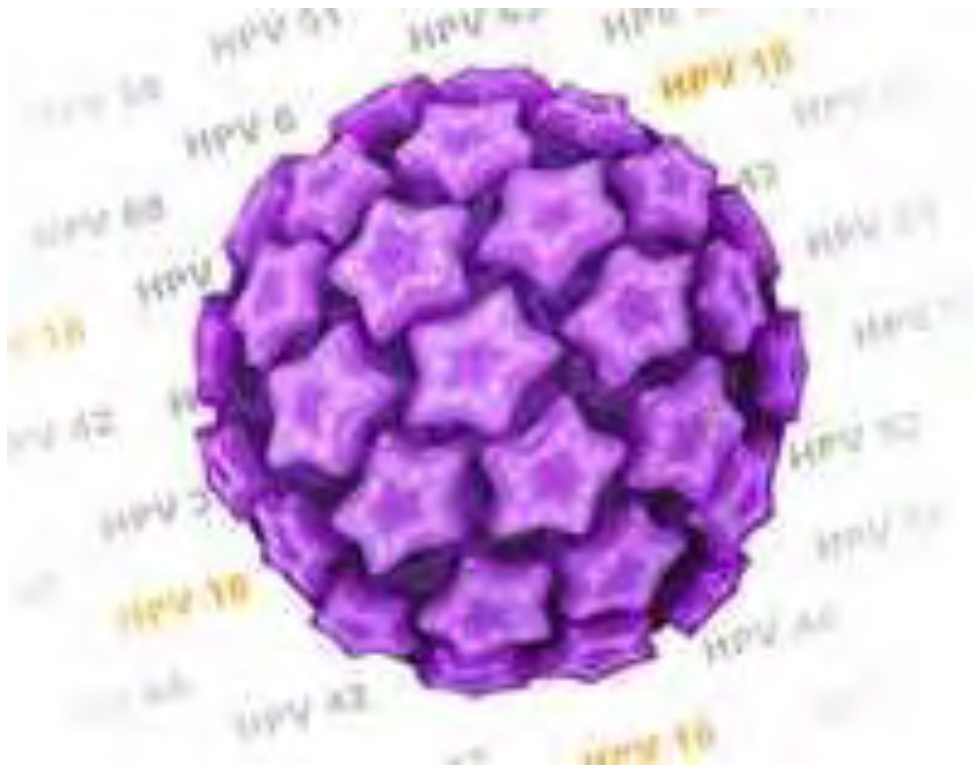




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διπλωματική Εργασία
« Συχνότητα του ιού HPV στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα υγιούς
πληθυσμού της Θεσσαλίας »**



**« HPV frequency in the oral system of the healthy population of the
Thessaly region »**

**Μπαλτζή Δέσποινα
Λάρισα, 2013**

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο « Συχνότητα του ιού HPV στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα υγιούς πληθυσμού της Θεσσαλίας » - « HPV frequency in the oral system of the healthy population of the Thessaly region » εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

- **Μαθιόπουλος Κ.**
- **Μαρκουλάτος Π.**
- **Πετεινάκη Ε.**

Ημερομηνία κατάθεσης διπλωματικής εργασίας: 25/09/2013

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή και δάσκαλό μου, κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία και δίνοντάς μου την ευκαιρία να δουλέψω κοντά του, σε έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα τομέα. Οι γνώσεις που μου προσέφερε ήταν πολύτιμες, όπως και η συνεχής βοήθεια του, όχι μόνο κατά τη διεξαγωγή της εργασίας μου, αλλά και κατά τη διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα έρευνα και για τη βοήθειά τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη, χωρίς τη βοήθεια και τις καταλυτικές συμβουλές της οποίας δεν θα τα κατάφερα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Εύη Κακάνη, τον κ. Νίκο Ζυγουρίδη, την κ. Μαριλένα Γρηγορίου και τις συμφοιτήτριες και καλές μου φίλες Βασιλική Λυγηρού και Ευαγγελία Κουβάτα, για τη βοήθειά τους, την άπογη συνεργασία και την όμορφη ατμόσφαιρα του εργαστηρίου.

**Στους ανθρώπους που τόσο καιρό είναι δίπλα μου και με στηρίζουν,
Γεώργιο, Δέσποινα και Κατερίνα Μπαλτζή....
Και στον αγώνα της μαμάς μου...**

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	10
1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά των Human papillomaviruses (HPVs).....	11
1.2. Κλινικά δεδομένα για τους HPV.....	12
i. Επιδημιολογικά δεδομένα ανά τον κόσμο.....	12
ii. Τρόποι Μετάδοσης των HPV.....	15
iii. Ευπαθή μέρη του σώματος στους HPV.....	15
iv. Νοσολογικές οντότητες- Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	16
v. Αντίδραση ανοσοποιητικού συστήματος στον ιό HPV.....	18
vi. Κλινική Διάγνωση των HPV.....	18
vii. Πρόληψη.....	19
viii. Θεραπεία.....	19
1.3. Κύκλος Ζωής των HPV.....	20
1.4. Βιολογία των HPV.....	23
i. Ταξινόμηση- Κατηγοριοποίηση των Human papillomaviruses (HPVs).....	23
ii. Δομή των HPV.....	27
iii. Ιικές πρωτεΐνες.....	30
1.5. Εργαστηριακή Διάγνωση των HPV.....	36
1.6. Σκοπός Πειραματικής Διαδικασίας.....	38
Υλικά- Μέθοδοι.....	39
2.1. Κλινικά Δείγματα.....	40
i. Συλλογή φαρυγγικού επιχρίσματος.....	40
2.2. Χειρισμοί γενωμικού DNA.....	40
i. Απομόνωση DNA.....	40
ii. Εκκύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο.....	40
iii. Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη.....	41
iv. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction).....	42
2.3. Χειρισμοί Πλασμιδιακού DNA.....	43
i. Πλασμίδια.....	43
ii. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	43
iii. Δημιουργία Φορέα T-άκρων.....	44
2.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	45
i. Χρήση ειδικών εκκινητών για την ανίχνευση HPV μόλυνσης (Primers).....	47
ii. Χρήση ειδικών ενζύμων πολυμερισμού για την ανίχνευση HPV μόλυνσης.....	47
iii. Real- Time PCR.....	49
iv. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-γλοβουλίνης με εκκινητές GH20/PCO4.....	49
v. PCR με εκκινητές PGMY09/11- HMB01.....	50
vi. PCR με εκκινητές MY09/11.....	51
vii. Nested PCR με εκκινητές GP5+/6+.....	52
2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA.....	53

2.6	Κλωνοποίηση σε Πλασμιδιακούς Φορείς.....	55
	i. Μοριακή Κλωνοποίηση.....	55
	ii. DNA που συμμετέχουν στην κλωνοποίηση.....	55
	iii. Αντίδραση Σύνδεσης Μορίων DNA (Ligation).....	55
	iv. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση....	57
	v. Διάκριση ανασυνδυασμένων- μη ανασυνδυασμένων κυττάρων.....	58
	vi. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με Mini-PrePs.....	59
2.7.	Αλληλούχη και ταυτοποίηση με προγράμματα Βιοπληροφορικής	60
	Αποτελέσματα.....	64
3.1.	Αποτελέσματα Real- Time PCR.....	65
3.2.	Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-γλοβουλίνης με εκκινητές GH20/PCO4.....	67
3.3	Αποτελέσματα PCR με εκκινητές PGMY09/11- HMB01	68
3.4	Αποτελέσματα PCR με εκκινητές MY09/11.....	70
3.5.	Αποτελέσματα Nested PCR με εκκινητές GP5+/6+.....	73
3.6.	Αποτελέσματα Κλωνοποίησης.....	75
	Συζήτηση.....	76
	Βιβλιογραφία.....	79

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomaviruses, HPVs) ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι κυκλικοί DNA ιοί, μεγέθους περίπου 7900bp, χωρίς εξωτερικό περίβλημα, που αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται μέσα σε επιθηλιακά κύτταρα. Παρουσιάζουν ειδικό τροπισμό για το καλυπτήριο επιθήλιο του δέρματος και του βλενογόννου, στο οποίο προκαλούν είτε απλά κονδυλώματα είτε υπερπλαστικές και ογκόμορφες αλλοιώσεις.

Έχουν βρεθεί πάνω από 200 τύποι HPVs, οι οποίοι ανάλογα με την ογκογενετική τους ικανότητα να προκαλούν καρκίνο, διαχωρίζονται σε υψηλής επικινδυνότητας (high-risk) και χαμηλής επικινδυνότητας (low-risk) τύπους. Οι υψηλής επικινδυνότητας τύποι ανιχνεύονται σε περιπτώσεις καρκίνου, ενώ οι χαμηλής επικινδυνότητας προκαλούν απλά θηλώματα, τα οποία τις περισσότερες φορές καθαρίζουν από μόνα τους.

Οι HPVs ανιχνεύτηκαν αρχικά σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας και γενικότερα του γεννητικού συστήματος, όμως πολύ γρήγορα έγινε συσχετισμός και με άλλα είδη καρκίνου. Αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας στις μέρες μας, καθώς παρατηρείται η παρουσία τους σε καρκινώματα του ανώτερου αναπνευστικού, συμπεριλαμβανομένης της στοματικής κοιλότητας. Παρότι αιτιοπαθογενετικά η ύπαρξή τους κρίνεται απαραίτητη για την πρόκληση καρκίνου έχουν βρεθεί και άλλοι ενοχοποιούμενοι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, με το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ, να αποτελούν τους βασικότερους.

Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσής τους είναι μέσω της σεξουαλικής επαφής, γεγονός που φαίνεται να δικαιολογεί την αλλαγή της τοπολογίας του ιού, από το γεννητικό στο αναπνευστικό σύστημα, αν και δεν είναι απόλυτα τεκμηριωμένο. Σημαντικό ρόλο λοιπόν παίζει η πρόληψη, αφού αν και οι μελέτες πάνω στους ιούς HPV είναι πολλές, αποτελεσματική θεραπεία υπάρχει μόνο για λίγες περιπτώσεις. Παράλληλα γίνεται μεγάλη προσπάθεια για μαζική παραγωγή εμβολίων με στόχο την πρόληψη ή φαρμάκων για κατάλληλη αντιμετώπιση στους υπάρχοντες ασθενείς.

Στη χώρα μας δεν υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα του ιού στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα στον υγιή πληθυσμό, ενώ αντίστοιχα υπάρχουν μελέτες για την παρουσία του ιού σε τραχηλικά επιχρίσματα γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί ο τρόπος μετάδοσης- αποικισμού του ιού στο στοματοφάρυγγα, δηλαδή δεν έχει βρεθεί αν ο αποικισμός του γεννητικού συστήματος συνυπάρχει με αποικισμό του αναπνευστικού του ίδιου ατόμου ή των οικείων του.

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας των διαφόρων υποτύπων HPVs στο στοματοφάρυγγα σε υγιή πληθυσμό της Θεσσαλίας και η σύγκριση διαφόρων διαγνωστικών tests ως προς την επιτυχία ανίχνευσης του ιού. Η ανίχνευση των ιών σε φαρυγγικά επιχρίσματα έγινε με τη μέθοδο της nested PCR. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια PCR με εκκινητές το set PGMY09/11-HMB01 και το ζεύγος MY09/11 και, έχοντας ως μήτρα τα προϊόντα τους, εφαρμόστηκε μία δεύτερη PCR με εκκινητές το ζεύγος GP5+/GP6+. Τα θετικά δείγματα που ανιχνεύτηκαν, αποστάλθηκαν για αλληλούχηση και με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής ταυτοποιήθηκαν οι υπότυποι των ιών. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης έρευνας με βιβλιογραφικά αποτελέσματα άλλων ομάδων και παρουσίαση των πιο βασικών διαγνωστικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των HPVs.

Abstract

Human Papillomaviruses (HPVs) belong to the Papillomaviridae family. HPVs are double-stranded circular DNA viruses with approximate size of 7900 bp lacking an external coat. These viruses infect skin and mucosal epithelial cells causing common warts or tumor-like formation, as well as cancer.

More than 200 HPV types have been found, which are divided into high and low risk types depending on their tumorigenic capacity. High risk types are detected in patients who have cancer, while low risk types cause common warts, which (most of the time) disappear easily going away on their own.

Initially, these viruses were detected in genital cancers, but nowadays they seem to be connected with oral system cancers too. The scientific society is concerned as HPV types are detected on oropharyngeal carcinomas and investigates the virus extensively.

Although the virus is required for cancer development, there are other risk factors that increase the possibility of infection, with smoking and alcohol being the most basic.

HPVs are sexually transmitted, a fact that explains the existence of viruses on both genital and oral systems. Prevention is very important as there is effective treatment for just a few cases. Moreover, doctors and scientists put efforts on vaccine production for effective prevention and drug designs for treatment.

There are no epidemiological data for Greece as far as the frequency of types on the oral system, although sufficient information exists about the epidemiology of the genital system. Furthermore, the way of transmission on the oral system has not been studied yet and is still unknown if the virus coexists in both the genital and the oral systems.

The purpose of this research was the evaluation of the HPV frequency in the oral system of the healthy population of the Thessaly region and the comparison of HPV diagnostic methods. The detection of HPVs on pharyngeal isolates was performed with nested PCR. The first step was a PCR with PGMY09/11-HMB01 and MY09/11 primers and the second a GP5+/GP6+ PCR. Positive samples were sequenced and the final identification was based on bioinformatics analysis.

Εισαγωγή

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των Human papillomaviruses (HPVs)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων ή αλλιώς Human papillomaviruses συγκροτούν τη μεγάλη οικογένεια Papillomaviridae και αποτελούν μία από τις πιο συχνές ομάδες ιών που προσβάλλουν τον άνθρωπο στις μέρες μας. Το όνομα τους, «papilloma», προέρχεται από τη λατινική λέξη “papilla” που μεταφράζεται ως θηλή ή φλύκταινα, και την ελληνική κατάληξη “oma”, δηλαδή όγκος (Zur Hausen, 1996).

Το ενδιαφέρον που εκδηλώνεται για τη μελέτη αυτών των ιών είναι πλέον έντονο, καθώς υπολογίζεται ότι προκαλούν το 5% των ετήσιων μορφών καρκίνου παγκοσμίως σε άνδρες και γυναίκες, ανεξάρτητα από την ηλικία (Winder et al, 2009). Ειδικότερα, όπως προκύπτει από τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο Διαβαλκανικό Συνέδριο Στοματολογίας, δεν σχετίζονται μόνο με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, όπως ήταν μέχρι σήμερα γνωστό, αλλά επίσης με το 80-90% των καρκίνων του στοματοφάρυγγα και με το 68% των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας. Η μόλυνση από τους HPVs είναι σήμερα το πιο συχνό σεξουαλικώς μεταδιδόμενο νόσημα.

Έχουν βρεθεί περισσότεροι από 200 διαφορετικοί τύποι HPVs. Δυστυχώς μόνο 120 από αυτούς έχουν πλήρως αλληλουχηθεί και ταυτοποιηθεί, 20 εκ των οποίων είναι σεξουαλικώς μεταδιδόμενοι (de Villiers et al, 2004; Bernard et al, 2010) και 40 εκ των οποίων μπορούν να μεταδοθούν με άμεση επιδερμική επαφή κατά τη διάρκεια κολπικού, πρωκτικού και στοματικού έρωτα (Hariri et al, 2011).

Οι HPVs προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και του βλεννογόνου (Howley PM, 2007). Διαχωρίζονται σε low-risk και high-risk τύπους, ανάλογα με την ογκογενετική τους ικανότητα και προκαλούν υπερπλαστικές και ογκόμορφες αλλοιώσεις του δέρματος και του τραχήλου, κονδυλώματα, αναπνευστική παπιλωμάτωση και καρκίνους του τραχήλου και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (Zaravinos et al, 2009).

Επειδή όπως φαίνεται ο ιός υπάρχει από τότε που υπάρχει ζωή, είναι διαρκής η μετανάστευση και η «αλλαγή» του. Χαρακτηριστική είναι η ιδιότητά τους να εμφανίζουν τροπισμό, δηλαδή να αναπτύσσονται και να προκαλούν βλάβες σε συγκεκριμένες περιοχές σε κάθε είδος, ενώ σε άλλες μπορεί να μην εκδηλωθούν ποτέ, κάτι το οποίο δημιουργεί έντονα ερωτήματα. Έτσι, έχει γίνει αποδεκτό πως οι ιοί HPVs είναι ειδικοί όχι μόνο για το είδος, αλλά για το μέρος του σώματος και για τα επιθηλιακά κύτταρα που προσβάλλουν (Doortbar et al, 2005).

Παρά τη διαφοροποίηση των βιολογικών ιδιοτήτων των διαφόρων τύπων HPVs, όλοι οι ιοί εμφανίζουν κοινή οργάνωση του γονιδιώματός τους. Οι HPVs είναι κυκλικοί ιοί δίκλωνου DNA, μεγέθους 7900 bp και μοριακού βάρους $5,2 \times 10^6$ Daltons, που περιβάλλεται από πρωτεϊνικό καψίδιο, χωρίς εξωτερικό περίβλημα (Howley, 1996).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως αν και η ύπαρξη των ιών κρίνεται απαραίτητη αιτιολογία ώστε να εμφανιστεί καρκίνος, δεν είναι από μόνη της επαρκής. Αιτιοπαθογενετικά εμπλέκονται αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες από τους οποίους το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν τους βασικότερους. Άλλοι ενοχοποιούμενοι πιθανοί παράγοντες είναι η έκθεση σε καρκινογόνα στο χώρο της εργασίας, η διατροφή, οι ιογενείς λοιμώξεις από τους ιούς EBV, η υπερϊώδης ακτινοβολία και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος (Κυργίδης κτλ, 2008).

