. Οι μπάντες που βρίσκονται ψηλότερα από τις 2072 bp αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.



Εικόνα 7.3: Αποτελέσματα μίας πέψης RFLP με ένζυμο περιορισμού EcoR1

Στη συνέχεια ακολουθεί πίνακας με τα συνολικά αποτελέσματα της κλωνοποίησης όσον αφορά στην επιτυχία λήψης αλληλουχιών (τουλάχιστον ένας κλώνος) από τα κλινικά δείγματα για κάθε τμήμα που ενισχύθηκε.

Δείγμα	Κλινική εικόνα	E1F1-E1R3 645bp		E1F4-E1R5 488bp		E1F6-E1R7 533bp		E1F8-E2R9 405bp	
		Κλώνος 1	Κλώνος 2	Κλώνος 1	Κλώνος 2	Κλώνος 1	Κλώνος 2	Κλώνος 1	Κλώνος 2
Δ2	CIN 3			✓		✓	✓	X	
Δ7	CIN 1-2			✓	✓	✓		✓	✓
Δ13	HG (CIN 3)	X			✓	✓	✓	✓	
Δ14	HG (CIN 3)	X			✓		✓	✓	
Δ15	HG (CIN 3)			X		✓	✓	✓	✓
Δ16	CIN 3			X		✓		✓	✓
Δ30	CIN 1-2		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Δ34	LGSIL	✓	✓			✓	✓	✓	✓
Δ42	CIN 1-2	✓			✓	✓	✓	✓	✓
Α17	LG (CIN 1)	✓	✓	✓		✓		✓	✓
Α24	LG (CIN 1)		✓		✓	✓	✓		✓
Α38	HG	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
747	LG			X		✓	✓	✓	
858	LG	✓			✓	✓	✓	✓	✓
796	LG	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
793	LG	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
868	LG	✓	✓	✓		✓		✓	✓

Πίνακας 7.4: Συγκεντρωτικός πίνακας επιτυχίας συλλογής αλληλουχιών – κλώνων.

Χάριν ευκολίας, οι αλληλουχίες που έχουν προκύψει με τα εκκινητικά ζεύγη HPV-16/787 – HPV-16/1689, HPV-16/1556 – HPV-16/2412 και HPV-16/2287 – HPV-16/2906 έχουν ομαδοποιηθεί μαζί με τις αλληλουχίες που επεξεργάστηκαν με τα υπόλοιπα ζεύγη και συμβολίζονται με μπλε “✓” αντί για πράσινο που χρησιμοποιείται για όλες τις υπόλοιπες. Επίσης, με κόκκινο “X” συμβολίζεται η αδυναμία συλλογής κάποιας αλληλουχίας για την

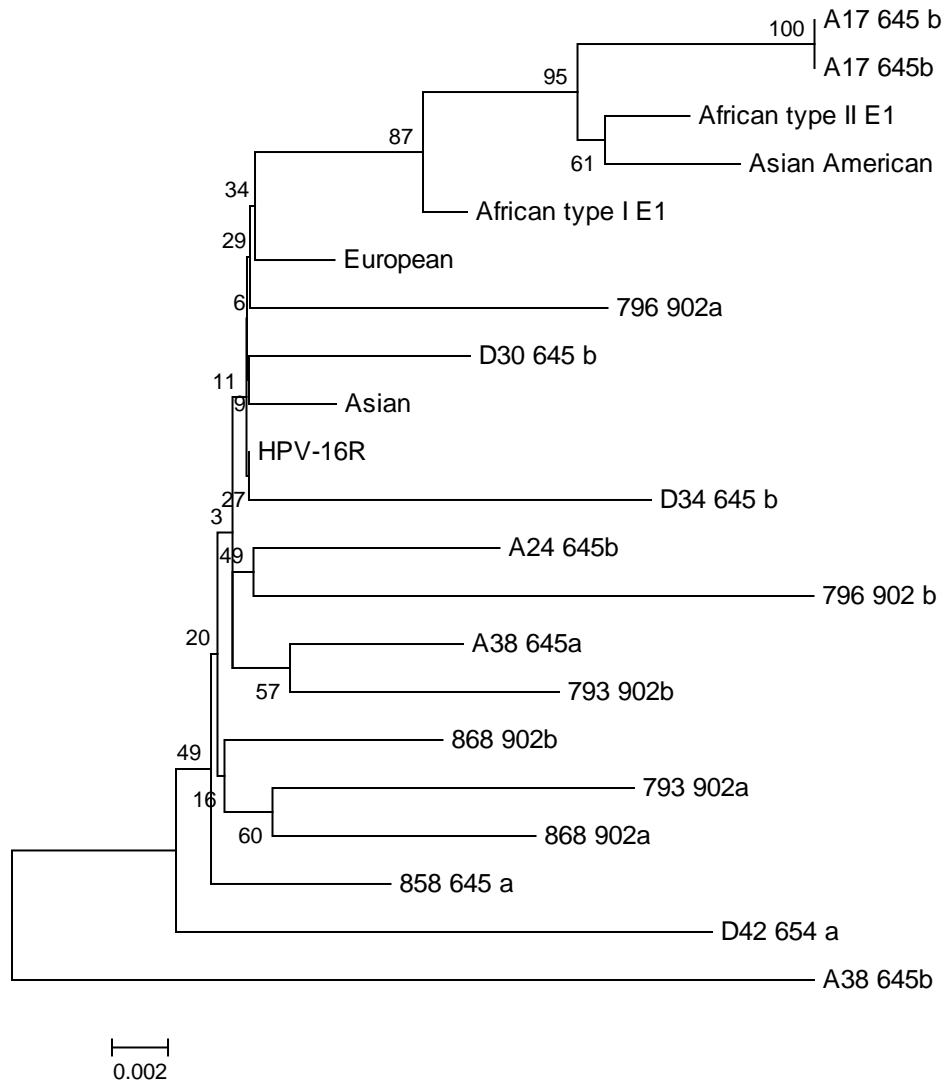
συγκεκριμένη περιοχή. Τέλος, οι γκρίζες περιοχές αντιστοιχούν στα τμήματα που δεν καταφέραμε να ενισχύσουμε με μεθόδους PCR, όπως φαίνεται και σε προηγούμενο πίνακα.