Όπως φαίνεται, η μόλυνση από τους HPVs μπορεί να καθαριστεί από μόνη της, ανάλογα με τον τύπο του ιού και τη βλάβη που έχει προκληθεί. Μάλιστα η πιθανότητα εξομάλυνσης είναι υψηλή όταν η δυσπλασία είναι χαμηλής επικινδυνότητας, ενώ μειώνεται όταν είναι υψηλής επικινδυνότητας (Howley et al, 2007). Αποτελεσματική θεραπεία παρόλα αυτά υπάρχει μόνο για λίγες περιπτώσεις, ενώ παράλληλα γίνεται μεγάλη προσπάθεια για μαζική παραγωγή εμβολίων με στόχο την πρόληψη ή φαρμάκων για κατάλληλη αντιμετώπιση στους υπάρχοντες ασθενείς (Winder et al, 2009).

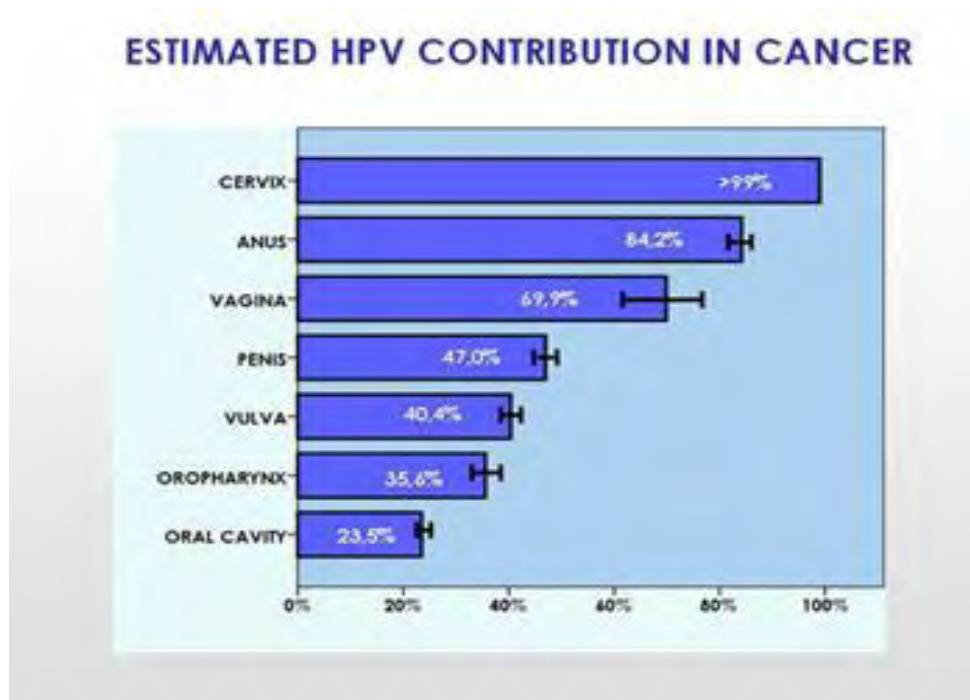
1.2. Κλινικά δεδομένα για τους HPVs

i. Επιδημιολογικά δεδομένα ανά τον κόσμο

Οι έρευνες για τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων ξεκίνησαν όταν αποδείχτηκε πως ευθύνονται για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το ενδιαφέρον και οι μελέτες κορυφώθηκαν, χρόνια αργότερα, με τις συνεχείς ανακαλύψεις, από διάφορα Επιστημονικά κέντρα ανά τον κόσμο, που ανέδειξαν συσχέτιση ανάμεσα στους HPVs και στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα- αναπνευστικού. Το σημαντικό αυτό συμπέρασμα προκύπτει από έρευνα που έγινε σε 9 χώρες από επιστήμονες της Διεθνούς Επιτροπής για την έρευνα για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer).

Στατιστικά δεδομένα σε παγκόσμιο επίπεδο δείχνουν πώς ο καρκίνος κεφαλής και στόματος καταλαμβάνει πλέον την 6^η θέση στη λίστα των πιο κοινών και επικίνδυνων μορφών καρκίνου (Winder et al, 2009), ενώ ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας παραμένει στη 2^η θέση των πιο συχνών μορφών καρκίνου που προσβάλλουν τις γυναίκες (Zaravinos et al, 2009).

Υπολογίζεται πως το 9% όλων των μορφών καρκίνου σε παγκόσμια επίπεδα οφείλεται σε κάποιον high-risk τύπο HPV (Parkin, 2006). Στην εικόνα 1.2 i.i. παρουσιάζονται τα είδη και τα ποσοστά των καρκίνων που οφείλονται σε κάποιο τύπο HPV σε παγκόσμιο επίπεδο.



Εικόνα 1.2 i.i. Αριθμός περιστατικών καρκίνου λόγω HPV ανά έτος παγκοσμίως.

Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πως για το 70% όλων των περιπτώσεων καρκίνου από HPVs και για το 50% των περιπτώσεων καρκίνου του αιδοίου, του κόλπου και του πέους, ευθύνονται οι τύποι 16 και 18, ενώ το 85% των περιπτώσεων καρκίνου του αναπνευστικού, οφείλεται στον τύπο 16 (Schiffman et al, 2007; Munoz et al, 2004; Watson et al, 2008).

-Καρκίνος του αναπνευστικού συστήματος σε παγκόσμιο επίπεδο

Στις ΗΠΑ οι μολύνσεις από HPV αποτελούν το πιο συχνό φαινόμενο. Περισσότεροι από τους μισούς ενεργούς σεξουαλικά ανθρώπους μολύνονται στη ζωή τους από έναν ή περισσότερους τύπους HPV (Hariri et al, 2003; Gillison et al, 2012). Διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο περίπου 26000 περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από καρκίνο που οφείλεται σε κάποιο τύπο HPV, σύμφωνα με τα τελικά αποτελέσματα (SEER) του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο. Από αυτές 7400 περιπτώσεις αναγράφονται ως καρκίνος του στοματοφάρυγγα, ενώ η ετήσια θνησιμότητα από καρκίνο της στοματικής κοιλότητας ανέρχεται στις 6000 ετησίως. Τέλος, από μελέτες στις ΗΠΑ, υπολογίζεται πως μέχρι το 2020 τα περιστατικά καρκίνου του αναπνευστικού στους άντρες θα ξεπερνούν σε αριθμό τον καρκίνο του τραχήλου στις γυναίκες (Chatuverdi et al, 2011).

Στη Βόρεια Αμερική και στην Καραϊβική ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα καταλαμβάνει την 5η θέση στους άντρες και την 6η θέση στις γυναίκες, με την Αργεντινή, τη Βραζιλία, την Ουρουγουάη και το Πουέρτο Ρίκο να παρουσιάζονται πρώτες στη λίστα.

Στην Αφρική τα καταγεγραμμένα περιστατικά είναι λίγα, λόγω έλλειψης νοσοκομειακής υποδομής, οπότε τέτοια είδη καρκίνου και μολύνσεις από HPV, δεν παρατηρούνται σε μεγάλα ποσοστά. Παρόλα αυτά στο Σουδάν ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα, έχει υψηλή θέση στην λίστα, αν και δεν είναι διευκρινισμένο πως οφείλεται σε τύπους HPV.

Σημαντική ήταν επίσης η μελέτη που δημοσιεύθηκε στο επιστημονικό περιοδικό New England Journal of Medicine, σύμφωνα με την οποία άντρες και γυναίκες με περισσότερους από 6 σεξουαλικούς συντρόφους με τους οποίους έχουν κάνει στοματικό σεξ είναι 9 φορές πιο πιθανό να μολυνθούν από κάποιο τύπο HPV και υπολογίζεται, ότι η πιθανότητα ενός (σεξουαλικά ενεργού) ατόμου να μολυνθεί από κάποιον τύπο HPV μέχρι την ηλικία των 50 ετών είναι περίπου 80%.

Πρέπει να αναφερθεί πως τα ποσοστά μόλυνσης από HPVs διαφοροποιούνται ανάλογα με την ανάπτυξη των χωρών. Οι περιοχές που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά καρκίνου στοματοφάρυγγα- αναπνευστικού είναι οι λιγότερο αναπτυγμένες (η Ινδία, το Πακιστάν, η Βραζιλία κ.α.) όπως φαίνεται στην εικόνα 1.2.i. ii. (Warnakulasuriya, 2009).

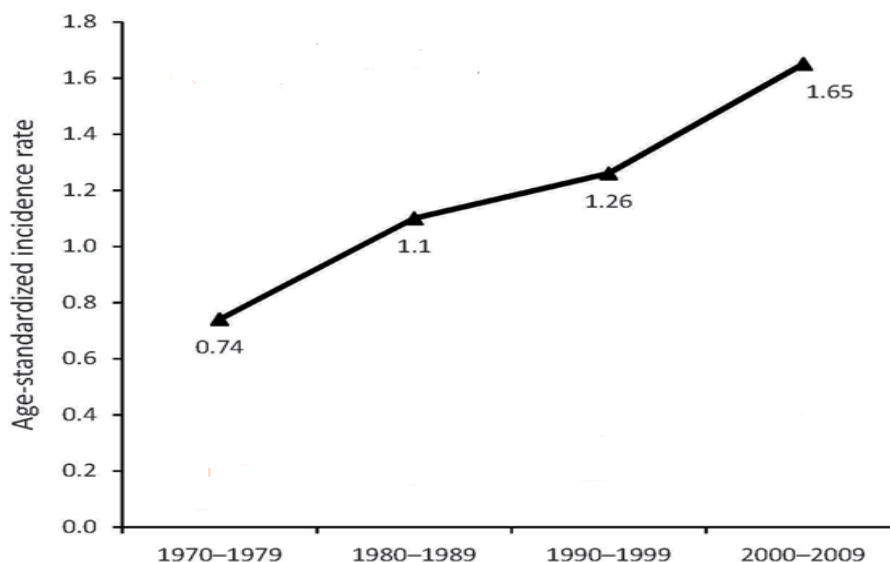


Εικόνα 1.2 i.ii. Παγκόσμιος χάρτης εμφάνισης θνησιμότητας από καρκίνο του στοματοφάρυγγα (κόκκινος χρωματισμός). (Warnakulasuriya, 2009)

Από την παραπάνω εικόνα γίνεται σαφές ότι τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας από καρκίνο σχετίζονται άμεσα με το βιοτικό επίπεδο. Η αιτία γι' αυτό εντοπίζεται στις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες που επικρατούν ανά χώρα, με υψηλότερη επίπτωση σε περιοχές όπως η Αφρική, η Νότια Αμερική και η Νοτιοανατολική Ασία (Warnakulasuriya, 2009) .

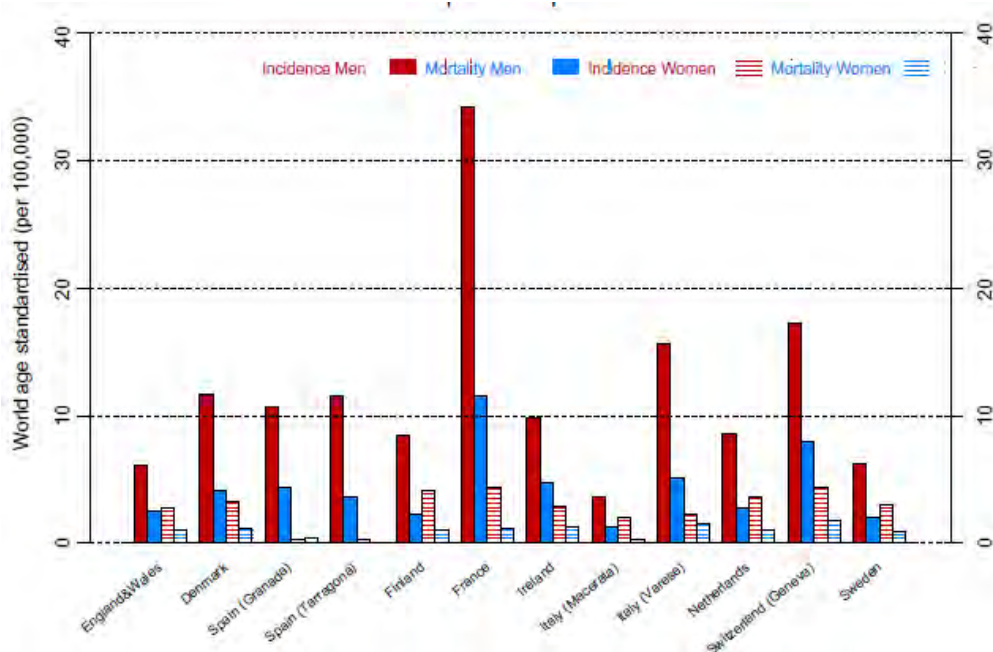
-Καρκίνος του αναπνευστικού στην Ευρώπη

Σε μία έρευνα 2600 ατόμων που πραγματοποιήθηκε για 37 χρόνια (1970-2007) στο Ινστιτούτο Καρολίνοκα της Στοκχόλμης, παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση του ιού στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα είχε σημαντικά αυξητική πορεία. Συγκεκριμένα στο διάστημα 1970-1979 βρέθηκε με HPV το 23% των ελεγχόμενων, στο 1980-1989 το 29%, στο 1990-1999 το 57% και στο διάστημα 2000-2009 το 79% (Εικόνα 1.2 i.iii).



Εικόνα 1.2 i.iii. Γραφική αναπαράσταση της αυξητικής πορείας του καρκίνου του στοματοφάρυγγα από το 1970 μέχρι το 2009. (Warnakulasuriya, 2009)

Συγκεντρωτικά στην Ευρώπη, ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα καταλαμβάνει την 7^η θέση. Οι χώρες που παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά είναι η Γαλλία, ενώ τα χαμηλότερα η Ελλάδα και η Κύπρος. Γενικά, τα ποσοστά μόλυνσης είναι υψηλότερα στην δυτική Ευρώπη από ότι στη Βόρεια και στην Ανατολική Ευρώπη (εικόνα 1.2 i.iv) (Warnakulasuriya, 2009).



Εικόνα 1.2 i.iv. Διαγραμματική απεικόνιση περιστατικών και θνησιμότητας καρκίνου του στοματοφάρυγγα ανά 100000 άτομα σε Ευρωπαϊκές χώρες. (Warnakulasuriya, 2009)

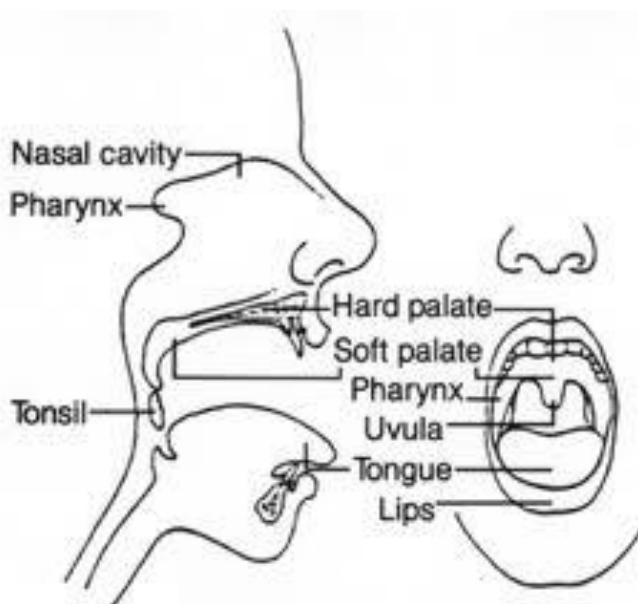
ii. Τρόποι Μετάδοσης των HPVs

Οι ιοί HPVs μεταδίδονται με αρκετούς τρόπους με κυριότερο την χωρίς προφύλαξη σεξουαλική επαφή (γεννητικών βλεννογόνων, χέρια- γεννητικά, στοματο- γεννητικά). Απαιτείται άμεση επαφή με δέρμα ή βλεννογόνο για να μεταφερθεί ο ιός. Πρέπει να υπάρξει τριβή και μικροτραυματισμοί για να εισέλθει στο επιθήλιο. Γι' αυτό η σεξουαλική επαφή αποτελεί τον ευκολότερο τρόπο μετάδοσης.