7.3. Φυλογενετική ανάλυση της E1 περιοχής των στελεχών των κλινικών δειγμάτων

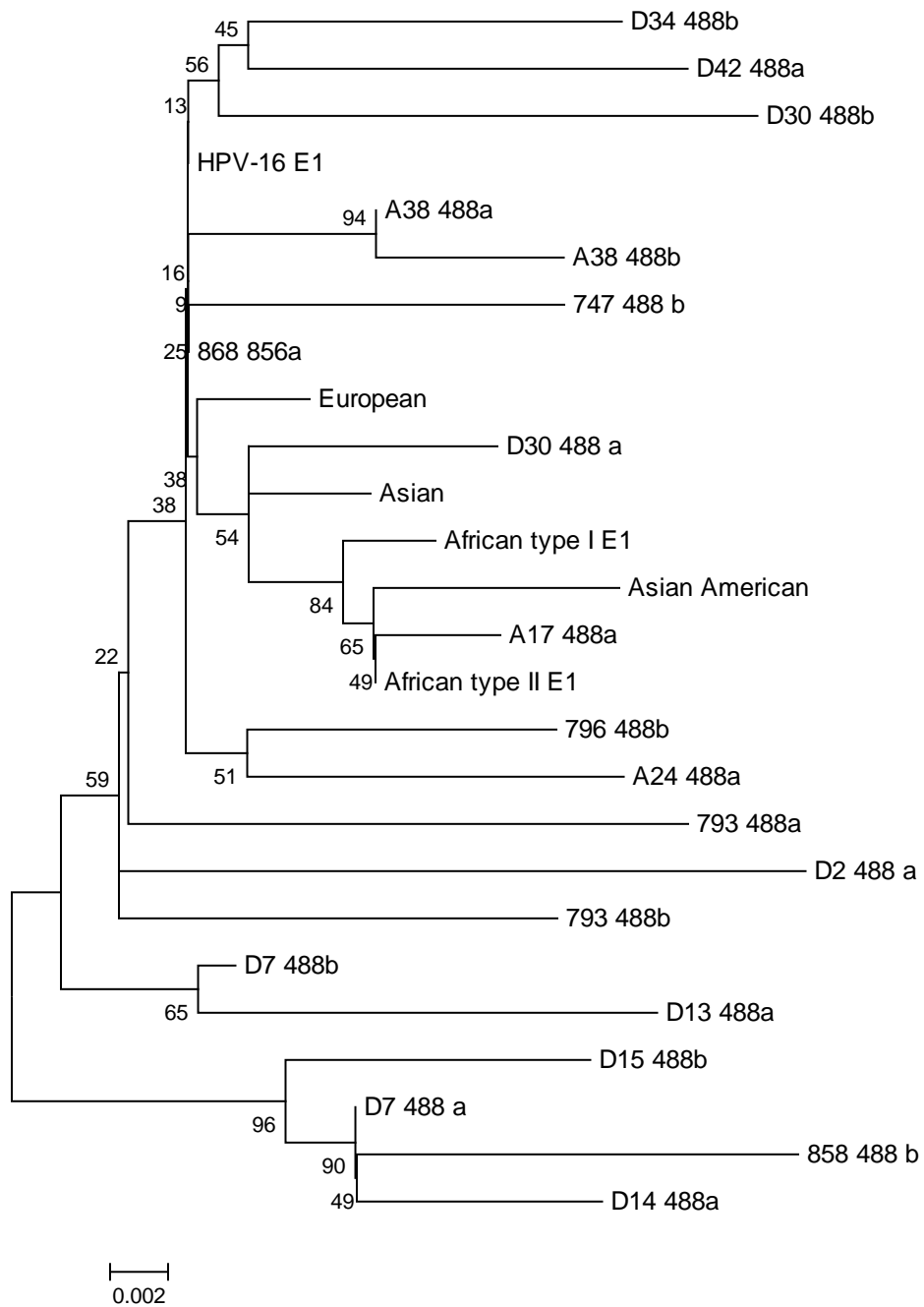
Οι αλληλουχίες – κλώνοι που συλλέξαμε επιτυχώς από τα κλινικά δείγματα συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του E1 γονιδίου του πρότυπου στελέχους HPV-16, αλλά και με τις αλληλουχίες άλλων variants του HPV-16 (European, Asian, Asian-American, African type-1 και African type-2) και σχεδιάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τη βοήθεια του προγράμματος Mega. Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη προκαλούν σε μεγαλύτερη συχνότητα δυσπλασίες, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Σχεδιάστηκαν συνολικά τέσσερα δέντρα, ένα για κάθε περιοχή που ενισχύθηκε με τα ζεύγη εκκινητών E1F1 – E1R3 (μεγέθους 645 bp), E1F4 – E1R5 (μεγέθους 488 bp), E1F6 – E1R7 (μεγέθους 533 bp), E1F8 – E2R9 (μεγέθους 405 bp). Χάριν ευκολίας, οι κλώνοι που έχουν προκύψει με τα εκκινητικά ζεύγη HPV-16/787 – HPV-16/1689 (μεγέθους 902 bp), HPV-16/1556 – HPV-16/2412 (μεγέθους 856 bp) και HPV-16/2287 – HPV-16/2906 (μεγέθους 619 bp) εμφανίζονται στα φυλογενετικά δέντρα που αντιστοιχούν κυρίως οι περιοχές τους.

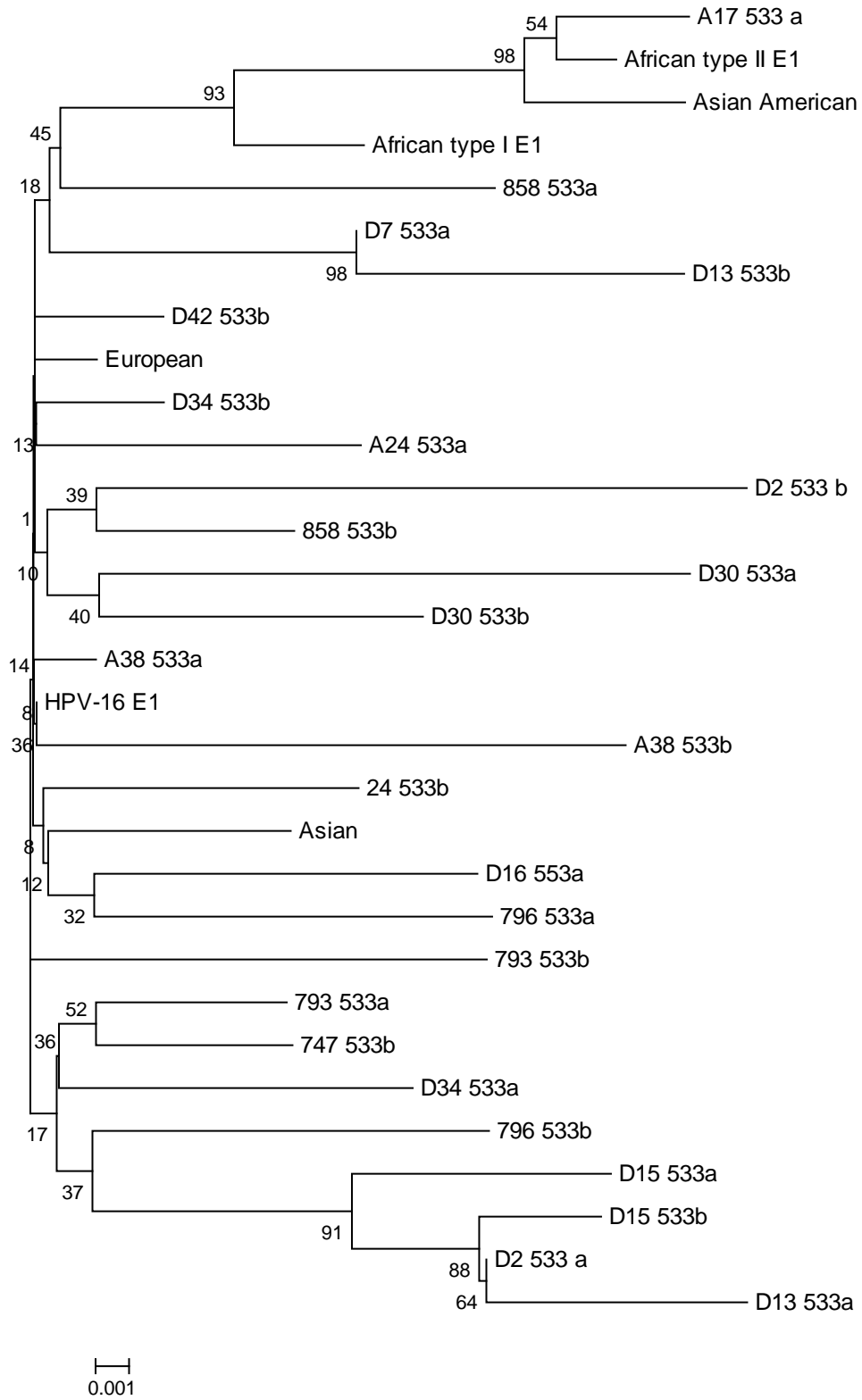
Η κωδικοποίηση των κλώνων στα φυλογενετικά δέντρα γίνεται ως εξής. Πρώτα εμφανίζεται η κωδικοποίηση του δείγματος από το οποίο προήλθαν με λατινικούς χαρακτήρες, ακολουθεί το μέγεθος της περιοχής όπως αυτό προκύπτει από το ζεύγος εκκινητών με το οποίο ενισχύθηκαν, και τέλος με a ή b, ο κλώνος στον οποίο αντιστοιχούν ($1^{ος}$ ή $2^{ος}$), όπως αυτός προέκυψε κατά τη συλλογή αποικιών της κλωνοποίησης. Για παράδειγμα, ο πρώτος κλώνος του δείγματος Δ30 για την περιοχή που ενισχύθηκε με το ζεύγος εκκινητών E1F1 – E1R3 (μεγέθους 645 bp) εμφανίζεται ως εξής: D30 645 a.