Επιπλέον, πιθανότητα μετάδοσης του ιού υπάρχει και στο νεογνό κατά τη διαδικασία του φυσιολογικού τοκετού, προκαλώντας κάποιες φορές δυσπλασίες στο αναπνευστικό του επιθήλιο (περιγεννητική μετάδοση). Χωρίς σεξουαλική επαφή μπορεί επίσης να μεταδοθούν μέσω επαφής με αντικείμενα (χειρουργικά γάντια, λαβίδες βιοψίας) ή με ουρογεννητικά εκκρίματα (αρκετά σπάνια). Τέλος, έχει παρατηρηθεί μετάδοση μεταξύ μελών μιας οικογένειας, ενδεχομένως με τη χρήση κοινών ειδών υγιεινής, αν και προς αυτήν την κατεύθυνση δεν υπάρχουν ακόμα συγκεκριμένες μελέτες. Συνήθως, η παρατήρηση αλλοιώσεων από HPVs σε παιδιά (πέραν της περιγεννητικής μετάδοσης), αποδίδεται σε πιθανή σεξουαλική κακοποίηση.

iii. Ευπαθή μέρη του σώματος στους HPVs

Οι HPVs μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και του βλεννογόνου. Εκτός από το αιδούο, το πέος, τον πρωκτό και τον τράχηλο, ευαίσθητες είναι όλες οι επιθηλιακές περιοχές που καλύπτονται από δέρμα, με βασικότερα τα χέρια και τους αγκώνες, τα πόδια και τα πέλματα, καθώς και την κοιλιά. Τέλος, ευπαθή στόχο αποτελεί το αναπνευστικό, το στόμα, τα ούλα, η γλώσσα, ο φάρυγγας, ο λάρυγγας και οι αμυγδαλές (Εικόνα 1.2 iii.i.).



Εικόνα 1.2 iii.i. Μέρη του αναπνευστικού που μπορούν να μολυνθούν από HPVs.

iv. Νοσολογικές οντότητες- Ιστολογικές αλλοιώσεις

-Προκαρκινικές δυσπλασίες- καλοήθεις όγκοι

Οι βλάβες που ανήκουν στις προκαρκινικές δυσπλασίες μπορεί να είναι πολλών ειδών και δημιουργούνται αντίστοιχα από low-risk ή high-risk τύπους, παρότι πλειοψηφικά οφείλονται στην πρώτη κατηγορία. Χαρακτηριστικές είναι οι κοινές αλλοιώσεις δέρματος (warts), που εμφανίζονται συχνότερα σε νεαρούς ενήλικες και παιδιά και οι τραχηλικές δυσπλασίες ελαφρού, μέτριου και σοβαρού βαθμού (CIN1,CIN2,CIN3 αντίστοιχα) σε γυναίκες (de Villiers, 1997). Άλλες προκαρκινικές δυσπλασίες, και μάλιστα οι πιο συχνά εμφανιζόμενες σε νεαρούς ενήλικες, ιδιαίτερα σε αυτούς που έχουν πολλούς ερωτικούς συντρόφους, είναι τα κονδυλώματα (condylomas). Τα κονδυλώματα διακρίνονται σε οξυτενή, ορατά δηλαδή με γυμνό μάτι που υπάρχουν στα έξω γεννητικά όργανα και είναι σαν ελιές, ή σε επίπεδα, που δεν είναι ορατά. Σύμφωνα με κλινικές μελέτες, τα κονδυλώματα μοιάζουν με τις δερματικές αλλοιώσεις, αλλά δεν είναι ίδια. Χαρακτηρίζονται ως wart-like growths και συνήθως δεν προκαλούν πόνο, αλλά έντονο αίσθημα καύσης και φαγούρας.

Τέλος, θηλώματα που επιπλέον οφείλονται στους HPVs αναπτύσσονται στη μύτη, στους παραρρινικούς κόλπους, στις αμυγδαλές, στη στοματική κοιλότητα, στο φάρυγγα, στο λάρυγγα, και σπανιότερα στον οισοφάγο (de Villiers, 1997; Gillison et al, 2003).



Εικόνα 1.2 iv.i. Προκαρκινικές δυσπλασίες από HPVs.

-Χαρακτηριστικά των μολυσμένων κυττάρων από HPVs

Τα κύτταρα που προσβάλλονται από HPVs εμφανίζουν:

- Ανωμαλίες στη διαφοροποίηση
- «Αθάνατο» φαινότυπο
- Χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες και αυξανόμενες πιθανότητες περαιτέρω μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε εξαλλαγή και διήθηση.

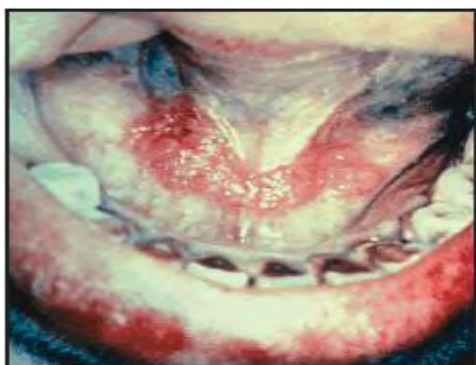
Όλες οι αλλοιώσεις που αναφέρθηκαν δεν γίνονται ξαφνικά διηθητικός καρκίνος, αλλά μεταπίπτουν σε προδιηθητική μορφή, που ονομάζεται μικροδιηθητική ή μικροδιήθηση ή μικροδιηθητικός καρκίνος. Και σε αυτήν ακόμα τη φάση μπορεί να αντιμετωπιστούν χωρίς πρόβλημα. Αν όμως οι συγκεκριμένες βλάβες μείνουν αδιάγνωστες ή χωρίς αντιμετώπιση, τότε, έπειτα από ένα χρονικό διάστημα που μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια, είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε διηθητικό επιθετικό καρκίνο, όπως καρκίνος των λεπιδωδών κυττάρων (SCCs), καρκίνος του τραχήλου κτλ. Αυτό βέβαια εξαρτάται από τον τύπο του ιού στον οποίο οφείλονται, την κατάσταση άμυνας του οργανισμού και τη δράση άλλων παραγόντων όπως είναι το κάπνισμα, το ποτό κ.α.

-Καρκίνος- κακοήθεις όγκοι

Σημαντικός όγκος πληροφοριών για την ογκογενετική δράση των HPVs έχει προκύψει από τη μελέτη της σχέσης τους με το καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας που αποτέλεσε την περισσότερο μελετημένη βλεννογόνια θέση στο σώμα (zur Hausen, 1996). Οι HPVs εμπλέκονται επίσης σε χαμηλότερο, αλλά σημαντικό, ποσοστό στα καρκινώματα άλλων τμημάτων της πρωκτογεννητικής περιοχής (πρωκτού, αιδοίου, κόλπου, προστάτη) (Gilson et al, 2003).

Μία ακόμα σειρά σημαντικών ασθενειών- βλαβών που φαίνεται να προκαλούν οι HPVs αφορά στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αναπνευστική παπιλωμάτωση (respiratory papillomatosis), οι καρκίνοι του φάρυγγα, του λάρυγγα, των αμυγδαλών και της στοματικής κοιλότητας, περιλαμβάνοντας το πάνω και το κάτω μέρος της, τη γλώσσα, τα ούλα και τα χείλη (Εικόνα 1.2 iv.ii.)

Γονιδίωμα των HPVs απομονώθηκε για πρώτη φορά από ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος το 1985 (de Villers et al, 1985). Έκτοτε μία σειρά από έρευνες που έγιναν με τη βοήθεια αξιόπιστων μοριακών τεχνικών επιβεβαίωσαν την παρουσία των HPVs σε κακοήθεις όγκους της στοματικής κοιλότητας (Chang et al, 1991; de Villers, 1997). Οι γονότυποι των HPV- 2, 4, 6, 11, 16 και 18 που ανιχνεύονται συχνότερα στο βλεννογόνο του γεννητικού συστήματος διαπιστώθηκαν επίσης σε καλοήθεις όγκους και δυσπλασικές βλάβες, καθώς και σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας (de Villers, 1997; Miller et al, 2001). Ειδικότερα, ο υψηλού κινδύνου HPV 16 αναφέρεται ως ο συχνότερα ευρισκόμενος τύπος στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (Miller et al, 2001). Διάφοροι τύποι HPVs ανιχνεύονται επίσης στις μυρμηγκιές της στοματικής κοιλότητας ή ακροχορδόνες (HPV- 2, 4, 6, 11, 57), στην εστιακή επιθηλιακή υπερπλασία ή νόσο του Heck (HPV- 13, 32) και στο ακροχορδονώδες ή θηλώδες καρκίνωμα (HPV-6/11, 16/18, 2) (Syrjanen 2000, 2003).



Εικόνα 1.2 iv.ii. Καρκίνος του στοματοφάρυγγα- αναπνευστικού από HPVs.

v. Αντίδραση ανοσοποιητικού συστήματος στον ιό HPV

Οι περισσότερες των λοιμώξεων που προκαλούνται από HPVs είναι παροδικές και κλινικά μη ανιχνεύσιμες, πράγμα το οποίο αποδεικνύει ότι το ανοσολογικό σύστημα έχει την ικανότητα ελέγχου και αντιμετώπισης της λοίμωξης. Παρά το γεγονός όμως ότι η λοίμωξη προκαλεί ανοσολογική αντίδραση, ο ιός HPV είναι ένας δύσκολος στόχος. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανοσολογική διαφυγή του ιού είναι:

- Ο HPV δεν προκαλεί λύση των κυττάρων, αντίθετα με τον ιό του έρπη. Προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όχι κάποια φλεγμονώδη αντίδραση.
- Το γεγονός πως ο HPV επηρεάζει μόνο τα επιθηλιακά κύτταρα διευκολύνει τη διαφυγή του από το ανοσοποιητικό σύστημα. Μόνο σε τελικών διαφοροποιημένα πλακώδη κύτταρα ανιχνεύονται ολόκληρα σωματίδια του ιού. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται αρκετά μακριά από τα λεμφοκυτταρικά βλαστικά κέντρα που σχετίζονται με την πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης.
- Ο HPV διαφεύγει της αναγνώρισης από το ενδογενές αμυντικό σύστημα μπλοκάροντας την παραγωγή της ιντερφερόνης για τη διασφάλιση της αναπαραγωγής του. Αυτό επιτυγχάνεται με την παραγωγή των πρωτεϊνών E6 και E7.

vi. Κλινική Διάγνωση των HPVs

Η κλινική διάγνωση των HPVs μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους ανάλογα με το σημείο του σώματος στο οποίο υπάρχει βλάβη, με τις υπόνοιες του γιατρού για μόλυνση του ασθενούς και τον τύπο του ιού.

Η πιο εύκολη περίπτωση διάγνωσης των ιών HPV, είναι εκείνη στην οποία υπάρχουν ορατές αλλοιώσεις κ σημάδια. Όπως φαίνεται και η πιο συχνή μέχρι σήμερα. Η διάγνωση σε αυτή την περίπτωση είναι αρκετά εύκολη, καθώς ο αρμόδιος ιατρός με μία απλή εξέταση, αντιλαμβάνεται το πρόβλημα.

Για τις γυναίκες που υπάρχει υπόνοια για καρκίνο του τραχήλου ή υπάρχουν ορατά σημάδια από κονδυλώματα, η διάγνωση επιτυγχάνεται με το τεστ Παπ, με κολποσκόπηση και κολποσκοπικά κατευθυνόμενες βιοψίες. Δυστυχώς, δεν είναι απόλυτη η αξιοπιστία του τεστ Παπ, καθώς δεν ξεπερνά το 80-85%. Σε αρκετά κέντρα του εξωτερικού έχει αναφερθεί ποσοστό 25-30% ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Ο συνδυασμός τεστ Παπ και κολποσκόπησης αυξάνει το ποσοστό αξιοπιστίας για παρακολούθηση του ιού και των εν λόγω βλαβών σε 100%. Επιπλέον, μπορούμε να βρεθεί ο τύπος του ιού που έχει προσβάλει το κάθε άτομο με μία ειδική εξέταση που λέγεται ταυτοποίηση, αφού προηγουμένως πάρουμε με βιοψία ένα τμήμα του τραχήλου της μήτρας (Michalás et al, 2000).

Σε περιπτώσεις ομοφυλόφιλων ανδρών που εμφανίζουν κονδυλώματα ή υπάρχει υπόνοια για καρκίνο του πρωκτού, συνήθως είναι η διαδικασία της επισκόπησης, της βιοψίας και της κωλονοσκόπησης, αντίστοιχα με την γυναικεία κολποσκόπηση (Michalás et al, 2000).

Η κατάσταση γίνεται δυσκολότερη, όταν υπάρχει προσβολή του ασθενούς από τον ιό στο ανώτερο αναπνευστικό. Σε αυτή την περίπτωση η κλινική διάγνωση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την εργαστηριακή διάγνωση που βασίζεται εξ ολοκλήρου σε νέες πιο αξιόπιστες τεχνικές. Η πλέον αξιόπιστη τεχνική εξακρίβωσης μόλυνσης από HPVs είναι η Real-time PCR. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται παγκοσμίως σε κλινικό επίπεδο καθώς είναι πολύ ευαίσθητη, ανιχνεύει ακόμα και πολύ μικρό αριθμό ιικού φορτίου, κάτι που δε μπορεί να επιτευχθεί με τις παραδοσιακές μεθόδους PCR, πολύ ειδική και ιδιαίτερα παραγωγική (Zaravinos et al, 2009).

vii. Πρόληψη

Στις μέρες μας γίνεται μεγάλη προσπάθεια για μαζική παραγωγή εμβολίων, για πρόληψη και βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων φαρμακευτικών θεραπειών. Ωστόσο, τα εμβόλια που έχουν παραχθεί μέχρι τώρα παρέχουν προστασία μόνο για τους τύπους 16, 18, 6, 11 και δεν είναι αποτελεσματικά για τους καρκίνους του αναπνευστικού. Γι' αυτό το λόγο οι επιστήμονες και οι γιατροί, τονίζουν πως, η πρόληψη είναι κυρίως προσωπική υπόθεση. Μπορεί να επιτευχθεί αν κανείς επιλέγει όσο το δυνατόν πιο προσεκτικά τον ερωτικό του σύντροφο (αποφυγή συντρόφων με βεβαρημένο ιατρικό ιστορικό), δεν συνουσιάζεται με πολλούς συντρόφους, χρησιμοποιεί προφυλακτικό, είτε ανδρικού είτε γυναικείου τύπου (αν και αυτό δεν είναι πάντα σίγουρο πως είναι αποτελεσματικό) ακόμα και όταν κάνει στοματικό σεξ. Σε ότι αφορά στις βλάβες των ιστών, δηλαδή τις δυσπλασίες, δεν υπάρχει ακριβής πρόληψη, όμως είναι σημαντική η έγκαιρη διάγνωση. Αιτιοπαθογενετικά, σημαντικοί παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου του αναπνευστικού, είναι το κάπνισμα, το ποτό, η μη υγιεινή του στόματος, οι χρόνιες φλεγμονές και το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα (έλλειψη βιταμινών- άρση χημειοπροστασίας) (Schiffman et al, 2007).

viii. Θεραπεία

Παρότι δεν υπάρχει ολοκληρωμένη θεραπεία, η μόλυνση μπορεί συνήθως να καθαριστεί από μόνη της. Προς το παρόν η θεραπεία των ιών επικεντρώνεται στη θεραπεία των συμπτωμάτων της μόλυνσης. Τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν αλλοιώσεις των γεννητικών οργάνων που σχετίζονται με low-risk HPV τύπους (τύπους που γενικά δεν οδηγούν σε καρκίνο, αλλά σε κονδυλώματα) και κάποιες προκαρκινικές δυσπλασίες που σχετίζονται με συγκεκριμένους high-risk τύπους.

Παλαιότερα, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα φάρμακα και κρέμες για την αντιμετώπιση του ιού, που αποδείχθηκαν αναποτελεσματικά. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα lasers (εξάχνωση) για τα κονδυλώματα, θεραπεία όμως που δεν κρίθηκε σωστή. Σήμερα με μόνη εμφάνιση αυτή του ιού δεν χορηγείται τίποτα. Θεραπεία εφαρμόζεται μόνο για τις περιπτώσεις δυσπλασιών και βέβαια, λαμβάνεται σοβαρά υπόψη η ηλικία του ασθενούς, η επιθυμία για αναπαραγωγή (τεκνοποίηση) κ.ά. Σε ορισμένα κέντρα εφαρμόζεται και η κρυοπηξία, σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Αυτή η μέθοδος, ωστόσο, όπως η laser εξάχνωση ή η ηλεκτροκαυτηρίαση, ανήκουν στις καταστροφικές μεθόδους, οι οποίες τείνουν να καταργηθούν.

Σήμερα προτιμώνται οι λεγόμενες αφαιρετικές μέθοδοι, όπως η κωνοειδής εκτομή, ενώ για τους διάφορους τύπους καρκίνου του αναπνευστικού χορηγείται φαρμακευτική αγωγή, πραγματοποιείται ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία (Kirgidis et al, 2008).

1.3. Κύκλος Ζωής των HPVs

Οι ιοί HPVs, όπως όλοι οι ιοί, αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και όχι ανεξάρτητους οργανισμούς. Γι' αυτό το λόγο χρειάζονται οπωσδήποτε ένα κύτταρο ξενιστή από το οποίο «δανείζονται» μεταβολικές διαδικασίες, ώστε να αναπαραχθούν.