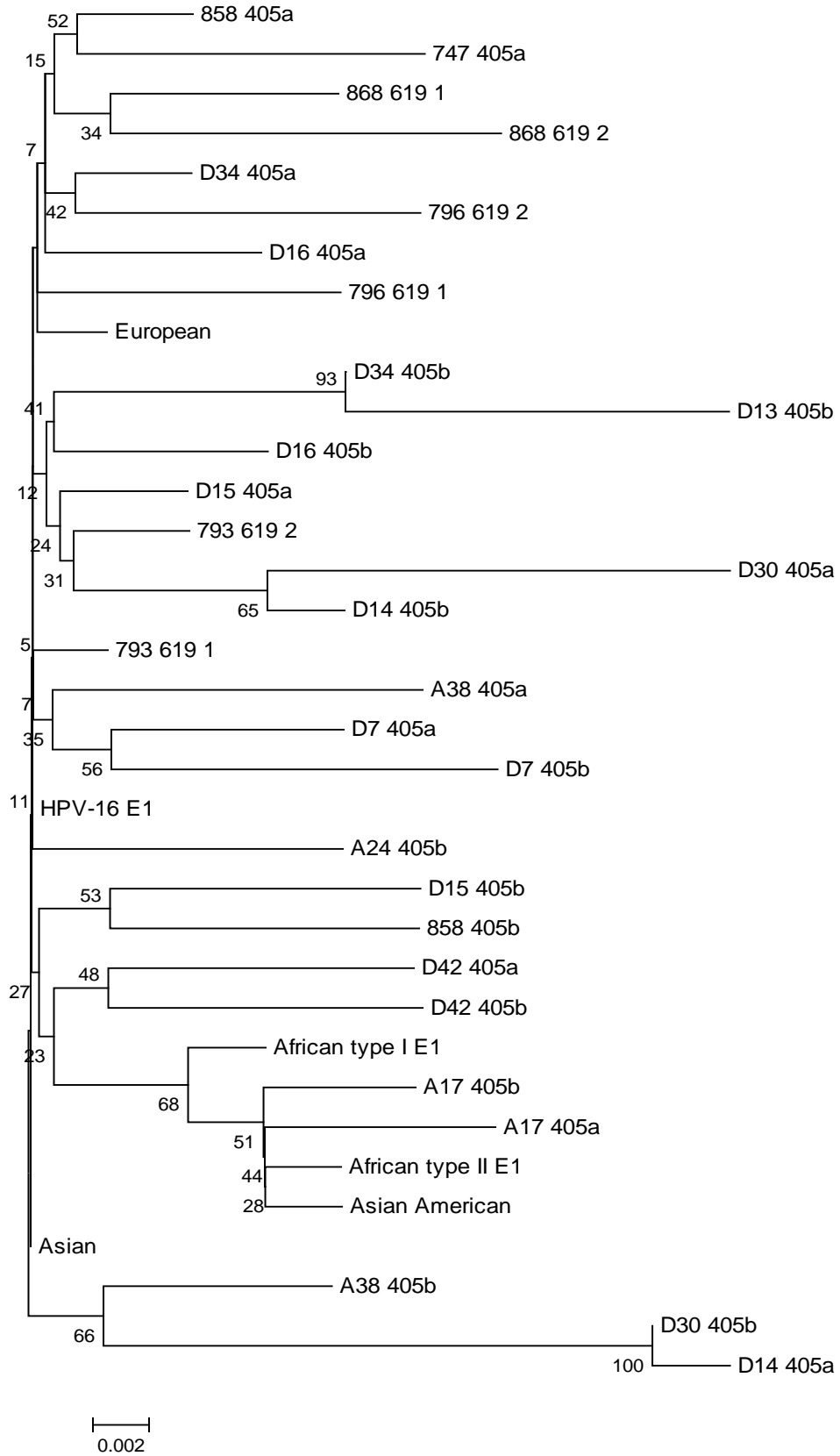
Εικόνα 7.4: Φυλογενετικό δέντρο για το τμήμα μήκους 645 bp του γονιδίου E1.



Εικόνα 7.5: Φυλογενετικό δέντρο για το τμήμα μήκους 488 bp του γονιδίου E1.



Εικόνα 7.6: Φυλογενετικό δέντρο για το τμήμα μήκους 533 bp του γονιδίου E1.



Εικόνα 7.7: Φυλογενετικό δέντρο για το τμήμα μήκους 405 bp του γονιδίου E1.

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στην φυλογενετική ομαδοποίηση των κλώνων που αλληλουχήθηκαν, οι κλώνοι που δεν εμφανίζουν κάποια σαφή ομαδοποίηση από τα δέντρα, ελέγχθηκαν και με την βοήθεια του Clustal και τη βάση δεδομένων BLAST. Για τους περισσότερους κλώνους δεν ήταν δυνατός ο φυλογενετικός συσχετισμός με κάποιο από το γνωστά Variants (European, Asian, Asian American, African type I, African type II). Πιο συγκεκριμένα, σχεδόν όλοι οι κλώνοι, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του BLAST ομαδοποιούνται και με το European και το Asian Variant τα οποία μεταξύ τους έχουν 99% ομοιότητα. Σαφής παρεκκλίνων διαχωρισμός παρατηρείται για λίγους κλώνους μόνο. Πιο συγκεκριμένα, για την ενισχυμένη περιοχή 645 bp, ο κλώνος Δ30b ομαδοποιείται με το Asian variant, ενώ οι κλώνοι A17 a και b ομαδοποιούνται με το African type II. Για την ενισχυμένη περιοχή 488 bp, ο κλώνος Δ30a ομαδοποιείται με το Asian variant, ενώ ο κλώνος A17 a ομαδοποιείται με το African type II. Για την ενισχυμένη περιοχή 533 bp, ο κλώνος A17 a ομαδοποιείται με το African type II, ενώ οι κλώνοι Δ16 a, 796 a και A24 b, ομαδοποιούνται με το Asian variant. Τέλος, για την ενισχυμένη περιοχή 405 bp, ο κλώνος A17 a ομαδοποιείται με το African type II, ενώ οι κλώνοι Δ30 b, Δ14 a και Δ38 b ομαδοποιούνται με το Asian variant.

7.4. Γενωμική ανάλυση της E1 περιοχής των στελεχών των κλινικών δειγμάτων

Όλες οι αλληλουχίες-κλώνοι που συλλέχθηκαν από τα κλινικά δείγματα επεξεργάστηκαν με προγράμματα πληροφορικής για να πραγματοποιηθεί γενωμική ανάλυση της E1 περιοχής των στελεχών. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με την πρότυπη αλληλουχία για το E1 γονίδιο του HPV16 για την εύρεση τυχόν μεταλλάξεων που αυτές έφεραν. Έπειτα, ακολούθησε επεξεργασία για να αποκαλυφθούν οι αλλαγές που προκαλούν αυτές οι μεταλλάξεις σε αμινοξικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης έχουν συγκεντρωθεί στους παρακάτω πίνακες.

Στον πρώτο πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται όλες οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν που εντοπίστηκαν κατά μήκος του E1 γονιδίου, οι περιοχές στις οποίες εντοπίστηκαν, τα δείγματα στα οποία αντιστοιχεί η κάθε μία, το είδος της κάθε μετάλλαξης και οι τυχόν αμινοξικές αλλαγές που προκαλεί η κάθε μία.

Η κωδικοποίηση που αντιστοιχεί σε κάθε αλληλουχία – κλώνο είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε και στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

Θέση Μετάλλαξης	Δείγμα	Μετάλλαξη	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης
949	796 902 a	Προσθήκη A	Καταστροφή ORF
	Δ30 645 b		
	868 902 a	Προσθήκη AA	
	Δ34 645 b	Προσθήκη C	
1053	793 902 a	A1053C	E23D
	793 902 b		
	868 902 a		
	868 902 b		
	A38 645 a		
	A38 645 b		
858 645 a			
1289	793 902 b	A1289T	Q142H
1290	868 902 b	G1290T	
	A17 645 b		
1355	793 902 b	Προσθήκη 63 βάσεων	Αμινοξική Επανάληψη *
1374	793 902 a	Προσθήκη 63 βάσεων	Αμινοξική Επανάληψη **
	868 902 a		
	868 902 b		
	A38 645 a		
1395	A17 645 b	A1395T	Κωδικόνιο λήξης
	A38 645 a	A1395G	
	796 902 b		
1574	Δ7 488 a	G1574T	C237F
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	858 488 b		
1630	Δ7 488 a	C1630T	Κωδικόνιο λήξης
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	858 488 b		
1678	Δ7 488 b	G1687A	G272R
	Δ13 488 a		
	Δ15 488 b		
1704	858 488 b	A1704T	R280S
	Δ7 488 b		
	Δ14 488 a		
1735	Δ14 488 a	G1375A	E291K
	Δ7 488 a	G1735T	Κωδικόνιο λήξης
	Δ13 488 a		
1777	Δ7 488 a	A1777T	I307L
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	858 488 b		

1805	Δ7 488 b	G1805A	S314N
	Δ13 488 a		
	793 488 a		
1837	858 488 b	G1837C	G325R
	Δ7 488 a		
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
1838	Δ15 488 b	G1838T	G325L
1847	Δ7 488 a	A1847C	N328T
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	793 488 b		
	858 488 b		
1885	Δ2 488 a	C1885T	Κωδικόνιο λήξης
	Δ7 488 a		
	Δ13 488 a		
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	793 488 a		
	793 488 b		
	858 488 b		
1894	Δ7 488 a	A1894T	T344S
	Δ13 488 a		
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 a		
	858 488 b		
1897	Δ7 488 a	G1897A	V345I
	Δ13 488 a		
	Δ14 488 a		
	Δ15 488 b		
	858 488 b		
1939	A24 488 a	Προσθήκη 27 βάσεων	Αμινοξική Επανάληψη ***
2073	Δ2 533 a	G2073A	Κανένα
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		
2121	Δ2 533 a	A2121T	Q419H
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		
	796 533 b		
2169	Δ2 533 a	T2169C	Κανένα
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		

2189	Δ2 533 a	T2189C	I442T
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		
	793 533 a	T2189G	I442S
2277	Δ7 533 a	Προσθήκη A	Καταστροφή ORF
	Δ13 533 b		
	A24 533 a		
2379	Δ2 533 a	A2379G	Κανένα
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		
	Δ34 533 b	A2379C	
2424	Δ2 533 b	G2424A	M520I
	Δ7 533 a		
	Δ13 533 b		
	Δ15 533 b		
2428	Δ2 533 a	G2428T	D522Y
	Δ13 533 a		
	Δ15 533 a		
	Δ15 533 b		
	Δ34 533 a		
2487	A24 533a	Προσθήκη AA	Καταστροφή ORF
	A24 533 b	Προσθήκη A	D541E ****
	A38 533 a		
	A38 533 b		
2587	Δ13 405 b	A2587T	R575W
	Δ14 405 b		
	Δ30 405 a		
2604	Δ14 405 a	T2604A	H580Q
	Δ30 405 b		
	A38 405 b		

Πίνακας 7.5: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων και των αλλαγών που προκαλούν κατά μήκος του γονιδίου E1. Παρουσιάζονται οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται (σύμφωνα με την πρότυπη αλληλουχία).

* Τα πρώτα 19 νουκλεοτίδια της προσθήκης αποτελούν επανάληψη του τμήματος 1356-1374 και τα υπόλοιπα 44 αποτελούν επανάληψη του τμήματος 1312-1355.

** Η προσθήκη αποτελεί επανάληψη του τμήματος 1312-1374.

*** Η προσθήκη αποτελεί διπλασιασμό της αλληλουχίας 1913-1939.

**** Η προσθήκη A δεν προκαλεί καταστροφή του ORF αλλά αμινοξική αλλαγή, διότι η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου μετατρέπει την επόμενη αμέσως τριπλέτα σε κωδικόνιο λήξης.

Από αυτόν τον πίνακα είναι δυνατόν να εντοπίσουμε σε ποιες θέσεις παρατηρούνται πιο συχνά μεταλλάξεις και ποιες είναι αυτές. Πιο συγκεκριμένα, μπορούμε να παρατηρούμε εύκολα ότι κάποιες μεταλλάξεις εμφανίζονται πιο συχνά από άλλες ανάμεσα στους κλώνους των κλινικών δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν. Ακόμα, παρατηρούμε ότι στο τελευταίο και μικρότερο τμήμα (405 bp) για το οποίο αλληλουχήθηκαν τα δείγματα, οι μεταλλάξεις είναι σπάνιες και σε λίγα συγκριτικά δείγματα.

Οι μεταλλάξεις, όμως, που προκαλούν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι οι προσθήκες 63 ζευγών βάσεων στην θέση 1355 για το δείγμα 793 902 b και στη θέση 1374 για τα δείγματα 793 902 a, 868 902 a, 868 902 b και A38 645 a, καθώς και η προσθήκη 27 ζευγών βάσεων στη θέση 1939 για το δείγμα A24 488 a. Όπως εξηγήθηκε για την θέση 1355, τα πρώτα 19 νουκλεοτίδια της προσθήκης αποτελούν επανάληψη του τμήματος 1356-1374 ενώ τα υπόλοιπα 44 αποτελούν επανάληψη του τμήματος 1312-1355. Για την θέση 1374 η προσθήκη αποτελεί επανάληψη του τμήματος 1312-1374. Για την θέση 1939, η προσθήκη αποτελεί διπλασιασμό της αλληλουχίας 1913-1939. Οι προσθήκες (επαναλήψεις) αυτές προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται πως δεν καταστρέφουν το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου, προσθέτουν αμινοξέα στην παραγόμενη πρωτεΐνη και κάποιες από αυτές αναφέρονται για πρώτη φορά.

Παρακάτω, παρουσιάζονται πίνακες στους οποίους παραθέτονται τα ίδια στοιχεία από διαφορετική άποψη. Κάθε πίνακας αφορά σε μία περιοχή από τις βασικές τέσσερις που ενισχύθηκαν. Παρουσιάζονται οι κλώνοι των δειγμάτων που εμφανίζουν μεταλλάξεις, οι θέσεις των μεταλλάξεων όπως προκύπτουν από τον παραπάνω πίνακα, το αποτέλεσμα τους σε κάθε περίπτωση, και τέλος η κλινική εικόνα των δειγμάτων από τα οποία προέρχονται. Από τους πίνακες αυτούς μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για το κατά πόσο αλλοιωμένος εμφανίζεται για την κάθε περιοχή ο κάθε κλώνος, σε σύγκριση πάντα με την πρότυπη αλληλουχία για το E1 γονίδιο στελεχών HPV-16, καθώς και για την συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων ανάμεσα στους κλώνους που φέρουν μεταλλάξεις για κάθε ενισχυμένη περιοχή.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως εξής. Με πράσινη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι αμινοξικές μεταλλαγές και με κόκκινη γραμματοσειρά οι μεταλλάξεις που καταστρέφουν την πρωτεΐνη. Τέλος, με μαύρη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που δεν αλλάζουν την πρωτεΐνη.

Θέσεις μεταλλάξεων									
Κλώνος	949	1053	1289	1290	1355	1374	1395	Κλινική εικόνα	
Δ30 b	Καταστροφή ORF							CIN 1-2	
Δ34 b	Καταστροφή ORF							LGSIL	
A17 b				Q142H			Κωδικόνοιο λήξης	LG-CIN1	
A38 a		E23D				Καταστροφή ORF	Κωδικόνοιο λήξης	HG	
A38 b		E23D							
796 a	Καταστροφή ORF							LG	
796 b							Κωδικόνοιο λήξης		
793 a		E23D				Καταστροφή ORF		LG	
793 b		E23D	Q142H		Καταστροφή ORF				
858 a		E23D						LG	
868 a	Καταστροφή ORF	E23D				Καταστροφή ORF			
868 b		E23D		Q142H		Καταστροφή ORF		LG	
Αποτελέσματα Μεταλλάξεων									

Πίνακας 7.6: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή 645 bp (και 902 bp) ως προς κάθε κλώνο. Παρουσιάζονται οι κλώνοι, οι θέσεις των μεταλλάξεων και το αποτέλεσμα τους σε κάθε κλώνο, καθώς και η κλινική εικόνα κάθε δείγματος.