Μόλις εισβάλλουν στο κύτταρο ξενιστή μπορεί να μπουν σε 2 φάσεις, είτε στη λυσιγονική είτε στη λυτική. Κατά τη διάρκεια της πρώτης, το γονιδίωμά τους παραμένει ανενεργό και το κύτταρο ξενιστής ανεπηρέαστο. Κατά τη δεύτερη φάση όμως το γονιδίωμα του ιού ενεργοποιείται και χρησιμοποιεί το κύτταρο ξενιστή μέχρι να ολοκληρωθεί η παραγωγή του ιικού σωματίου, οπότε ο ιός απελευθερώνεται και το κύτταρο ξενιστής καταστρέφεται. Σε αυτή την περίπτωση η έκφραση των ιικών γονιδιακών προϊόντων ελέγχεται πολύ αυστηρά, ώστε η παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών να συγχρονίζεται με τη μετανάστευση των μολυσμένων κυττάρων προς τις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες (Doorbar, 2007).

Συνοπτικά, στην κλινική πράξη, η βιολογική συμπεριφορά των HPVs έχει ως εξής : ο ιός στη φάση του ενοφθαλμισμού προσβάλλει τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου, διασπά την μεμβράνη και εισέρχεται στον πυρήνα. Στη φάση της επώασης ή λανθάνουσας φλεγμονής που διαρκεί από 6 εβδομάδες έως 8 μήνες, ο ιός αναδιπλασιάζεται και εισέρχεται σε άλλα κύτταρα χωρίς να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Η μετάβαση στη φάση ενεργής έκφρασης του ιού εξαρτάται από την ανοχή του κυττάρου ξενιστή, τον τύπο του ιού και την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Στα ευπαθή άτομα ο ιός αναδιπλασιάζεται πολύ γρήγορα και εκφράζεται και πολύ γρήγορα. Στην επόμενη φάση, 9 μήνες μετά, άλλοι ασθενείς παρουσιάζουν ύφεση και άλλοι υποτροπιάζουν στην προηγούμενη φάση. Πάντως ενώ το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού έχει έρθει σε επαφή με κάποιον τύπο HPV, λίγοι εμφανίζουν καρκίνο (Creatsas et al, 1998).

-Εγκαθίδρυση της HPV λοίμωξης

Ο κύκλος ζωής των HPV είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη διαφοροποίηση του επιθηλίου. Φυσιολογικά το πλακώδες επιθήλιο του ανθρώπου αναπτύσσεται σε πολλαπλές στιβάδες. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι τα μόνα κύτταρα που έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αποτελούνται από τα βλαστοκύτταρα και τα στρατευμένα προς την κυτταρική σειρά διαφοροποίησης κύτταρα, τα οποία διαιρούμενα συνεχώς αποτελούν τη δεξαμενή των κυττάρων των ανώτερων στιβάδων (Hummel et al, 1992). Στο φυσιολογικό επιθήλιο τα κύτταρα της βασικής μεμβράνης διαιρούνται συνεχώς υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων. Η συνεχής διαίρεση των κυττάρων αυτών επιτρέπει την ανανέωση της επιδερμίδας καθώς τα κύτταρα της επιφάνειας αποπίπτουν. Αμέσως μετά τη διαίρεση των βασικών κυττάρων, το ένα θυγατρικό κύτταρο μεταναστεύει προς τα πάνω και αρχίζει να διαφοροποιείται, ενώ το άλλο παραμένει στη βασική μεμβράνη. Η απομάκρυνση του επιθηλιακού κυττάρου από τη βασική μεμβράνη σηματοδοτεί και την έξοδο του από τον κυτταρικό κύκλο. Τότε αρχίζει η διαφοροποίηση του κυττάρου και η σύνθεση της υψηλού μοριακού βάρους κερατίνης (Watt, 1998). Καθώς το κύτταρο συνεχίζει να διαφοροποιείται, αθροίζεται η κερατίνη, διαρρηγνύεται ο πυρηνικός σάκος και στις ανώτερες στιβάδες του διαφοροποιημένου επιθηλίου υπάρχει μόνο ως κερατινοκύτταρο.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της HPV λοίμωξης είναι η πρόσβαση των μολυσματικών σωματιδίων στα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Λύσεις της συνεχείας του επιθηλίου διευκολύνουν την πρόσβαση των ιών στη βασική μεμβράνη. Μελέτες έδειξαν ότι οι HPVs συνδέονται με πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας καθώς και με δευτερογενείς υποδοχείς, οι οποίοι διευκολύνουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα (Joyce et al, 1999; McMillan et al, 1999; Shafti-Keramat et al, 2003; Patterson et al, 2005). Σε πρόσφατες έρευνες διαπιστώθηκε ότι για να διατηρηθεί μία βλάβη, ο ιός πρέπει να μολύνει ένα επιθηλιακό βλαστοκύτταρο (Egawa, 2003).

Αμέσως λοιπόν μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ακολουθεί η μεταφορά του ιού στον πυρήνα του κυττάρου, οπότε και το ιικό γονιδίωμα εγκαθίσταται ως επίσωμα, ως μία εξωχρωμοσωμική μορφή και διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα ή ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των 2 μορφών. Έχει υπολογιστεί ότι στη βασική μεμβράνη υπάρχουν 10-200 αντίγραφα ιικού γονιδιώματος ανά κύτταρο. Καθώς εξελίσσεται η διαίρεση των κυττάρων της βασικής στιβάδας, οι επισωματικοί HPV αναπαράγονται και διανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα. Ένα θυγατρικό κύτταρο μεταναστεύει προς τις ανώτερες στιβάδες και αρχίζει να διαφοροποιείται, ενώ το άλλο παραμένει ενεργό στον κυτταρικό κύκλο (Hebner et al, 2006).

Αν και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός έκφρασης των ιικών γονιδίων στα βασικά κύτταρα, επικρατεί η άποψη ότι η έκφραση των πρωτεϊνών E1 και E2 διατηρεί το ιικό DNA στην επισωματική μορφή (Wilson et al, 2002) και διευκολύνει τον ακριβή διαχωρισμό του

γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (You et al, 2004). Την αρχική λοίμωξη ακολουθεί μία φάση διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού, οπότε και αυξάνεται ο αριθμός των βασικών κυττάρων με ιικό DNA σε επισωματική μορφή (Doorbar et al, 2005). Το αν οι ικές πρωτεΐνες μετασχηματισμού, E6 και E7, εκφράζονται στα κύτταρα της βασικής στιβάδας ή όχι δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως (Crum et al, 1988).

Κατά τη φυσική λοίμωξη, η δραστηριότητα των E6 και E7 πρωτεϊνών είναι αυτή που αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που παράγουν ισοσώματα (Doorbar, 2007). Καθώς η σύνθεση του ιικού DNA εξαρτάται από τους μηχανισμούς της κυτταρικής αντιγραφής του ξενιστή, η παραμονή των HPV μολυσμένων κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο εξασφαλίζεται με τη δράση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 (Flores et al, 2000; Garner-Hamrick et al, 2004). Τα κύτταρα επανεισέρχονται στη φάση S στις υψηλά διαφοροποιημένες στιβάδες και ενεργοποιούν την έκφραση παραγόντων που απαιτούνται για την ιική αντιγραφή. Όταν τα HPV μολυσμένα κερατινοκύτταρα εγκαταλείπουν τη βασική στιβάδα, η αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου χάνεται και ταυτόχρονα διαταράσσεται η διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης (Sherman et al, 1997). Η παρουσία της E7 συνεπάγεται την χαρακτηριστική διατήρηση του πυρήνα σε όλες τις στιβάδες του μολυσματικού επιθηλίου.

-Είσοδος των HPVs στο κύτταρο

Καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση των HPVs στο κύτταρο ξενιστή παίζουν οι υποδοχείς. Υποψήφιος υποδοχέας δέσμευσης είναι η α6 ιντεγρίνη, ενώ τα καψίδια προσδένονται επίσης στην ηπαρίνη και σε γλυκοσαμινογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας των κερατινοκυττάρων, που μπορούν να ξεκινήσουν την είσοδο μέσω του υποδοχέα. Οι περισσότεροι HPVs εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση του υποδοχέα η οποία εξαρτάται από κυστιδία κλαθρίνης. Η αποσυναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και η έκθεση του ιικού γένωματος γίνεται μέσα στο ενδόσωμα. Η L2 και το γένωμα διαφεύγουν στο κυτταρόπλασμα και και εισέρχονται στη μεταγραφικά ενεργή περιοχή 10 του πυρήνα. Η C- τελική περιοχή της L2 διευκολύνει την έξοδο από τα ενδοσώματα μετά την έκδυση του ιού. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με το tSNARE syntaxin 18, ένα στοιχείο της πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου, μία αλληλεπίδραση εξίσου σημαντική για τη μεταφορά του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα.

-Αντιγραφή των HPVs

Οι ιοί HPVs θεωρείται πως υπακούν σε 2 μοντέλα αντιγραφής: τη βασική και την αγενή. Κατά την πρώτη μορφή το ιικό γονιδίωμα υπάρχει ως κυκλικό επίσωμα στα κύτταρα του βασικού και παραβασικού επιθηλίου και συνήθως οι low-risk τύποι συμπεριφέρονται έτσι. Η αγενής αντιγραφή από την άλλη συμβαίνει σε υψηλά διαφοροποιημένα κύτταρα της επιθηλιακής επιφάνειας. Με τις σύγχρονες μεθόδους της μοριακής βιολογίας διαπιστώθηκε ότι το HPV DNA μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου του ξενιστή. Κατά την ενσωμάτωση του ιού, το κυκλικό DNA ανοίγει στην περιοχή μεταξύ των E1 και E2 και διαγράφεται τμήμα του E2 και του E4 (Howley, 1996). Η διάσπαση του γονιδιώματος του ιού στο E2 ORF καταργεί τις ρυθμιστικές λειτουργίες και συνεπάγεται την αυξημένη έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών (Bouvard et al, 1994). Επικρατεί η άποψη ότι η ενσωμάτωση των HPVs δεν παρουσιάζει ειδικότητα αλλά συμβαίνει σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα. Από την άλλη, σύγχρονες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε όγκους που περιείχαν ιό έδειξαν ότι το HPV DNA βρισκόταν συχνότερα ενσωματωμένο σε περιοχές που χαρακτηριζόταν από αυξημένη γενετική αστάθεια, τα λεγόμενα κοινά εύθραυστα σημεία (Doorbar, 2007).

Η αντιγραφή μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια. Αρχικά, η αντιγραφή ξεκινά όταν υπάρχει πολλαπλασιασμός σε περίπου 50-100 αντίγραφα. Το ιικό DNA διατηρείται ως σταθερό πλασμίδιο σε πολλά αντίγραφα. Η μόλυνση οδηγεί την εγκαθίδρυση του ιικού γονιδιώματος ως σταθερό επίσωμα στα κύτταρα της βασικής στιβάδας, γεγονός που απαιτεί την έκφραση των πρωτεϊνών E1 και E2. Στο δεύτερο στάδιο, το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με του ξενιστή στη φάση S. Το ιικό DNA αντιγράφεται συγχρονισμένο με το χρωμοσωμικό, κατά μέσο όρο μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο και κατανέμεται ισομερώς κατά την κυτταροδιαίρεση. Η πρωτεΐνη E2 δρά ως μεταγραφικός παράγοντας, καθώς ρυθμίζει τον πρώιμο ιικό υποκινητή και ελέγχει την έκφραση των E6 και E7. Κατά το τρίτο στάδιο, η αντιγραφή πραγματοποιείται στα περισσότερο διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, στα οποία δεν παρατηρείται επιπλέον σύνθεση κυτταρικού DNA, αλλά έκρηξη σύνθεσης ιικού.

-Μεταγραφή των HPVs

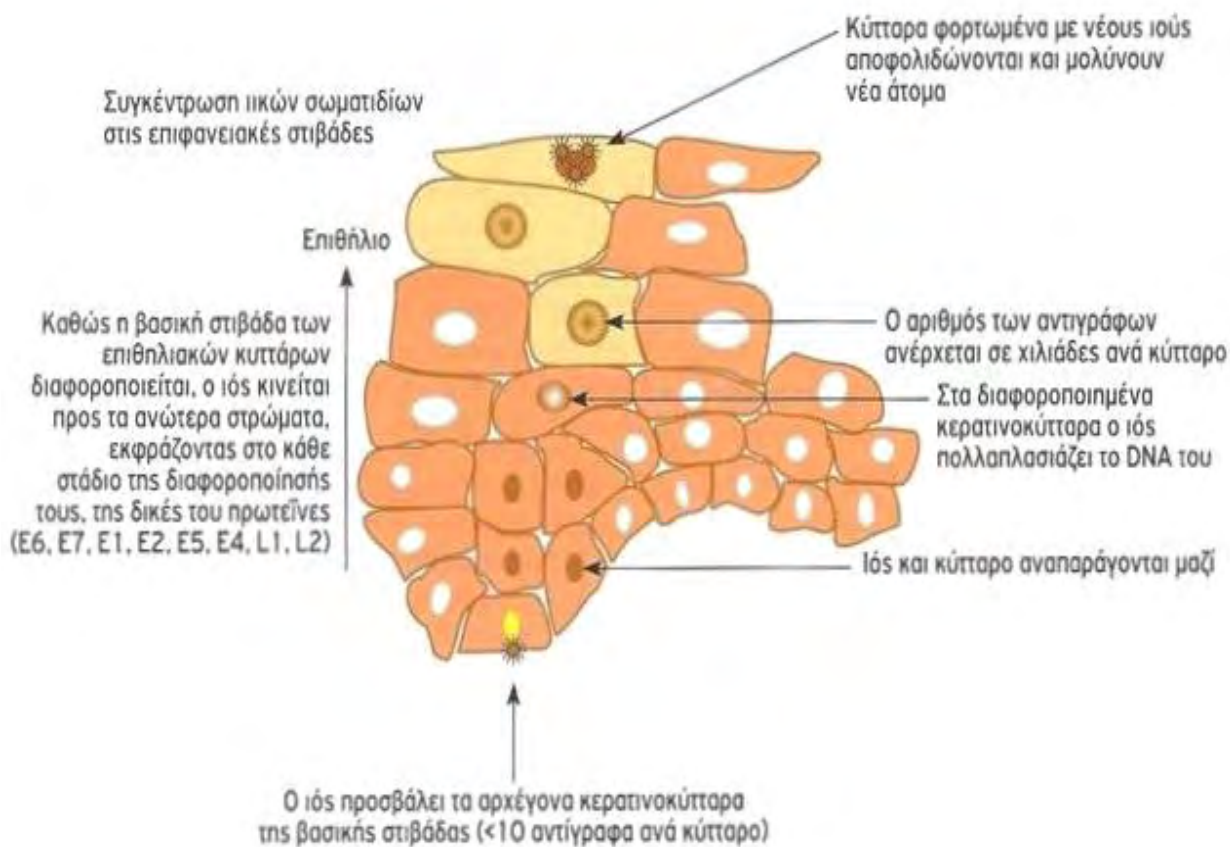
Η ύπαρξη πολλών υποκινητών, σχεδίων ματίσματος και παραγωγής του mRNA καθιστούν τη μεταγραφή των ιών HPVs, μία ιδιαίτερα πολυσύνθετη διαδικασία. Σε αδιαφοροποίητα ή ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες της πρώιμης περιοχής (E1, E2, E4, E5, E6, E7), που βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τους HPV-16, HPV-31 και p105 για τον HPV-18). Αντιθέτως, στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, εκφράζονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 από την όψιμη περιοχή. Αυτά τα ανοικτά πλαίσια βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670.

Επιπλέον, παρατηρείται μεγάλη διαφορά στη διαδικασία της μεταγραφής στους τύπους υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανομοιογένεια της δομής και της έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών. Στους high-risk τύπους υπάρχει μόνο ένας υποκινητής υπεύθυνος για τη μεταγραφή των E6 και E7 πρωτεϊνών, ενώ στους low-risk τύπους 2.

-Πακετάρισμα και απελευθέρωση των HPVs

Οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την απελευθέρωση των ιών είναι λίγες. Ο ιός δεν θεωρείται κυτταρολυτικός και η απελευθέρωσή του δεν συμβαίνει πριν τα στρώματα του κερατοποιημένου επιθηλίου, ενώ ανιχνεύεται στην κοκκώδη επιφάνεια και όχι σε χαμηλότερα στρώματα.

Για τη συναρμολόγηση των παραγόμενων ιικών σωματιδίων απαιτείται η παρουσία της των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2 και της πρωτεΐνης E2. Η L2 εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα εντός του καψιδίου. Η L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που αποτελούν τη βασική δομική μονάδα του καψιδίου. Τέλος, απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα με τη βοήθεια της E4 πρωτεΐνης.



Εικόνα 1.3 *iv.i.* Απεικόνιση της μόλυνσης από HPVs

1.4. Βιολογία των HPVs

i. Ταξινόμηση- Κατηγοριοποίηση των Human papillomaviruses (HPVs)

-Ταξινόμηση σε γένη

Η μεγάλη οικογένεια των papillomaviruses περιλαμβάνει τους papillomaviruses ανθρώπου και ζώων, που κατηγοριοποιούνται σε 12 γένη, κάθε ένα από τα οποία παίρνει το όνομά του από ένα ελληνικό γράμμα της αλφαβήτου. Από τα 12 γένη τα 5 περιλαμβάνουν papillomaviruses ανθρώπου (Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu), ενώ τα 7 papillomaviruses ζώων. Η ταξινόμηση γίνεται με βάση την ομοιότητα της L1 καψιδικής πρωτεΐνης και η προϋπόθεση για να ανήκουν σε ένα γένος είναι αυτή η ομοιότητα να ξεπερνάει το 60%.