Θέσεις μεταλλάξεων															
Κλώνος	1574	1630	1678	1704	1735	1805	1837	1838	1847	1848	1885	1894	1897	1939	Κλινική εικόνα
Δ2 a											Κοιλιακό λιψής				CIN3
Δ7 a	C137F	Κοιλιακό λιψής			Κοιλιακό λιψής		G135R		N328T	E07L	Κοιλιακό λιψής	T344S	V345I		CIN 1-2
Δ7 b			G272R	E380S		S314N									
Δ13 a			G272R		Κοιλιακό λιψής	S314N					Κοιλιακό λιψής	T344S	V345I		HG CIN 3
Δ14 a	C137F	Κοιλιακό λιψής		E380S	E291K		G135R		N328T	E07L	Κοιλιακό λιψής	T344S	V345I		HG CIN 3
Δ15 a												T344S			
Δ15 b	C137F	Κοιλιακό λιψής	G272R				G135L	G135L	N328T	E07L	Κοιλιακό λιψής		V345I		HG CIN 3
A24 a														Καταπονοή ORF	LG CIN 1
793 a						S314I					Κοιλιακό λιψής				LG
793 b									N328T		Κοιλιακό λιψής				
858 b	C137F	Κοιλιακό λιψής		E380S			G135R		N328T	E07L	Κοιλιακό λιψής	T344S	V345I		LG
Αποτελέσματα Μεταλλάξεων															

Πίνακας 7.7: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή 488 bp ως προς κάθε κλώνο. Παρουσιάζονται οι κλώνοι, οι θέσεις των μεταλλάξεων και το αποτέλεσμα τους σε κάθε κλώνο, καθώς και η κλινική εικόνα κάθε δείγματος.

Θέσεις μεταλλάξεων										
Κλώνος	2073	2121	2169	2189	2277	2379	2424	2428	2487	Κλινική εικόνα
Δ2 a	Κανένα	Q419H	Κανένα	I442I		Κανένα		D522Y		CIN 3
Δ2 b							M520I			
Δ7 a					Καταστροφή ORF		M520I			CIN 1-2
Δ13 a	Κανένα	Q419H	Κανένα	I442I		Κανένα		D522Y		HG CIN 3
Δ13 b					Καταστροφή ORF		M520I			
Δ15 a	Κανένα	Q419H	Κανένα	I442I		Κανένα		D522Y		HG CIN 3
Δ15 b	Κανένα	Q419H	Κανένα	I442I		Κανένα	M520I	D522Y		
Δ34 a								D522Y		LGSIL
Δ34 b						Κανένα				
A24 a					Καταστροφή ORF				Καταστροφή ORF	LG CIN 1
A24 b									D541E	
A38 a									D541E	HG
A38 b									D541E	
793 a				I442S						LG
796 b		Q419H								LG
Αποτελέσματα Μεταλλάξεων										

Πίνακας 7.8: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή 533 bp ως προς κάθε κλώνο. Παρουσιάζονται οι κλώνοι, οι θέσεις των μεταλλάξεων και το αποτέλεσμα τους σε κάθε κλώνο, καθώς και η κλινική εικόνα κάθε δείγματος.

		Θέσεις μεταλλάξεων		
Κλώνος	2587	2604	Κλινική εικόνα	
Δ13 b	R575W		HG (CIN 3)	
Δ14 a		H580Q	HG (CIN 3)	
Δ14 b	R575W			
Δ30 a	R575W		CIN 1-2	
Δ30 b		H580Q		
A38 b		H580Q	HG	
Αποτελέσματα Μεταλλάξεων				

Πίνακας 7.9: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων για την περιοχή 405 bp ως προς κάθε κλώνο. Παρουσιάζονται οι κλώνοι, οι θέσεις των μεταλλάξεων και το αποτέλεσμα τους σε κάθε κλώνο, καθώς και η κλινική εικόνα κάθε δείγματος.

Από τους παραπάνω πίνακες είναι δυνατή η εξαγωγή διαφόρων συμπερασμάτων. Εύκολα, παρατηρούμε ότι η ενισχυμένη περιοχή 488 bp είναι αυτή στην οποία εμφανίζονται συσσωρευμένες οι περισσότερες μεταλλάξεις, ενώ η μικρότερη περιοχή των 405 bp εμφανίζει τις λιγότερες και σε λίγους μόνο κλώνους, παρά την πληθώρα διαθέσιμων κλώνων για τη συγκεκριμένη περιοχή. Επίσης, για την περιοχή 645 bp, παρατηρούμε εύκολα ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις καταστρέφουν την πρωτεΐνη. Τέλος, με τη βοήθεια των παραπάνω πινάκων καθίσταται εύκολη η παρατήρηση των κλώνων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συσσώρευση μεταλλάξεων και η σύνδεσή τους με την κλινική εικόνα που εμφανίζουν.

8. Συζήτηση

Οι HPV είναι μια ομάδα ιών χωρίς εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα γύρω από το καψίδιό τους και με δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους περίπου 8.000 ζευγών βάσεων. Προσβάλλουν και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά σε κερατινοκύτταρα (επιθηλιοτροπικοί ιοί). Ορισμένοι τύποι του ιού ευθύνονται για την πρόκληση αλλοιώσεων στο επιθήλιο του δέρματος (θηλώματα) και στο επιθήλιο του βλεννογόνου (κονδυλώματα) οι οποίες είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε κακοήγη όγκο και στην εμφάνιση καρκίνου. Οι HPV χωρίζονται σε τρεις ομάδες επικινδυνότητας ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκαλούν στον ξενιστή. Οι τύποι υψηλού κινδύνου ευθύνονται για το 90% των περιστατικών καρκίνου της μήτρας. Από αυτά τα περιστατικά, για το 50% ευθύνεται ο HPV-16. Παρόλο που η χρήση του test pap έχει μειώσει την θνησιμότητα και την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου στις ανεπτυγμένες χώρες, η ασθένεια εξακολουθεί να αποτελεί αιτία θανάτου για χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο ανά τον κόσμο.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η φυλογενετική και γενωμική ανάλυση της E1 γενωμικής περιοχής στελεχών HPV-16. Η E1 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη με δραστηριότητες ελικάσης και ATPάσης, η οποία σχετίζεται με την αντιγραφή του ιικού γενώματος. Για την πραγματοποίηση της πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 18 κλινικά δείγματα χαμηλής και υψηλής αλλοίωσης. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων του γονιδίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα κλωνοποιήθηκαν και οι κλώνοι που συλλέχθηκαν αλληλουχήθηκαν. Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με προγράμματα πληροφορικής για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία για το E1 γονίδιο του HPV-16.

Από τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε PCR, τελικά δεν ενισχύθηκαν καθόλου κάποια για την περιοχή 645 bp που αντιστοιχεί στο εκκινητικό ζεύγος E1F1 – E1R3 (πίνακας 7.2). Αυτό ίσως οφείλεται σε ρήξη του γονιδίου στην συγκεκριμένη περιοχή. Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης των επισωμάτων του ιού στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή, το γένωμα του ιού διαρρηγνύεται. Η ρήξη αυτή συμβαίνει συνήθως στο E2 γονίδιο, αλλά παρατηρείται και στο E1. Στην εργασία των Hugo Arias-Pulido et al (2006) ερευνήθηκαν αυτές οι περιοχές ρήξης. Όσον αφορά στο γονίδιο E1, κατέληξαν ότι η συχνότερη περιοχή ρήξης είναι μεταξύ των εκκινητικών ζευγών E1F6 – E1R6 (nt 1952 ως 2186) και ακολουθεί η περιοχή

ανάμεσα στα εκκινητικά ζεύγη E1F4 – E1R7 (nt 1503 ως 2485). Σε ορισμένα δείγματα εντόπισαν ως πιθανή περιοχή ρήξης σε μικρότερη συχνότητα το τμήμα που ενισχύεται από τα εκκινητικά ζεύγη E1F1 – E1R3. Η περιοχή αυτή είναι η ίδια, που λόγω αδυναμίας ενίσχυσής της υποθέτουμε ότι έχει υποστεί ρήξη στα δείγματα Δ2, Δ7, Δ13, Δ16 και 747.

Από τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάσαμε (εικόνες 7.4 ως 7.7) και από τις πληροφορίες από τη βάση δεδομένων BLAST για όλες τις αλληλουχίες, προκύπτει ότι σχεδόν όλοι οι κλώνοι είτε ομαδοποιούνται με το ευρωπαϊκό variant, είτε μπορούν να ομαδοποιηθούν και με το ευρωπαϊκό και με το ασιατικό variant. Τα δύο αυτά variants εμφανίζουν πολύ υψηλή ομοιότητα μεταξύ τους και ίσως αυτός είναι ο λόγος που δεν μπορεί να γίνει σαφής ομαδοποίηση. Ωστόσο, υπάρχουν και κλώνοι που εμφανίζουν σαφή ομαδοποίηση με μη ευρωπαϊκά variants. Πιο συγκεκριμένα, οι κλώνοι A17 645 a και b, A17 488 a, A17 533 και A17 405 a και b ομαδοποιούνται με το αφρικανικό τύπου II και οι κλώνοι Δ30 645 b, Δ30 488 a, Δ16 533 a, 796 533 a, A24 533 b, Δ30 405 b, Δ14 405 a και A38 b ομαδοποιούνται με το ασιατικό variant.

Σύμφωνα με τους Sichero et al (2007), μολύνσεις από μη Ευρωπαϊκά variants των HPV-16 και 18 σχετίζονται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης νεοπλασιών. Ωστόσο, σχεδόν όλα τα δείγματα τα οποία ομαδοποιούνται με μη ευρωπαϊκά variants σε αυτήν την εργασία προέρχονται από χαμηλού ή μέτριου βαθμού νεοπλασίες (πίνακας 5.1). Επίσης, από τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ομαδοποίησης των κλώνων που αλληλουχήθηκαν, φαίνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις κλώνοι από το ίδιο δείγμα ομαδοποιούνται διαφορετικά μεταξύ τους. Αυτό μάλλον αποτελεί ένδειξη πολλαπλής λοίμωξης (διαφορετικά variants) στα συγκεκριμένα άτομα από τα οποία συλλέχθηκαν τα εν λόγω δείγματα.

Τα αποτελέσματα της γενωμικής ανάλυσης παρουσιάστηκαν συγκεντρωτικά στους πίνακες 7.5 ως 7.9. Εντοπίστηκε και χαρακτηρίστηκε πληθώρα μεταλλάξεων κατά μήκος του γονιδίου. Μέχρι στιγμής δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην γενωμική ανάλυση του E1 γονιδίου από τη διεθνή βιβλιογραφία. Ενώ πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν αναφερθεί στην μεταβλητότητα των γονιδίων E2, L1 και L2, καθώς και της περιοχής LCR, δεν υπάρχουν γενικότερα ιδιαίτερες αναφορές στην βιβλιογραφία για την μεταβλητότητα της περιοχής E1 ή τον πιθανό συσχετισμό της με την ογκογονικότητα των HPV-16. Έτσι, δεν καθίσταται δυνατή η σύγκριση της ανάλυσης της παρούσας εργασίας με άλλες ερευνητικές μελέτες σε μεγάλο βαθμό.

Από τους πίνακες παρατηρούμε εύκολα ότι κάποιες μεταλλάξεις εμφανίζονται πιο συχνά από άλλες ανάμεσα στους κλώνους των κλινικών δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα οι νουκλεοτιδικές μεταλλαγές A1053C, A1847C, C1885T, A1894T, G1897A, A2121T, G2428T εμφανίζονται σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικούς κλώνους κλινικών δειγμάτων. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και σε σύγκριση με τον πίνακα 7.5, η νουκλεοτιδική μεταλλαγή A1053C που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή E23D εμφανίζεται σε 7 από τους 16 διαθέσιμους κλώνους για την συγκεκριμένη περιοχή, δηλαδή περίπου σε ποσοστό 44%. Επίσης, η νουκλεοτιδική μεταλλαγή C1885T που προκαλεί μετατροπή του αμινοξέος σε κωδικόνιο λήξης εμφανίζεται σε 8 από τους 17 διαθέσιμους κλώνους για την συγκεκριμένη περιοχή, δηλαδή σε ποσοστό περίπου 47%.

Πολλές από τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν καταστρέφουν το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ή μετατρέπουν κωδικές τριπλέτες σε μη κωδικές. Ως αποτέλεσμα, στις περιπτώσεις αυτές παράγεται μη λειτουργική πρωτεΐνη. Σύμφωνα με τους Romanczuk et al (1991), μεταλλάξεις που προκαλούν καταστροφή των ORF οδηγούν σε αύξηση της αθανατοποίησης των κερατινοκυττάρων ευνοώντας στην πρόοδο προς την εμφάνιση καρκίνου μιας και με αυτόν τον τρόπο παρατηρείται έξαρση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρησαν πως μία σημειακή έλλειψη στη θέση 1138 (που προκαλεί καταστροφή του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου) οδηγεί σε αθανατοποίηση των κερατινοκυττάρων. Ωστόσο, σε πειράματα με διορθωμένο αναγνωστικό πλαίσιο, παρατηρήθηκε μειωμένη δυνατότητα αθανατοποίησης. Συμπεράναν πως τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι αυτή η διαφορά οφειλόταν στην ακεραιότητα του E1 ORF. Τα αποτελέσματα αυτά δεν έρχονται σε σύγκρουση με αυτά της δικής μας μελέτης, καθώς πάνω από τις μισές μεταλλάξεις που προκαλούν καταστροφή της πρωτεΐνης προέρχονται από ασθενείς με προχωρημένο βαθμό νεοπλασίας.

Σε εργασίες των Yasugi et al (1997), μελετήθηκε η δυνατότητα αντιγραφής του ιού μετά από τυχαία μεταλλαξιγένεση κατά μήκος του E1 γονιδίου. Από τις 8 μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν, οι 5 (S330R, Y412F, W439R, G482D, και G496R) οδήγησαν σε πλήρη αναστολή της αντιγραφής. Στην παρούσα μελέτη ανάμεσα σε άλλες μεταλλάξεις εντοπίστηκαν οι N328T, Q419H, I442S και I442T οι οποίες (δεδομένης της μικρής απόστασης των αμινοξέων που αφορούν από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω) είναι πολύ πιθανόν να επηρεάζουν αρνητικά ως και να αναστέλλουν την ιική αντιγραφή. Η ίδια ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα 162 – 284 είναι τα πιο σημαντικά για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με το DNA, ενώ το μικρότερο πεπτίδιο που διατηρεί τη δυνατότητα σύνδεσης με την περιοχή εκκίνησης της

αντιγραφής ειδικά, αποτελείται από τα αμινοξέα 121 – 311. Μεταλλάξεις σε σημεία αυτής της περιοχής απενεργοποιούν τη σύνδεση της ολόκληρης E1 πρωτεΐνης με το DNA. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε πως όλες οι μεταλλάξεις που εντοπίσαμε σε αυτήν την περιοχή (Q142H, C237F, G272R, R280S, I307L, οι μη κωδικές μεταλλάξεις στις θέσεις 1395, 1630, 1735 καθώς και οι προσθήκες στις θέσεις 1355 και 1374) επηρεάζουν αρνητικά ή αναστέλλουν αυτήν την λειτουργία της πρωτεΐνης. Τέλος, η ομάδα κατέληξε πως τα καρβοξυτελικά αμινοξέα της E1 είναι αναγκαία για την αλληλεπίδρασή της με την E2. Πιο συγκεκριμένα, το μικρότερο τμήμα που είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με την E2 αποτελείται από τα αμινοξέα 421 – 649, ενώ τα αμινοξέα 144 – 420 διαδραματίζουν ρόλο σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των E1 και E2 σε φυσιολογικές θερμοκρασίες. Με το ίδιο σκεπτικό, οι μεταλλάξεις που εντοπίσαμε στις συγκεκριμένες θέσεις μπορούμε να υποθέσουμε πως επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης E1 με την E2.