Alpha-papillomavirus

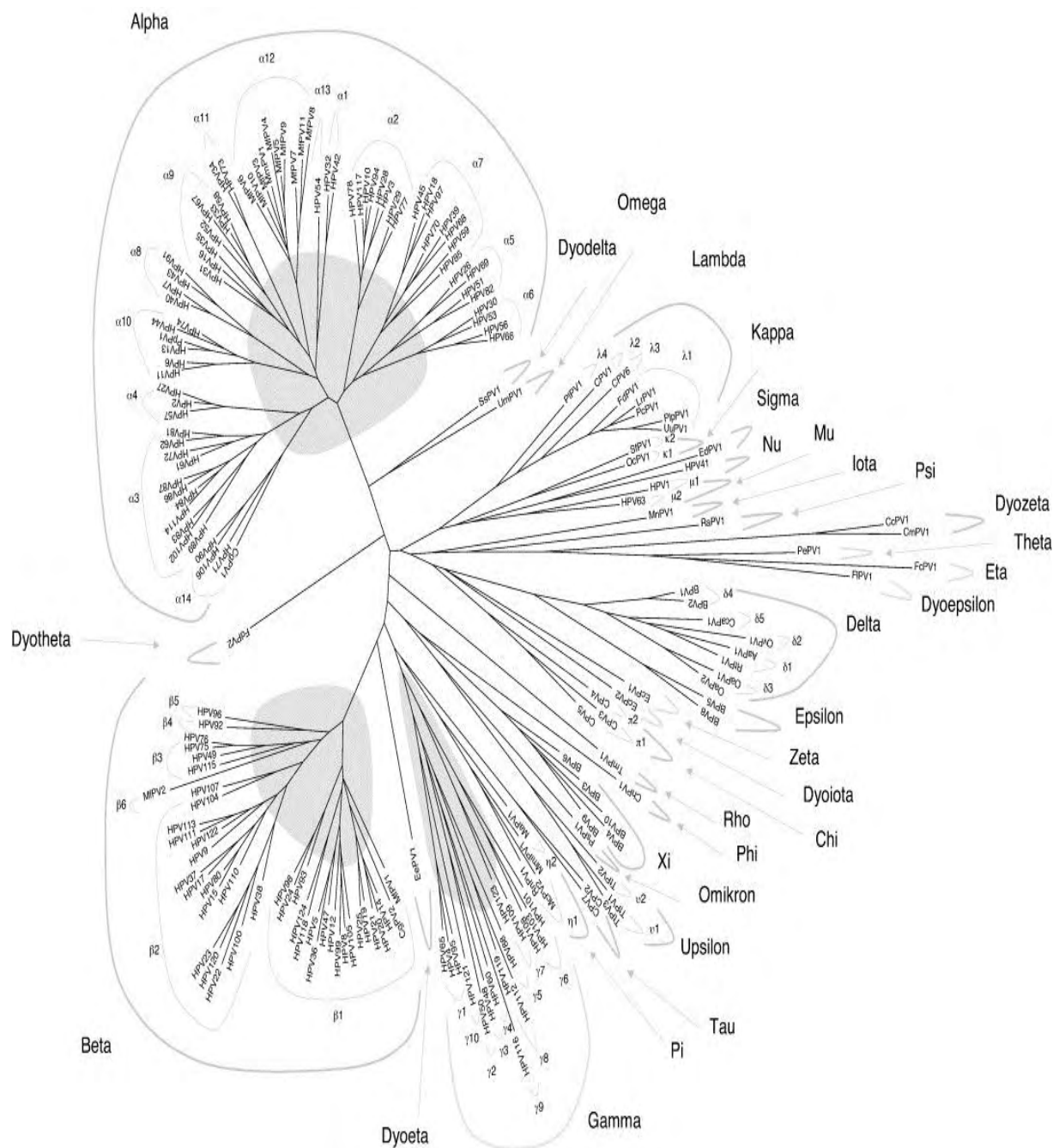
Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι περισσότεροι HPVs, κάποιοι από τους οποίους θεωρούνται οι πιο «αθώοι», όπως τους χαρακτηρίζουν οι γιατροί, και κάποιοι άλλοι από τους πιο επικίνδυνους. Οι Alpha-papillomaviruses προσβάλλουν τόσο επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, όσο και του βλεννογόνου. Έτσι, το Alpha γένος περιλαμβάνει από τους πιο συνηθεις και λιγότερο επικίνδυνους ιούς, όπως οι δερματικοί, που προκαλούν απλά θηλώματα, μέχρι τους ιούς που μολύνουν το επιθήλιο του τραχήλου, ακόμα και ιούς που μπορούν να προκαλέσουν καρκινικές δυσπλασίες τόσο στο γεννητικό όσο και στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Ο πιο επικίνδυνος Alpha-papillomavirus είναι ο HPV16, ο οποίος ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό πρόκλησης καρκίνου του τραχήλου (Doorbar et al, 2006).

Beta-papillomavirus

Οι ιοί του Beta γένους θεωρητικά δεν προκαλούν αλλοιώσεις. Επειδή όμως για την πρόκληση καρκίνου ή οποιασδήποτε άλλης αλλοίωσης, παίζουν πολλοί παράγοντες ρόλο, σε κάποιες περιπτώσεις, σε συνδυασμό παραδείγματος χάριν με UV ακτινοβολία, με κάποια κληρονομική ασθένεια, με αδύνατο ανοσοποιητικό κτλ. μπορεί να προκληθεί καρκίνος του δέρματος (Hoory et al, 2008; Pfister, 2003).

Gamma-, Mu-, Nu-papillomavirus

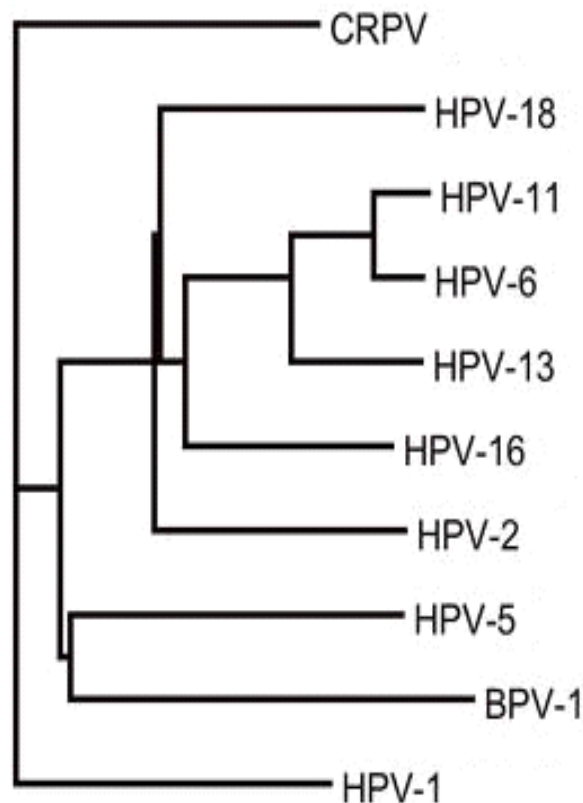
Οι υπόλοιποι HPVs, ανήκουν σε αυτά τα γένη και δεν προκαλούν αλλοιώσεις που μπορεί για τον οποιοδήποτε λόγο να εξελιχθούν σε καρκίνο. Το μόνο που προκαλούν είναι δερματικά θηλώματα, που πλέον, εύκολα θεραπεύονται (Doorbar et al, 2006).



Εικόνα 1.3 i.i. Ταξινόμηση των PVs σε γένη. Όπως βλέπουμε, HPVs υπάρχουν μόνο στα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu.

-Ταξινόμηση στελεχών

Η ταξινόμηση των ιών σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές γίνεται με βάση τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται η L1 νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η περιοχή αυτή αποτελεί σπουδαίο εργαλείο, καθώς διατηρείται συντηρημένη στο γονιδίωμα όλων των τύπων HPV και είναι ταυτόχρονα τόσο παραλλαγμένη, ώστε να επιτρέπεται ο διαχωρισμός των στελεχών και η κατηγοριοποίησή τους. Εφόσον λοιπόν, έχουν ήδη βρεθεί και χαρακτηριστεί κάποια στελέχη ιών, την ανακάλυψη νέων ακολουθεί η σύγκριση της αλληλουχίας τους με τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα. Αν η αλληλουχία της L1 περιοχής διαφέρει τουλάχιστον 10% κατατάσσονται ως τύποι, αν διαφέρει 2- 10% ως υπότυποι και αν είναι μικρότερη του 2% ως παραλλαγές (de Villiers et al, 2004).



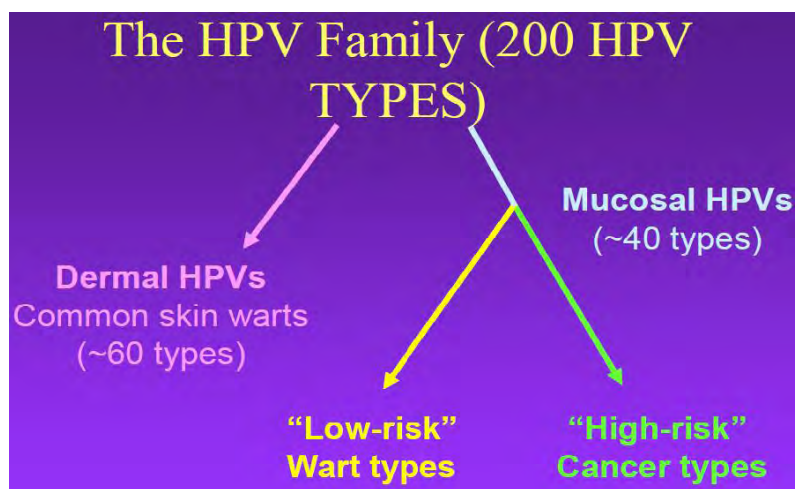
Εικόνα 1.3 i.ii. Φυλογενετικό δέντρο, HPV-μη ανθρώπων PVs, βασισμένο στις αλληλουχίες της L1 περιοχής. (Camp, 2006)

-Ταξινόμηση με βάση τα κύτταρα και την ογκογενετική ικανότητα

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα οι HPVs διαχωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες ως προς τα κύτταρα που προσβάλλουν: τους επιφανειακούς και τους βλεννογονικούς. Οι πρώτοι προσβάλλουν επιθήλια του δέρματος και προκαλούν ορατές αλλοιώσεις στα χέρια, στους αγκώνες, στα πόδια και στο πρόσωπο (Zaravinos et al, 2009), ενώ όπως έχει βρεθεί είναι ακίνδυνοι, πιο εύκολα θεραπεύσιμοι και από μόνοι τους μη καρκινογόνοι.

Στην άλλη ομάδα εντάσσονται οι τύποι που προσβάλλουν βλεννογόνες μεμβράνες και προκαλούν νεοπλασίες στους ενήλικες και δυσπλασίες του ανώτερου αναπνευστικού σε ενήλικες και παιδιά.

Επιπλέον, οι τύποι αυτής της κατηγορίας διαχωρίζονται εκ νέου σε υψηλού κινδύνου τύπους, high-risk, και χαμηλού κινδύνου, low-risk, ανάλογα με τη συμμετοχή τους στη δημιουργία καλοήθους ή κακοήθους όγκου (Πίνακας 1.1). Οι high-risk τύποι HPV, φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη δυσπλασιών σοβαρού βαθμού και καρκίνου του τραχήλου, ο οποίος σε ποσοστό 70% οφείλεται στους τύπους 16 και 18 (Zaravinos et al, 2009). Σε μία παγκόσμια μελέτη περίπου 1000 δειγμάτων τραχήλου της μήτρας πάνω από το 90% των δειγμάτων περιείχαν κάποιον ιό HPV (Bosch et al, 1995). Επίσης, ο τύπος HPV 16 εμπλέκεται σε ένα ποσοστό 80-90% των περιστατικών καρκίνων του στοματοφάρυγγα και σε ένα ποσοστό 68% καρκίνων της στοματικής κοιλότητας. Από την άλλη οι low-risk τύποι σχετίζονται με καλοήθεις όγκους του στοματικού και του ουροποιητικού επιθηλίου σε ενήλικες και παιδιά, ενώ σπάνια ανιχνεύονται σε κακοήθεις όγκους (Zaravinos et al, 2009).



Εικόνα 1.3 i.iii. Ταξινόμηση των HPVs.

Υψηλού Κινδύνου τύποι HPV's High-risk	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Χαμηλού Κινδύνου τύποι HPV's Low-risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 66, 70, 72, 81

Πίνακας 1.3 i.iv. Ομάδες Επικινδυνότητας HPV's.

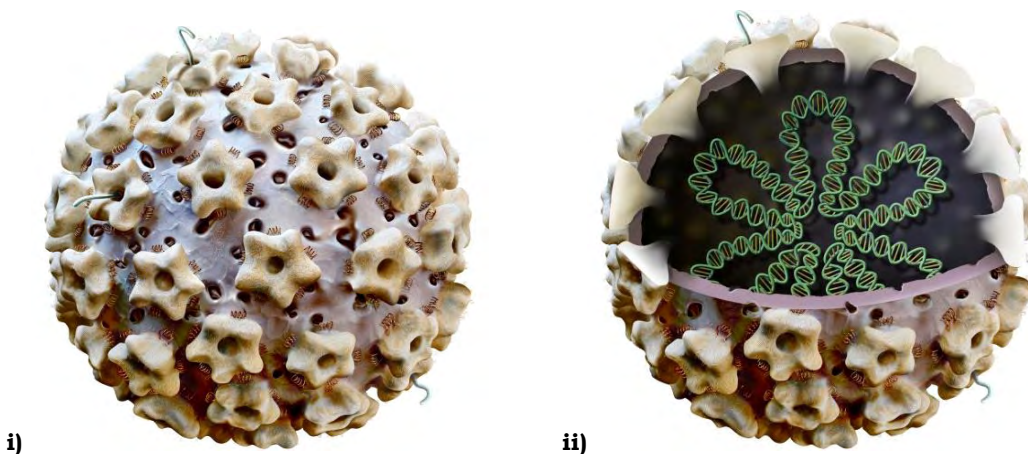
ii. Δομή των HPVs

-Δομή καψιδίου

Οι HPVs ως ιικά σωματίδια έχουν διάμετρο 55 nm και περιβάλλονται από το πρωτεϊνικό καψίδιο, χωρίς φάκελο. Το καψίδιο αποτελείται από 72 υπομονάδες (καψομερίδια), οι οποίες είναι έτσι τοποθετημένες ώστε να δίνουν στο ιοσωμάτιο εικοσαεδρική συμμετρία, σχηματίζοντας ένα ικό κοχύλι (Kimbauer et al, 1992; Syrjanen et al, 2000).

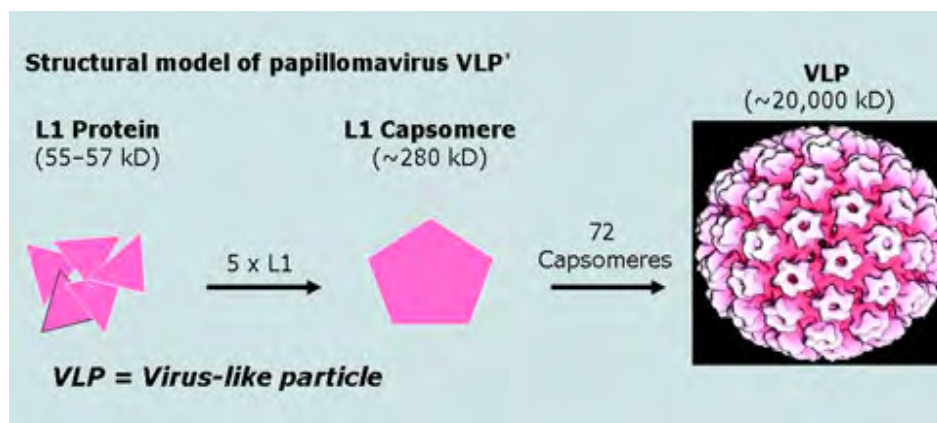
Η δομή του καψιδίου δημιουργείται από τη συντηρημένη πρωτεΐνη L1 και τη λιγότερο συντηρημένη L2. Πιο συγκεκριμένα, είναι αποτέλεσμα 360 αντιγράφων της L1, τα οποία οργανώνονται σε 72 πενταμερή διαμορφώνοντας την εικοσαεδρική δομή μεγέθους περίπου 600 Å. Επιπλέον, υπάρχουν 12 αντίγραφα της πρωτεΐνης L2, η οποία είναι πιθανώς συνδεδεμένη με 12 πενταμερή του καψομερούς.

Οι αλληλεπιδράσεις των L1/L2 είναι κυρίως υδροφοβικές. Υπάρχει μία περιοχή 44 αμινοξέων κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της L2 που αλληλεπιδρά ειδικά με την L1, με την υπολογιζόμενη στοιχειομετρία ενός μορίου L2 για κάθε 5 μόρια L1. Η δέσμευση σε αυτήν την περιοχή διευκολύνεται μέσω ισχυρών υδροφοβικών δεσμών που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα της L2, 413 έως 419.