Ωστόσο, από τα αποτελέσματα της γενωμικής αυτής ανάλυσης το μεγαλύτερο ίσως ενδιαφέρον το προκαλούν οι μεγάλες προσθήκες – διπλασιασμοί που εντοπίστηκαν στις θέσεις 1355, 1374 (63 nt). Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για τέτοιου είδους προσθήκες στην περιοχή του E1 γονιδίου. Εξαιρεση αποτελεί η εργασία των Ivan Sabol et al (2008), οι οποίοι εντόπισαν μία παρόμοια προσθήκη 63 νουκλεοτιδίων στη θέση 1373. Η προσθήκη αυτή αφορούσε σε διπλασιασμό της περιοχής 1311 – 1373, ενώ όπως αναφέρθηκε, η προσθήκη που εντοπίσαμε εμείς στη θέση 1374 είναι μετατοπισμένη κατά ένα νουκλεοτίδιο (1312-1374) (διαφορά που ίσως οφείλεται σε διαφορετική αρίθμηση) και η προσθήκη στη θέση 1355 αφορά σε επανάληψη του τμήματος 1356 – 1374 για τα πρώτα 19 νουκλεοτίδια της προσθήκης και σε επανάληψη του τμήματος 1312 – 1355 για τα υπόλοιπα 44 (προσθήκη με διπλασιασμούς εκατέρωθεν τμημάτων). Έναν διπλασιασμό 63 βάσεων στο E1 γονίδιο είχαν εντοπίσει και παλιότερα οι Dong et al (2000), μετά από ανάλυση 28 δειγμάτων HPV-16 θετικά για τον καρκίνο της μήτρας, κατά τη διάρκεια άλλου είδους έρευνας στον κινεζικό πληθυσμό. Από αυτές τις δύο έρευνες προκύπτει ότι η προσθήκη αυτή έχει παγκόσμια κατανομή και δεν περιορίζεται σε μία μόνο ήπειρο. Οι ασθενείς που φέρουν στελέχη με την προσθήκη αυτή και για τις δύο μελέτες που αναφέρθηκαν, αλλά και για την παρούσα, δεν έχουν παρακολουθηθεί μετά από τη συλλογή τραχηλικών δειγμάτων και έτσι δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα της μόλυνσης και το αν η ύπαρξη της προσθήκης προκαλεί αλλαγές στην ογκογονικότητα του ιού.

Η περιοχή στην οποία εμφανίζονται οι εν λόγω προσθήκες δεν σχετίζεται με κάποια

λειτουργία, παρά έμμεσα, με τη σύνδεση ιστονών. (Wilson et al, 2002, Swindle and Engler et al, 1998). Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως οι προσθήκες που εντοπίστηκαν στις θέσεις 1355 και 1374, ίσως επηρεάζουν αυτή την σύνδεση. Επίσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα αμινοξέα 144 – 420 διαδραματίζουν ρόλο σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των E1 και E2 σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, κάτι που μπορεί να επηρεάζεται από μία τέτοια προσθήκη. Οι έρευνες των Sabol et al, υποστηρίζουν ότι η προσθήκη μπορεί να σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα ογκογονικότητας, και μάλιστα για το variant HPV-16 G350 το οποίο σχετίζεται με αυξημένη γενικά ογκογονικότητα. Καταλήγουν, επίσης, ότι έτσι μπορεί να εξηγηθούν οι διαφορές ογκογονικότητας του variant E6-G350 σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Σε αυτό το σημείο πρέπει επίσης, να σημειωθεί πως δεν υπάρχει κάποια προηγούμενη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για προσθήκη στη θέση 1939 ή έστω κοντά σε αυτήν την περιοχή. Επομένως, η προσθήκη 27 νουκλεοτιδίων που εντοπίστηκε σε αυτήν τη θέση (για τον κλώνο A24 488 b) ίσως αποτελεί μία νέα ανακάλυψη.

Εν ολίγοις, μπορούμε να πούμε συμπερασματικά πως η E1 περιοχή στελεχών HPV-16 αλλά και άλλων τύπων HPV αποτελεί σημαντικό στόχο για μελλοντικές μελέτες και ιδιαίτερα όσον αφορά στη μεταβλητότητα της περιοχής μιας και οι γνώσεις πάνω στον συγκεκριμένο τομέα είναι λίγες. Ενδιαφέρουσα, επίσης, θα ήταν και η πρωτεωμική προσέγγιση αυτού του θέματος με σκοπό την ανακάλυψη των αλλαγών που προκαλούν σε επίπεδο στερεοχημείας μεταλλάξεις σαν αυτές που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα εργασία. Η πρωτεΐνη E1 επιτελεί διάφορες σημαντικές διεργασίες κατά τον κύκλο ζωής του ιού και αλληλεπιδρά με πληθώρα ιικών και κυτταρικών μορίων. Απαιτείται ακόμα έρευνα για τη διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους επιλέγεται η θέση ρήξης του ιικού γενώματος και επιτελείται η ενσωμάτωση στο χρωμοσωμικό DNA των κυττάρων του ξενιστή. Το γεγονός, επίσης, ότι η αλλοίωση της συγκεκριμένης γενωμικής περιοχής διευκολύνει μάλλον την πρόοδο της μόλυνσης σε καρκίνο αυξάνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών E6 και E7 και το γεγονός ότι η E1 είναι αναγκαία για την αντιγραφή και την παθογένεια του ιού, αποτελεί κίνητρο για να ερευνηθεί περαιτέρω η δυνατότητα ανάπτυξης φαρμάκων με στόχο την E1 πρωτεΐνη. Αξίζει επίσης, να ερευνηθεί αν υπάρχουν variants με μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αυξημένη ή μειωμένη ογκογονικότητα του ιού. Αυτού του είδους η ταξινόμηση γίνεται προς το παρόν με μελέτη των περιοχών E6, L1, L2, και LCR, και θα ήταν ίσως ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα και χρήσιμη μία τέτοιου είδους προσέγγιση από την μελέτη της περιοχής E1.

Βιβλιογραφία

1. ANTONIO J. AMORTEGUI and MICHAEL P. MEYER. In-Situ Hybridization for the Diagnosis and Typing of Human Papillomavirus. 1990
2. Artandi SE, Attardi LD, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*(3):881-90.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Biochemistry, Nottingham University - 3.0 Enzymes of the Ubiquitin Pathway. Retrieved 2007-05-01.
7. 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
8. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* 1984; 3:1151–1157
9. Bossis I, Roden RB, Gambhira R, et al. (2005). "Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection". *J. Virol.* 79 (11): 6723–31. doi:10.1128/JVI.79.11.6723-6731.2005. PMID 15890910.
10. Bravo IG, Alonso A (2004). "Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth". *J. Virol.* 78 (24): 13613–26. doi:10.1128/JVI.78.24.13613-13626.2004. PMID 15564472
11. 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.
12. Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen, 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Viol J.*
13. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT 2004 Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7
14. Campos SK, Ozbun MA (2009). "Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes". *PLoS ONE* 4 (2): e4463. doi:10.1371/journal.pone.0004463. PMID 19214230.

15. Carter JJ, Wipf GC, Madeleine MM, Schwartz SM, Koutsky LA, Galloway DA (2006). "Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera". *J. Virol.* 80 (10): 4664–72. doi:10.1128/JVI.80.10.4664-4672.2006. PMID 16641259.
16. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. (1999) Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the *e2* gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer*: 83, 449–45
17. Cates W Jr. 1999 Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis.*26(Suppl.):S2–7.
18. 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
19. Chen, G., and A. Stenlund. 2000. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol.*74:1506–1512.
20. 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.
21. 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.
22. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* (5):275-82
23. COSETTE M. WHEELER, TAKASHI YAMADA, ALLAN HILDESHEIM, AND STEVEN A. JENISON. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variants: Identification by E6 and L1 Lineage-Specific Hybridization. 1997
24. 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.
25. Cricca, M., et al., Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.005
26. 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.
27. 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.
28. 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.* 101 (39): 14252–7. doi:10.1073/pnas.0404229101. PMID 15383670.

29. Day PM, Lowy DR, Schiller JT (2003). "Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway". *Virology* 307 (1): 1–11. doi:10.1016/S0042-6822(02)00143-5. PMID 12667809.
30. 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.
31. De Schryver A, Meheus A. 1990. Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bull World Health Organ.*68:639–54.
32. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27
33. 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.
34. Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71:9343–9349.
35. Dong X, Zhou W, Pfister H. Presence of genetic rearrangements in E1/E2 regions of episomal HPV 16 isolates from cervical carcinomas. 2000
36. Doorbar J (2005). "The papillomavirus life cycle". *J. Clin. Virol.* 32 Suppl 1: S7–15. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.006. PMID 15753007.
37. Doorbar J 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541).
38. Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH (1986). "Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products". *EMBO J.* 5 (2): 355–62. PMID 3011404
39. 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.
40. Dowhanick, J. J., A. A. McBride, and P. M. Howley. 1995. Suppression of VOL. 68, 2004 HPV PATHOGENESIS IN DIFFERENTIATING EPITHELIA 369 cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 69:7791– 7799.
41. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3812–3815.
42. Dyson N, Guida P, Munger 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.
43. Ethel-Michele de Villiers, a Claude Fauquet,b Thomas R. Broker,c Hans-Ulrich Bernard,d,* and Harald zur Hausena. Classification of papillomaviruses. 2004

44. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA (1997). "Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses". *J. Virol.* 71 (3): 2449–56. PMID 9032382.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* (8):4818-26.
49. 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.
50. Fraiser, LD et al 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360.
51. Francis Sverdrupa and Gerald Myersb. *The E1 Proteins.* 1997
52. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799–804.
53. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12398–12402.
54. 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
55. Gillison, 2001. *J. National Cancer inst.*
56. Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M (2001). "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate". *J. Virol.* 75 (3): 1565–70. doi:10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001. PMID 11152531.
57. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. 2002. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 186:462–9.
58. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R (2000). "Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins". *Oncogene* 19 (46): 5270–80. doi:10.1038/sj.onc.1203906. PMID 11077444.
59. Goodwin, E. C., E. Yang, C. J. Lee, H. W. Lee, D. DiMaio, and E. S. Hwang. 2000. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10978–10983.

60. Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM, Guan Sim K, Hsu SI, Bernard HU (2003). "The human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell-cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1" *Virology*
61. Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, M. Oldak, H. J. Pfister, and S. Smola- Hess. 2003. The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J. Virol.* 77:5253–5265.
62. 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.
63. Heise A. 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19
64. HELEN ROMANCZUK AND PETER M. HOWLEY. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. 1992
65. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.*338:423–8.
66. 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
67. 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
68. Hoory Talia, Archana Monie, Patti Gravitt,T.-C. Wu. 2008. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus, [*J Formos Med Assoc*;107(3):198–217]
69. 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.
70. Howley PM, Lowy DR. 2007. Papillomaviruses. In: Knipe. DM,Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,:2299–354
71. Hugo Arias-Pulido, Cheri L. Peyton, Nancy E. Joste, Hernan Vargas, and Cosette M. Wheeler. Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. 2006
72. 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.
73. iHOP information Hyperlinked over Proteins UBE3A. Retrieved 2007-05-01.
74. Ivan Sabol, Mihaela Matovina, Nina Milutin Gasperov, Magdalena Grce. Identification of a Novel Human Papillomavirus Type 16 E1 Gene Variant With Potentially Reduced Oncogenicity. 2008
75. Jackson ME, Pennie WD, McCaffery RE, Smith KT, Grindlay GJ, Campo MS (1991). "The B subgroup bovine papillomaviruses lack an identifiable E6 open reading frame". *Mol. Carcinog.* 4 (5): 382–7. doi:10.1002/mc.2940040510. PMID 1654923.

76. Jeon, S., and P. Lambert. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1654–1658
77. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, *et al.* (1999). "The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes". *J. Biol. Chem.* 274 (9): 5810–22. doi:10.1074/jbc.274.9.5810. PMID 10026203.
78. Kämper N, Day PM, Nowak T, *et al.* (2006). "A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes". *J. Virol.* 80 (2): 759–68. doi:10.1128/JVI.80.2.759-768.2006. PMID 16378978.
79. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM (2005). "The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase". *J. Virol.* 79 (6): 3737–47. doi:10.1128/JVI.79.6.3737-3747.2005. PMID 15731267. PMC 1075713.
80. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M (1997). "Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (21): 11612–6. doi:10.1073/pnas.94.21.11612. PMID 9326658. PMC 23554.
81. 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: 6132–6.
82. Klumpp, D. J., and L. A. Laimins. 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 257:239–246
83. Ko, L., and C. Prives. ,1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. Liu, J. P. ,1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
89. Longworth M.S.and L.A. Laimins. 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, *microbiology and molecular biology reviews*, June, p. 362–372

90. 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.
91. Lysann Schädlich, Tilo Senger, Britta Gerlach, Norbert Mücke, Corinna Klein, Ignacio G. Bravo, Martin Müller, Lutz Gissmann. Analysis of modified HPV 16 L1 capsomeres: The ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity. 2009
92. Mahdavi A, Monk BJ. ,2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
93. Mako Narisawa-Saito and Tohru Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. 2007
94. McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG (2004). "Brd4: tethering, segregation and beyond". *Trends Microbiol.* 12 (12): 527–9. doi:10.1016/j.tim.2004.10.002. PMID 15539109.
95. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M (1999). "Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells". *Virology* 261 (2): 271–9. doi:10.1006/viro.1999.9825. PMID 10497112.
96. Mistry N, Wibom C, Evander M (2008). "Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism". *Virol J.* 5: 118. doi:10.1186/1743-422X-5-118. PMID 18854037.
97. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S et al. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*;285:2995–3002.
98. Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11 451–60.
99. Munger, K., Howley, P.M., 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89, 213– 228
100. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*;348:518–27.
101. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissmann L (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer". *Vaccine* 24 (3): S1S10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115. PMID 16949995.
102. Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005; 11: 350–9.
103. Narisawa-Saito Mako and Tohru Kiyono, Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins, 2007, Virology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan
104. 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.

105. Nishimura A, Nakahara T, Ueno T, et al. (2006). "Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells". *Microbes Infect.* 984–93. doi:10.1016/j.micinf.2005.10.015. PMID 16500131.
106. Pastrana DV, Gambhira R, Buck CB, et al. (2005). "Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2". *Virology* 337 (2): 365–72. doi:10.1016/j.virol.2005.04.011. PMID 15885736.
107. 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.
108. Pfister H. 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer, *J Natl Cancer Inst Monogr* 52–56
109. 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.
110. Rebrikov, D.V., Bogdanova, E.A., Bulina, M.E., Lukyanov, S.A., 2002. A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtractive hybridization. *Mol. Biol.* 36, 813–820.
111. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2006). "Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (5): 1522–7. doi:10.1073/pnas.0508815103. PMID 16432208.
112. Robert D. Burk Zigu Chen Koenraad Van Doorslaer. *Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity* 2009
113. 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.
114. Romanczuk, H., and P. Howley. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3159–3163.
115. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16, E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998; 12: 2061–72.
116. Rui Zhao, and Xiaojiang S. Chen Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, Michael Klein, Robert L. Garcea, Neil D. Christensen. *Crystal Structures of Four Types of HPV L1 Capsid Proteins: Understanding the Specificity of Neutralizing Monoclonal Antibodies.* 2007
117. Sarah Jolly Perrine Pinon. *Présentation générale de la famille des Papillomaviridae* 2005
118. 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.
119. 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.
120. Selinka HC, Giroglou T, Sapp M (2002). "Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions". *Virology* 299 (2): 279–287. doi :10.1006/viro. 2001.1493. PMID 12202231.

121. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J et al. 2003. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*;168:421–5.
122. 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
123. 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.
124. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl 1): S25–33.
125. 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.
126. 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.
127. Swindle CS, Engler JA. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):1994-2001
128. Sylvia Michelina Fernandes, Brenna Kari Juhani Syrjänen. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV) associated cervical carcinogenesis. 2003
129. 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.
130. 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.
131. TOSHIHARU YASUGI, JOHN D. BENSON HIROYUKI SAKAI MARC VIDAL, AND PETER M. HOWLEY. Mapping and Characterization of the Interaction Domains of Human Papillomavirus Type 16 E1 and E2 Proteins. 1997
132. TOSHIHARU YASUGI, MARC VIDAL, HIROYUKI SAKAI, PETER M. HOWLEY, AND JOHN D. BENSON. Two Classes of Human Papillomavirus Type 16 E1 Mutants Suggest Pleiotropic Conformational Constraints Affecting E1 Multimerization, E2 Interaction, and Interaction with Cellular Proteins. 1997
133. Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett* 2002; 179: 205–12.
134. 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.
135. Vizcaino, A., V. Moreno, F. Bosch, N. Munoz, X. Barros-Dios, J. Borrás, and D. Parkin. 2000. International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 86:429–435.

136. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229–42.
137. 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.
138. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353: 831–7.
139. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002 Jun;24(3):275-90.
140. 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.
141. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*;157:218–26.
142. Yang R, Yutzy WH, Viscidi RP, Roden RB (2003). "Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection". *J. Biol. Chem.* 278 (14): 12546–53. doi:10.1074/jbc.M208691200. PMID 12560332.
143. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 668–73.
144. Zheng Zhi-Ming and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci*. 11: 2286–2302
145. zur Hausen H: Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78:1–30
146. Zur Hausen, H (2000) J. National Cancer inst. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis
147. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–50.