Εικόνα 1.3 ii. i) Δομή καψιδίου ιού HPV (τα εξωτερικά «αστεράκια» αποτελούν πενταμερή της L1 πρωτεΐνης), ii) Αφαίρεση ενός τμήματος του καψιδίου και παρουσίαση του εσωτερικού γονιδιώματος.

Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη L1 δημιουργεί άδεια καψίδια που ορίζονται ως VLPs (Virus-like particles) και είναι μορφολογικά- ανοσολογικά πολύ όμοια με τα ιικά σωματίδια, αλλά τους λείπει το γονιδίωμα. Εμβολιασμός με L1 VLPs προστατεύει από τη μόλυνση (Yang et al, 2004).



Εικόνα 1.3 ii.iii Δομή άδειων καψιδίων, VLPs, που σχηματίζονται από την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη L1. (Kimbauer et al, 1992; Syrjanen et al, 2000)

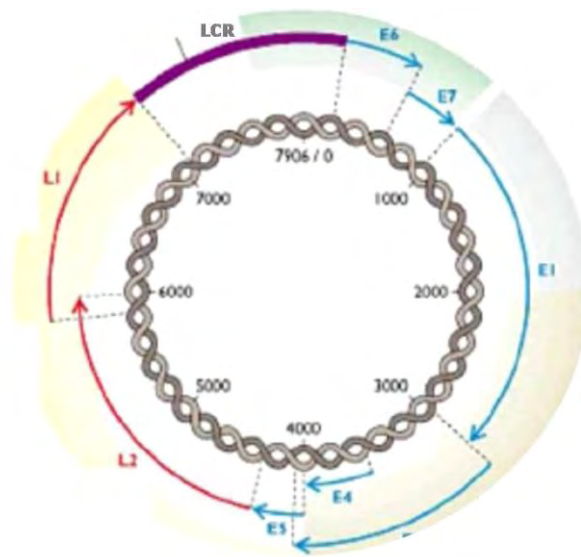
-Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα των ιών είναι δίκλωνο, κυκλικό DNA μεγέθους 7900 bp. Στα ιικά σωματίδια είναι συνδεδεμένο με τις κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μία δομή παρόμοια με αυτή της χρωματινής (Howley, 1996). Το γονιδίωμα των HPVs κωδικοποιεί 8 ή 9 αναγνωστικά πλαίσια (open reading frames-ORFs) και περιέχει πολλαπλούς εκκινητές. Τα ORFs μεταγράφονται ως πολυκοιστρονικά mRNAs, η μετάφραση των οποίων γίνεται μόνο από τη μία αλυσίδα DNA (Morris et al, 1993).

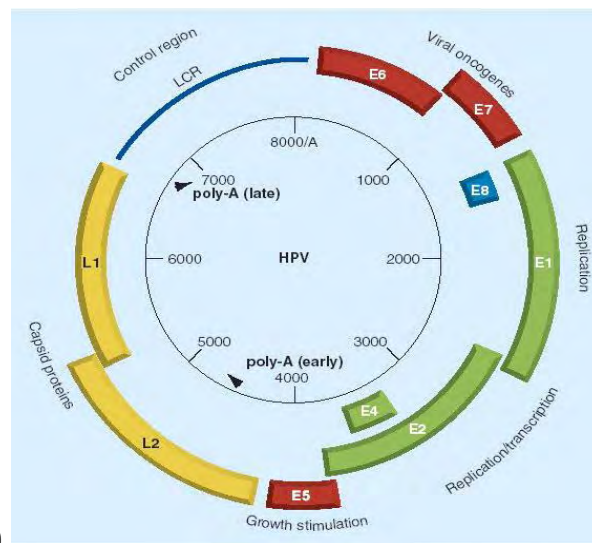
Από λειτουργική άποψη οργανώνεται σε 3 περιοχές, ανάλογα με την χρονική έκφραση κατά τον κύκλο ζωής τους. Η περιοχή που εκφράζεται πρώτα χαρακτηρίζεται ως πρώιμη (Early region- E), η περιοχή που εκφράζεται αργότερα χαρακτηρίζεται ως όψιμη (Later region- L) και η μη κωδικοποιούσα περιοχή ως URR ή LCR (upstream regulatory region- URR ή long control region - LCR) (Morris et al, 1993; Tan et al 1994). Οι 3 αυτές περιοχές σε όλους τους papillomaviruses διαχωρίζονται από 2 περιοχές πολυαδενυλίωσης (pA): πρώιμη pA (AE) και όψιμη pA (AL) περιοχή (Zheng et al, 2006).

Η πρώιμη περιοχή περιλαμβάνει 6, 7 ή 8 αναγνωστικά πλαίσια, E1-E7, και κωδικοποιεί μη δομικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA, τη ρύθμιση της μεταγραφής, τον καρκινικό κυτταρικό μετασχηματισμό, την ιική «προσέλευση» και απελευθέρωση. Η όψιμη περιοχή αποτελεί το 40% του γονιδιώματος και περιλαμβάνει 2 αναγνωστικά πλαίσια, L1-L2, που κωδικοποιούν τις δομικές ιικές καψιδικές πρωτεΐνες (Howley, 1996). Η μη κωδικοποιούσα περιοχή LCR/URR περιέχει ένα μικρό τμήμα DNA, μεγέθους περίπου 1kb, μεταξύ του 5'- άκρου της E περιοχής και του 3'- άκρου της L περιοχής. Η περιοχή αυτή περιέχει ειδικές συνδετικές θέσεις για ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Sp1, Oct1 και YY1, οι οποίοι ρυθμίζουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιού, καθώς αποτελεί τη θέση έναρξης της αντιγραφής και φέρει σημαντικές θέσεις δέσμευσης της RNA πολυμεράσης 2 (Morris et al, 1993; Tan et al 1994; Chung et al, 2009).

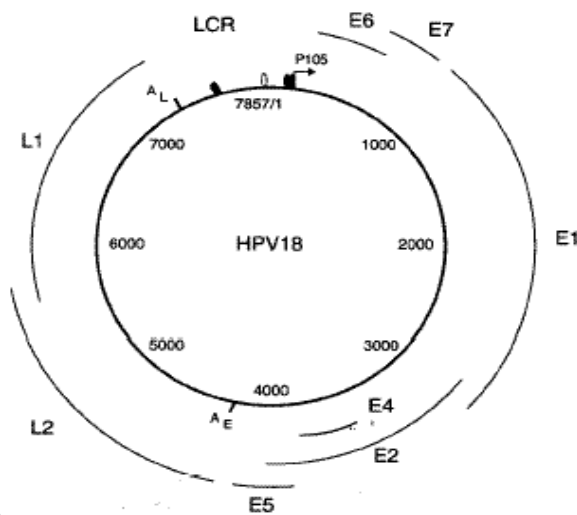
Στους ιούς υψηλής επικινδυνότητας τα μετάγραφα προκύπτουν από 2 βασικούς υποκινητές. Ο πρώτος βρίσκεται ανοδικά του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της E6 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (ανάλογα με τον τύπο του ιού έχει και άλλο όνομα, χαρακτηριστικά στον HPV-16 ονομάζεται p97, ενώ στον HPV-18 p105). Ο δεύτερος υποκινητής είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (στον HPV-16 ονομάζεται p742) (Smotkin et al, 1986; Grassmann et al, 1996). Η συγκριτική ανάλυση των ιών διαφορετικών τύπων HPV έχει δείξει πως οι καλύτερα συντηρημένες περιοχές είναι η L1 και E1 (de Villiers et al, 2004).



i)



ii)



iii)

Εικόνα 1.3 ii.iv. Δομή του γονιδιώματος των HPVs. i) Φαίνεται η δίκλωνη έλικα του DNA και τα ORFs, ii) παρουσιάζονται οι 2 περιοχές πολυαδενυλίωσης, iii) παρουσιάζεται ο βασικός υποκινητής στον τύπο HPV-18. (Expert Rev Mol Diagn, 2008).

iii. Ιικές πρωτεΐνες

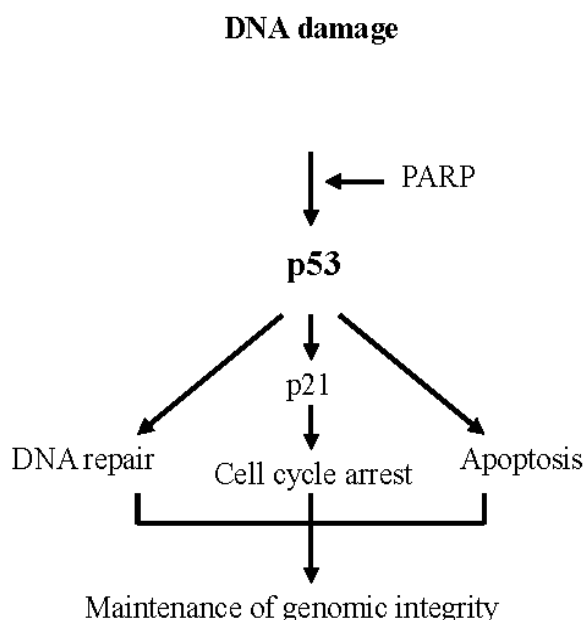
Οι ικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε πρώιμες (E- Early) και όψιμες (L- Later) ανάλογα με την χρονική έκφρασή τους. Οι πρώιμες πρωτεΐνες είναι οι E1, E2, E3 (όχι πάντα), E4, E5, E6, E7 και E8 (όχι πάντα), ενώ οι όψιμες οι L1 και L2 (Chung et al, 2009). Συνοπτικά, οι πρωτεΐνες E5, E6 και E7 συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση, ενώ ταυτόχρονα οι E6 και E7 εμπλέκονται πιο έντονα στην καρκινογένεση. Οι E1, E2 και E4 πρωτεΐνες ελέγχουν την ιική μεταγραφή και αντιγραφή. Από την άλλη οι όψιμες, η μεγάλη L1 και το μικρό σύμπλοκο L2, σχηματίζουν δομές ώστε να αναπτυχθεί το καψομερίδιο και 72 από αυτά έρχονται κοντά για το σχηματισμό του σφαιρικού εικοσαδρικού καψιδίου (Zaravinos et al, 2009).

-Πρωτεΐνες E6 και E7

Οι πρώτες ικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι οι E6 και E7 οι οποίες είναι και οι βασικότερες που σχετίζονται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό στους high risk τύπους.

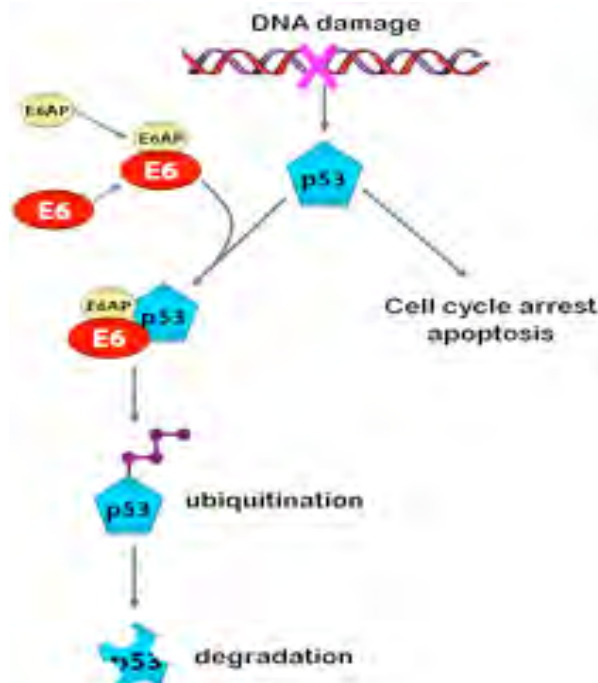
Η πρωτεΐνη E6 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα των μολυσμένων με HPV κερατινοκυττάρων, ενώ προσδέεται σε περισσότερες από 12 πρωτεΐνες (Barbarosa et al, 1989; zur Hausen, 2002). Έχει μέγεθος 150 αμινοξέων και περιέχει 2 περιοχές δέσμευσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Χαρακτηριστικά χρησιμοποιεί μικρούς προαγωγείς που περιέχουν μόνο ένα TATA box element (Sedman et al, 1991).

Η ιική πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση του ιού. Βασικότερη είναι η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 που ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο στα σημεία G1/S, G2/M (Oren, 2003; Slee et al, 2004). Τα επίπεδα της p53 σε φυσιολογικά κύτταρα είναι γενικά χαμηλά. Σε περίπτωση όμως βλάβης του κυττάρου, είτε αυτή είναι κάποια ιική μόλυνση είτε κάποια «ζημιά» στο DNA (χημική καρκινογένεση, ακτινοβολία), τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης αυξάνονται. Αποτέλεσμα της αύξησης είναι η επιδιόρθωση του DNA (εάν αυτό είναι εφικτό), η απόπτωση ή η παύση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου της G1 μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών γονιδίων και της p21, μιας πρωτεΐνης αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Εικόνα 1.3 iii.i) (Howley et al, 2006).



Εικόνα 1.3 iii.i. Παρουσιάζεται ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 και οι 3 μετέπειτα πιθανές πορείες σε περίπτωση βλάβης του DNA. (Serpí, 2003)

Η E6 πρωτεΐνη των υψηλού κινδύνου HPV's συνδέεται με την κυτταρική λιγάση της ουβικουιτίνης (E6AP) και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Το E6AP και το σύμπλοκο E6AP/E6 συμπεριφέρεται ως p53 ειδική πρωτεϊνική λιγάση της ουβικουιτίνης και αυξάνει το ρυθμό αποδόμησης του p53, ενώ ταυτόχρονα μπλοκάρει τις αντι-πολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές λειτουργίες του, αναστέλλοντας έτσι τους περιορισμούς σύνθεσης του κυτταρικού DNA. Με αυτό τον τρόπο, το κύτταρο συνεχίζει να αναπαράγεται όντας καρκινικό με αποτέλεσμα να δημιουργούνται όγκοι.



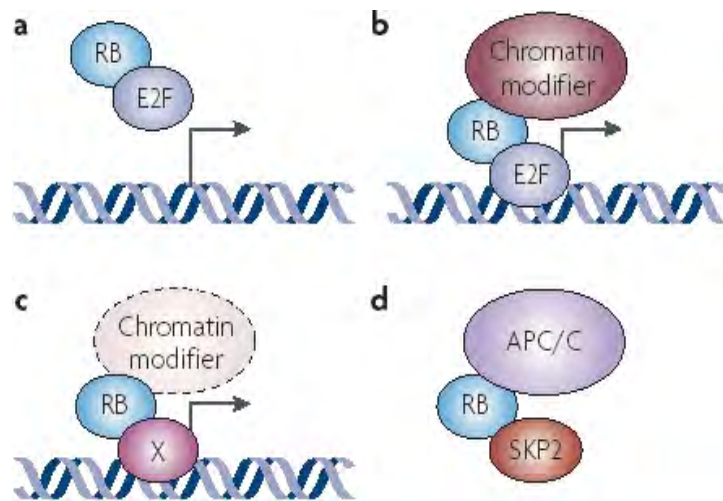
Εικόνα 1.3 iii.ii. Βλάβη στο DNA προκαλεί ενεργοποίηση της p53. Η πρωτεΐνη E6 συνδέεται στην E6AP, προκαλώντας αποδόμηση της p53 και συνεχή αναπαραγωγή του κυττάρου. (Hoenil et al, 2005)

Επίσης, η E6 μπορεί να ελαττώσει τη δραστικότητα της p53 μέσω αλληλεπίδρασης με το συνεργοποιητή της p53, p300/CBP (Lechner et al, 1994; Meyerson et al, 1997). Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας της E6 μπορεί να εμποδίσει την p53. Σχετική μελέτη απέδειξε ότι η E6 μπορεί να εμποδίσει την ακετυλίωση που προκαλείται από τον p300 στο νουκλεοσωμικό πυρήνα των ισονών (Thomas et al, 2005). Η ενεργοποίηση της p300/CBP προκαλεί άρση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου οδηγώντας σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και διπλασιασμούς στο κύτταρο (Foster et al, 1994; Kessis et al, 1993; Thompson et al, 1997). Σε μερικούς τύπους HPV, η E6 ενεργοποιεί την τελομεράση, μέσω αλληλεπίδρασής της με τον παράγοντα Myc και το συνεργοποιητή του Max, ένα ένζυμο που σχηματίζει επαναλαμβανόμενα τελομερή στα άκρα του αντιγραφόμενου DNA, επιτρέποντας τον συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνεπώς τη δημιουργία όγκων.

Η δεύτερη HPV πρωτεΐνη που είναι σημαντική για τη μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων και για την παθογένεια του ιού είναι η E7. Η πρωτεΐνη E7 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και, ομοίως με την E6, είναι μία ογκοπρωτεΐνη. Έχει μέγεθος 100 αμινοξέων και μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την καζεϊνική κινάση II (CKII) (Howley, 2006). Η E7 αποτελείται από 3 συντηρημένες περιοχές: την CR1 στο N άκρο, την CR2 που περιλαμβάνει το μοτίβο LXCXE, το οποίο προσδένει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb και την CR3 που περιέχει 2 μοτίβα δάχτυλου ψευδαργύρου.

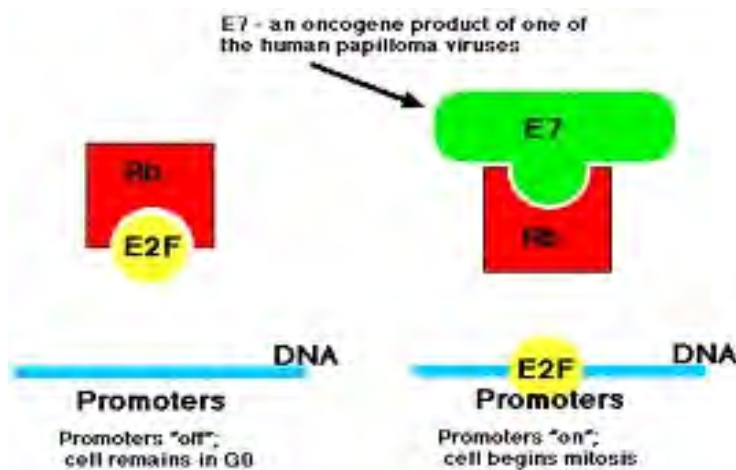
Η ογκογενετική λειτουργία της E7 συμπληρώνει στην ουσία τη λειτουργία της E6 και έγκειται στη δημιουργία συμπλόκων με τις αποφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος pRb, p107 και p130. Οι Rb πρωτεΐνες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που δρούν στην G1/S φάση. Φυσιολογικά, η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1, οι οποίοι συνδέονται στους προαγωγείς των γονιδίων της φάσης S. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή

της μεταγραφής γονιδίων που επάγουν την είσοδο του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη φάση (Edmonds et al, 1989; Weintraub et al, 1995).



Εικόνα 1.3 iii.iii. Ο φυσιολογικός ρόλος του μεταγραφικού συμπλόκου Rb. (Deborah- Burkhardt et al, 2009)

Η E7 μπορεί να παρακάμπτει τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με τη δέσμευση και αποδόμηση της αποφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Rb που οδηγεί στην απελευθέρωση του E2F (και άλλων πρωτεϊνών) και την αναιρέση της αρνητικής της επίδρασης στη μεταγραφική δραστηριότητα του E2F. Παρόμοια δράση ασκεί και στους άλλους 2 παράγοντες της οικογένειας, p107 και p130 (Boyer et al, 1996).



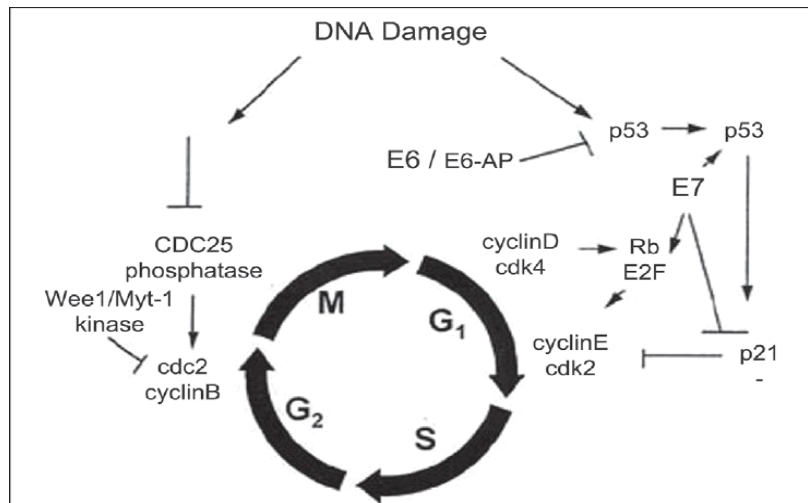
Εικόνα 1.3 iii.iv. Το κύτταρο όταν η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δεσμεύει τον παράγοντα E2F παραμένει στη φάση G1/S, ενώ όταν υπάρχει η E7 πρωτεΐνη, ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται κανονικά.

Επιπλέον, μελέτες έδειξαν πως η E7 αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E, ενώ απενεργοποιεί και τους αναστολείς της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CdK) p21 και p27. Λόγω αυτής της δράσης της, η Rb φωσφορυλιώνεται και προωθείται ο κυτταρικός κύκλος (Funk et al, 1997). Τέλος, η E7 αλληλεπιδρά με την τάξη I των δεακετυλασών των ιστονών και με συστατικά του μεταγραφικού συμπλέγματος AP1 (Tommasino et al, 1993; Zerfass et al, 1996; Funk et al, 1997).

Όλα τα παραπάνω ισχύουν για τους high risk τύπους. Αντιθέτως, στους low risk τύπους, όπως ο HPV-6 και 11, η E6 μπορεί είτε να δεσμεύεται στο p53 είτε όχι. Σε κάθε περίπτωση δεν ενεργοποιεί την αποδόμηση του p53 και η E7 δε δεσμεύεται στην pRb με μεγάλη συγγένεια. Τα υπόλοιπα πρώιμα γονίδια εκφράζονται κανονικά. Αυτό συμβαίνει διότι η ογκογενετική ικανότητα

των ιών εξαρτάται μεταξύ των άλλων και από το βαθμό της χημικής συγγένειας των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών με τις φυσιολογικές πρωτεΐνες των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στην περίπτωση των ιών χαμηλού κινδύνου οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μικρό βαθμό χημικής συγγένειας με τις πρωτεΐνες p53 και Rb (Munger et al, 1989; Doorbar et al, 2007).

Από όλα τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η λειτουργική απορρύθμιση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών από τη δράση των ιικών ογκοπρωτεϊνών ακολουθεί ένα πολυσύνθετο μοτίβο- μονοπάτι. Συνεπάγεται την μη ελεγχόμενη αντιγραφή του DNA, την εξασθένιση της απόπτωσης και εξηγεί την αυξημένη ογκογενετική ικανότητα των υψηλού κινδύνου τύπων (Munger et al, 1992).



Εικόνα 1.3 iii.v. Συνοπτική απεικόνιση των δράσεων των E6 και E7 πρωτεϊνών των ιών HPV στους high risk τύπους. (Gonzalez et al, 2002)

-Πρωτεΐνες E1 και E2

Είναι γνωστό ότι οι E1 και E2 πρωτεΐνες των HPVs ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος συμμετέχοντας στον έλεγχο της αντιγραφής και της μεταγραφής (Sverdrup et al, 1994).

Η E1 πρωτεΐνη διαθέτει το πιο συντηρημένο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το μέγεθός της είναι περίπου 68 kDa και έχει χαμηλή έκφραση στα μολυσμένα από HPV κύτταρα. Η E1 αποτελείται από μία N-τελική περιοχή, μία ενδιάμεση περιοχή και μία C-τελική περιοχή, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ΑΤΡασες και ελικάσες. Η ενδιάμεση περιοχή μπορεί να δεσμεύει το DNA (Van et al, 2002). Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει 2 χαρακτηριστικές ιδιότητες: 3'-5'-ελικάσης και ΑΤΡασης (Hughes et al, 1993; Seo et al, 1993; Yang et al, 1993). Ως ΑΤΡαση αναγνωρίζει πλούσιες σε ΑΤ περιοχές της θέσης έναρξης της αντιγραφής και χρησιμοποιώντας την άλλη της ιδιότητα ξεδιπλώνει τη θέση έναρξης και προχωράει στη δικάλα (Liu et al, 1995). Δημιουργεί εξαμερείς δακτυλίους τους οποίους διαπερνά το DNA και ξεδιπλώνεται. Ακόμα, η δραστηριότητα της E1 ρυθμίζεται και από την αλληλεπίδρασή της με τις κυκλίνες A και E.

Η πρωτεΐνη E2, μεγέθους περίπου 50 kDa, είναι ένας παράγοντας μεταγραφής. Δημιουργεί διμερή και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού DNA και τη μεταγραφική ρύθμιση. Τα διμερή της E2 προσδένονται σε παλίνδρομες αλληλουχίες (ACCN6GGT) που ονομάζονται E2BSs. Υπάρχουν 4 από αυτές τις αλληλουχίες εντός της περιοχής LCR, μία εκ των οποίων βρίσκεται γειτονικά της ιικής περιοχής της αντιγραφής. Ιδιαίτερα για την E2, έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του γονιδιώματος ως επίσωμα και στη συμπίκνωσή του σε μιτωτικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (You et al, 2004; Baxter et al, 2005). Η E2 πρωτεΐνη δεσμεύεται σε έναν πρώιμο υποκινητή και μειώνει την έκφραση των E6 και E7, ενώ η μείωση παραγωγής E2 κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του ιικού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή αποτελεί το πρώτο βήμα του μετασχηματισμού. Υπάρχει στην πλήρως αρτιμελή μορφή της και συμπεριφέρεται ως μεταγραφικός ενεργοποιητής του πρώιμου υποκινητή μόνο όταν τα επίπεδα έκφρασής της είναι χαμηλά. Στην κομμένη μορφή της συνεπάγεται την ανεξέλεγκτη παραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 (Doorbar, 2006; Talora et al, 2002; Ushikai et al, 1994).

Η E1 δεσμεύεται αδύναμα στη θέση έναρξης της αντιγραφής, μία πρόσδεση που ισχυροποιείται από το σχηματισμό του συμπλόκου με την E2. (Frattini et al, 1994; Dixon et al, 2000; Lu et al, 2003; Sun et al, 1996). Ταυτόχρονα, η δέσμευση της E2 είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Οι E1 και E2 φαίνεται να επαρκούν για τη σωστή αντιγραφή του ιού, ενώ ο αριθμός τους αυξάνεται όσο αυξάνονται τα παραγόμενα ιικά αντίγραφα (Laimins et al, 1998; Howley et al, 1996).

-Πρωτεΐνες E4 και E5

Μολονότι οι λειτουργίες των E4 και E5 δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, θεωρείται πιθανό και οι δύο να συμμετέχουν στη ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών (Fehrmann et al, 2003).

Η αλληλουχία του γονιδίου E4 δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στους διάφορους τύπους HPV παρότι εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 δε διαθέτει κωδικόνιο έναρξης AUG και χρησιμοποιεί την E1 για να ξεκινήσει τη μετάφραση (Howley, 1996). Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται από ματισμένα μετάγραφα τα οποία περιλαμβάνουν τα 5 πρώτα αμινοξέα της E1, έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι ενωμένες πρωτεΐνες E1/E4. Έχει αποδειχτεί πως σχετίζεται με τις κυτταροκίνες και επάγει την αποδιοργάνωση του δικτύου της κυτταροκερατίνης στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, καθώς και την απελευθέρωση του ισσωματίου μετά την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής (Doorbar et al, 1991; Wang et al, 2004). Φαίνεται πως η πρωτεΐνη E4 σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2 και ανταγωνίζεται τον προκαλούμενο από την E7 πρωτεΐνη κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι ερευνητές επιπλέον υποθέτουν ότι η E4 πρωτεΐνη σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την E2.

Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από το γονίδιο E5 είναι υδρόφοβες, διαμεμβρανικές, εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποιούν την ενεργότητα του υποδοχέα κινάσης- τυροσίνης του επιδερμικού αναπτυξιακού παράγοντα (EGF) (DiMaio et al, 2001). Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν στο πλάσμα, στο σύστημα Golgi και στη μεμβράνη του Ενδοπλασματικού δικτύου. Ερευνητές επίσης πιστεύουν ότι οι E5 πρωτεΐνες σχετίζονται με την κενοδοτιώδη ΑΤΡαση και καθυστερούν την ενδοσωμική οξίνιση σε συνδυασμό με την ανασταλτική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων στα κερατινοκύτταρα. Τέλος, οι πρωτεΐνες E5 ενισχύουν τις ιδιότητες των E6 και E7 (Valle et al, 1995). Επιπλέον, η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου του ιού σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, επηρεάζοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης. Απώλειά της συμβάλλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται όντως στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Fehrmann et al, 2003). Τέλος, οι E5 πρωτεΐνες είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν στην έναρξη της καρκινογένεσης ή στην παθογένεση της HPV μόλυνσης. Πράγματι, ορισμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η E5 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του αντιγόνου του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II (Zhang et al, 2003).

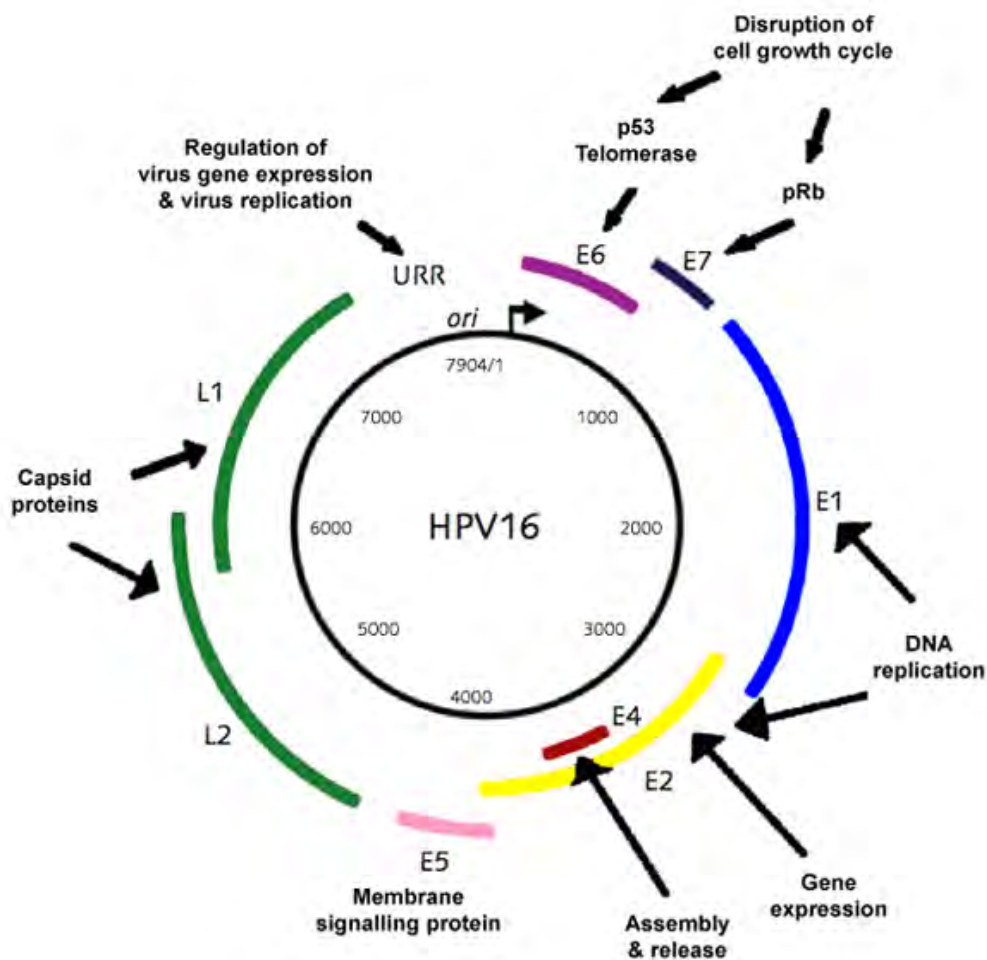
-Πρωτεΐνες E3 και E8

Ο ρόλος της E3 και η λειτουργία της μένει ακόμα αδιευκρίνιστη, καθώς και το αν εκφράζεται σε όλους τους τύπους των ιών. Οι επιστήμονες μπορούν μόνο να εικάζουν, εφόσον δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα επαρκή στοιχεία. Όσο για την πρωτεΐνη E8, ορισμένοι ερευνητές θεωρούν πως υπάρχει ακόμη ένα αναγνωστικό πλαίσιο για το οποίο όμως υπάρχουν μόνο υπόνοιες και όχι αποδείξεις.

-Όψιμες πρωτεΐνες

Το ιικό καψίδιο αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, την L1 και L2. Τα ισωμάτια των HPVs έχουν εικοσαεδρική δομή και συντίθενται από 360 μέρη της L1 πρωτεΐνης, τα οποία οργανώνονται σε 72 πενταμερείς δομές, τα καψομερή, και από 12 μέρη της L2 (Modis et al, 2002). Κατά τη συγκρότηση του ιού, οι πρωτεΐνες του καψιδίου συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία μεταφέρονται στον πυρήνα ώστε να συσκευάσουν την ιική χρωματίνη. Και οι δύο πρωτεΐνες συμβάλλουν στον καθορισμό της μολυσματικής ικανότητας των ιών (Roden et al, 2001).

Καθώς τα προσβεβλημένα κύτταρα διαφοροποιούνται σε τελικό στάδιο, τα όψιμα γονίδια, L1 και L2, εκφράζονται μέχρι τα ιικά αντίγραφα να γίνουν τόσα ώστε να μπορέσουν να καταστρέψουν το κύτταρο και να απελευθερωθούν. Η έκφραση του L2 γονιδίου προηγείται του L1 και η ύπαρξη της E2 πρωτεΐνης φαίνεται να αυξάνει την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας. Η λυτική απελευθέρωση του ιού απαιτεί την τελική διαφοροποίηση των επιστρατευμένων επιθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα 1.3 *iii.vi.* Απεικόνιση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης στο γονιδίωμα του ιού HPV16 (κοινή σε όλους τους τύπους).

Πρωτεΐνη	Λειτουργία
E1	Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γονιδιώματος και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Αναγνωρίζει και προσδέεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής και ρυθμίζει τη μεταγραφή δημιουργώντας σύμπλοκα με την E1.
E3	Άγνωστη λειτουργία.
E4	Συμβάλλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2.
E5	Καταστέλλει ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς.
E6	Υπεύθυνη για το μετασχηματισμό των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει τη δράση της p53, ενεργοποιεί την τελομεράση.
E7	Υπεύθυνη για το μετασχηματισμό των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει τη δράση της pRb, ενισχύει τη δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για το σχηματισμό του καψιδίου.
L2	Δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

Πίνακας 1.3 *iii.* Συνοπτική αναγραφή των λειτουργιών των ιικών πρωτεϊνών.

1.5. Εργαστηριακή Διάγνωση των HPVs

Την τελευταία δεκαετία σύγχρονες διαγνωστικές μέθοδοι προστέθηκαν στις ήδη υπάρχουσες, με αποτέλεσμα να ενισχυθεί όχι μόνο η θεραπεία της μόλυνσης από HPVs, αλλά και η έγκαιρη διάγνωση. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μοριακές μέθοδοι διάγνωσης που παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε

- μεθόδους ενίσχυσης με PCR
- μεθόδους άμεσης υβριδοποίησης
- signal amplified hybridization assays

-Μεθόδοι ενίσχυσης με PCR

Ενίσχυση με PCR

Η ανίχνευση των ιών με τη μέθοδο της PCR είναι πολύ ευαίσθητη και ταυτόχρονα πολύ ειδική. Πρακτικά η ευαισθησία μίας τέτοιας μεθόδου είναι 10-100 ιικά γονιδιώματα / 100 ng κυτταρικού DNA. Η τεχνική της PCR μπορεί να εφαρμοστεί είτε με ειδικούς εκκινητές σχεδιασμένους αποκλειστικά για κάθε τύπο είτε σχεδιασμένους για ένα ευρύ φάσμα τύπων. Δυστυχώς, η χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε τύπο είναι περισσότερο δαπανηρή, χρονοβόρα και περισσότερο ευαίσθητη σε μολύνσεις. Αντιθέτως, η χρήση εκκινητών για περισσότερους τύπους είναι πιο γρήγορη, λιγότερο χρονοβόρα, αλλά και λιγότερο αποτελεσματική. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάζονται σε καλά συντηρημένες περιοχές, όπως η L1 ή η E1 στη συγκεκριμένη περίπτωση, που φέρουν όλοι οι τύποι στο γονιδιόματά τους, όπως αναφέρθηκε (Zaravinos et al, 2009).

Υπάρχουν αρκετοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Το ζευγάρι των GP5+/GP6+ εκκινητών στοχεύει στην L1 περιοχή, αλλά έχει 100% συμπληρωματικότητα μόνο με λίγους τύπους των ιών. Αυτή η δυσκολία παρακάμπτεται με μείωση της θερμοκρασίας annealing κατά την εφαρμογή της PCR. Άλλοι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων χωρίς να χρειάζεται μείωση της θερμοκρασίας όπως στην προηγούμενη περίπτωση. Παράδειγμα τέτοιων εκκινητών- set είναι το ζευγάρι MY09/11. Επιπλέον, υπάρχουν εκκινητές που σχεδιάζονται με ινοσίνη, η οποία δεσμεύεται σε κάθε νουκλεοτιδίο. Τέτοιου είδους εκκινητές έχουν το πλεονέκτημα να ενισχύουν περισσότερους τύπους με αποτέλεσμα να παράγεται και περισσότερο προϊόν, ενώ ανταποκρίνονται καλά στις καθιερωμένες συνθήκες annealing. Εκκινητές που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι PGMY, SPF10, LCR/E7 καθώς και ο συνδυασμός των MY11/GP6+.

Μία άλλη επίσης διαδεδομένη προσέγγιση είναι η χρήση 2 ζευγαριών εκκινητών και η εφαρμογή 2 αλληλάλληλων PCRs. Η πρώτη PCR εφαρμόζεται με ένα ζεύγος εκκινητών και πάνω στο προϊόν αυτής εφαρμόζεται μία δεύτερη- nested PCR- συνήθως μέσω της οποίας ενισχύεται ένα πιο μικρό κομμάτι, ενώ είναι πιο ευαίσθητη και πιο ειδική. Απαραίτητη προϋπόθεση φυσικά είναι να στοχεύεται η ίδια περιοχή, π.χ. η L1 ή η E1.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται ενισχύουν τμήματα καθορισμένου και γνωστού μεγέθους, γεγονός απαραίτητο για την μετέπειτα αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Zaravinos et al, 2009).

Εμφάνιση των αποτελεσμάτων της PCR

Μόλις ολοκληρωθεί η PCR υπάρχουν διάφοροι τρόποι για την εμφάνιση και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει την πέψη του ενισχυμένου τμήματος με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού, γνωστός και ως τεχνική RFLP (Restriction fragment length polymorphism), η οποία ακολουθείται από ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης. Αυτή η διαδικασία, αν και χρησιμοποιείται αρκετά, συναντά πολλά προβλήματα όπως είναι οι διάφορες μολύνσεις και μερικές φορές η δυσκολία στην αναγνώριση των κομμένων τμημάτων (Zaravinos et al, 2009).

Τα προϊόντα της PCR μπορούν επιπλέον να ανιχνευθούν με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών (probes). Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι οι τεχνικές HPV DNA Chip, BiomedlabCo κτλ, που περιέχουν 22 ειδικούς ανιχνευτές, 15 για high-risk τύπους (16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 και 69) και 7 για low-risk τύπους (6, 11, 34, 40, 42, 43 και 44). Περιληπτικά, το προϊόν της PCR υβριδοποιείται πάνω στο Chip και ύστερα από μία πλύση τα

σήματα εμφανίζονται μέσω ενός DNA chipper. Η ευαισθησία αυτής της διαδικασίας ανέρχεται στο 94,9%, ενώ ταυτόχρονα γίνονται ορατές και πολλαπλές μολύνσεις. Στα ελαττώματα βέβαια της τεχνικής αυτής εντάσσεται το ιδιαίτερα ακριβό κόστος. Μία παρόμοια μέθοδος που ονομάζεται HPV Assay διαχωρίζει 14 high-risk τύπους ταυτοποιώντας ενισχυμένες E6 και E7 αλληλουχίες mRNA σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου (Zaravinos et al, 2009).

Τέλος, τα προϊόντα μπορούν να παρουσιαστούν με συγκεκριμένα kits όπως το BigDYE Terminator cycle sequencing kit και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης να συγκριθούν στην GenBank μέσω του προγράμματος BLAST. Δυστυχώς, στην περίπτωση των πολλαπλών μολύνσεων εμφανίζονται πολλές κορυφές κατά την αλληλούχιση και τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα, ενώ επίσης μπορεί να υποτιμηθεί η ύπαρξη πολλαπλών μολύνσεων αντίστοιχα (Zaravinos et al, 2009).

-Μέθοδοι άμεσης υβριδοποίησης

Οι κυριότερες μέθοδοι που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η Southern blot hybridization (SBH) και η in situ hybridization (ISH). Το πρόβλημα με αυτές είναι η χαμηλή ευαισθησία, ο μεγάλος χρόνος και η μεγάλη ποσότητα καθαρού DNA που απαιτείται. Από τις μεθόδους άμεσης υβριδοποίησης, η ISH είναι η λιγότερο ειδική για την ανίχνευση των HPVs, ενώ γίνονται προσπάθειες για συνδυασμό με μεθόδους ενίσχυσης με PCR, ώστε να αυξηθούν τα αποτελέσματα επιτυχίας. Γενικότερα, αυτές οι τεχνικές δεν χρησιμοποιούνται από πολλές εργαστηριακές ομάδες και όταν χρησιμοποιούνται ο σκοπός είναι η σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες καλύτερες μεθόδους (Zaravinos et al, 2009) .

-signal amplified hybridization assays

Η πιο αξιόπιστη signal amplified hybridization assay είναι το FDA-approved Hybrid Capture 2 test (HC2). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε 13 RNA ανιχνευτές για high-risk τύπους (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή, καθώς είναι σε θέση να ανιχνεύσει (για τον τύπο 16) 1 pg/mL, που ανταποκρίνεται σε 10^5 ιικά γονιδιωματικά αντίγραφα. Έχει αποδειχτεί πειραματικά πως η συγκεκριμένη μέθοδος είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματική ως προς την ανίχνευση των θετικών δειγμάτων από την ISH και από την ευρέως εφαρμοσμένη GP5+/GP6+ PCR (Zaravinos et al, 2009).

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των διαγνωστικών μεθόδων αυξάνεται με τη δημιουργία PCR προϊόντων που περιέχουν βιοτίνη ως ετικέτα και υβριδοποιούνται σε ανιχνευτές τοποθετημένους σε πιάτα με στρεπταβιδίνη. Μία τέτοια τεχνική ανακάλυψε και προωθεί στο εμπόριο η εταιρεία Roche. Η επονομαζόμενη μέθοδος Roche Molecular Systems Amplicor HPV MWP μπορεί να ανιχνεύσει 13 high-risk τύπους στοχεύοντας στην L1 περιοχή και όπως φαίνεται η ευαισθησία της ξεπερνά αυτή της HC2 (Zaravinos et al, 2009).

Τα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι βασικά. Αφενός δεν μπορούν να ανιχνεύσουν άλλους τύπους HPV και αφετέρου δε μπορούν να ανιχνεύσουν πολλαπλές μολύνσεις, γεγονός που δε μπορούν να αντισταθμίσουν το ιδιαίτερα μεγάλο κόστος (Zaravinos et al, 2009).

1.6. Σκοπός Πειραματικής Διαδικασίας

Όπως προκύπτει από την πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ο ιός HPV αποικίζει το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου και δυνητικά προκαλεί θηλώματα και καρκίνο στοματοφάρυγγα. Στη Θεσσαλία δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα μελέτη της συχνότητας του ιού HPV και των υποτύπων του στον υγιή πληθυσμό, δεδομένου ότι συχνά ο αποικισμός δε συνοδεύεται από ανάλογη κλινική συμπτωματολογία. Έτσι, είναι σημαντικό να καθοριστεί η συχνότητα της παρουσίας του ιού και να χαρακτηριστούν οι υπότυποι που κυριαρχούν στην περιοχή μας, παράλληλα με πιθανούς επιβαρυντικούς παράγοντες που επάγουν τον αποικισμό του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μελλοντικές μελέτες οι οποίες θα εστιάζουν σε πιθανή μείωση του αποικισμού και των ογκογόνων υποτύπων του ιού, ιδιαίτερα μετά την εισαγωγή του εμβολίου στα πλαίσια της πρόληψης.

Η πρόταση αυτή εμπίπτει στον στόχο της παρούσας πρόκλησης στη βάση ότι θα προσφέρει διακριτή υπηρεσία στην τοπική κοινωνία, όχι μόνο μέσω της μελέτης της παρουσίας του ιού στον υγιή πληθυσμό, αλλά και με την παράλληλη διοργάνωση ενημερωτικών διαλέξεων στο κοινό με αντικείμενο τον ιό HPV: παθογένεια, κλινική συμπτωματολογία, τρόπος μετάδοσης, τρόπος προφύλαξης, εμβολιασμός. Ιδιαίτερα θα απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με το εμβόλιο, τα οποία συχνά προβληματίζουν τα νέα άτομα τα οποία θέλουν εμπειριστατωμένη επιστημονική ενημέρωση.

Γίνεται αντιληπτό, πως υπάρχουν πολλά ζητήματα που πρέπει να απαντηθούν και να μελετηθούν, το πλαίσιο όμως αυτής της διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει μόνο τη μελέτη της συχνότητας των τύπων HPVs που εμφανίζονται και τη σύγκριση της επιτυχίας ανίχνευσης με διάφορα διαγνωστικά τεστ για τον ιό.

Η πειραματική διαδικασία που διεξάγεται βασίζεται στη μέθοδο της nested PCR και σε ειδικά ζεύγη εκκινητών (MY09/11, PGMY09/11-HMB01 και GP5+/6+), που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν. Γίνεται επιπλέον η σύγκριση τους ως προς την επιτυχία ανίχνευσης των ιών, έπειτα από αλληλούχηση και χρήση προγραμμάτων Βιοπληροφορικής για ταυτοποίηση.

Υλικά- Μέθοδοι

2.1 Κλινικά Δείγματα

i. Συλλογή φαρυγγικού επιχρίσματος

Βάσει των στοιχείων της απογραφής του πληθυσμού του 2001, όπως δόθηκαν στην ΕΣΥΕ, και ορισμένων επιδημιολογικών χαρακτηριστικών, καθορίζεται αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού με αναλογική κατανομή του μεγέθους ως προς την ηλικία, το νομό και τον τόπο κατοικίας. Τα φαρυγγικά επιχρίσματα λαμβάνονται από ειδικό ωτορινολαρυγγολόγο ιατρό με στυλέο, ενώ παράλληλα ο εξεταζόμενος συμπληρώνει ένα ανάλογο έντυπο με τα δημογραφικά του στοιχεία και ένα σχετικό ερωτηματολόγιο στα πλαίσια καταγραφής της ενημέρωσης του σχετικά με τον ιό.

Τα κλινικά δείγματα που αποστέλλονται για ανάλυση στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας είναι 125.

2.2 Χειρισμοί γονιδιωματικού DNA

i. Απομόνωση DNA

Τα φαρυγγικά επιχρίσματα που λαμβάνονται, αποστέλλονται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου γίνεται απομόνωση DNA σε κάθε κλινικό δείγμα. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται με το Magstration-MagaZorb DNA Common Kit- 200N (Εικόνα 2.2.i.). Μία απλή, γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης καλής ποιότητας DNA από οποιοδήποτε μείγμα.



Εικόνα 2.2.i. Διαδικασία απομόνωσης του DNA με το Magstration- Maga Zorb DNA Common Kit- 200N.

ii. Εκκύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διάλυμα νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς η απομάκρυνση των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο αποδοτική, όταν χρησιμοποιούνται δύο διαλύτες αντί για έναν.

Η φαινόλη έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει πρωτεΐνες μαζί με τα λιπιδικά κατάλοιπα από τα νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία μετά από φυγοκέντρηση, σχηματίζει την άνω φάση, λόγω μικρότερης πυκνότητας.

Η παρουσία του χλωροφόρμιου διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα. Η μη ολοκληρωτική απομάκρυνσή της φαινόλης από το διάλυμα αναστέλλει τη δράση διαφόρων ενζύμων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Μεθοδολογία

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V, προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης/ χλωροφορμίου (0,5V/ 0,5V) και αναδεύουμε έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 14000 στροφές, ώστε να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.
3. Μεταφέρουμε σε νέο σωληνάκι την υδατική φάση στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα, προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου (1V) και αφού αναδεύσουμε, φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 14000 στροφές.
4. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωληνάκι και επαναλαμβάνουμε την εκκύλιση με χλωροφόρμιο.
5. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωληνάκι και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Σημειώσεις

- Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στο χειρισμό του δείγματος, διότι η φαινόλη είναι τοξική και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα.
- Η ανάμειξη της οργανικής και της υδατικής φάσης γίνεται με ισχυρή ανάδευση (vortex), όταν απομονώνονται μόρια DNA μικρού μεγέθους (<10kb) και ήπια με ανακίνηση, όταν απομονώνονται μετρίου μεγέθους (10-30kb). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το μεγαλομοριακό DNA (>30kb), όπου η ανάμειξη των δύο φάσεων πραγματοποιείται με περιστροφή 20rpm, ώστε να μην τμηματοποιηθεί (degraded) .
- Εάν η φαινόλη δεν είναι εξισορροπημένη σε pH 7.8-8.0, τα νουκλεϊκά οξέα τείνουν να συγκεντρώνονται στην οργανική φάση. Υπό όξινες συνθήκες η εκκύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο προκαλεί τη συγκέντρωση RNA στην υδατική φάση, ενώ του DNA και των πρωτεϊνών στην οργανική.
- Σε περίπτωση που η υδατική φάση παρουσιάζει αυξημένη πυκνότητα λόγω αλάτων (>0,5M) ή σουκρόζης (>10%), θα σχηματίσει την κάτω φάση. Η προσθήκη της υδροξυκυτολίνης αποσκοπεί στη σύγυρη αναγνώριση της υδατικής φάσης.

iii. Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή για την απομάκρυνση αλάτων, ενζύμων, ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος είναι αρκετά εύκολη και πολύ αποδοτική. Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιούνται παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων.

Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊκά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα, όπως το Na⁺, τα οποία συνδέονται σε αυτές. Με αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό, ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσίας επαρκούς ποσότητας κατιόντων, ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών καταλοίπων. Απαιτούνται 2.0- 2.5 όγκοι αιθανόλης για έναν όγκο διαλύματος DNA.

Στη διαδικασία κατακρήμνισης με αιθανόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά άλατα, διαφορετικών συγκεντρώσεων. Η επιλογή εξαρτάται από την προτίμηση του καθενός, αν και σε κάποιες περιπτώσεις επιβάλλεται συγκεκριμένη επιλογή διαλύματος. Το οξικό νάτριο (CH₃COONa) συγκέντρωσης 0,3M χρησιμοποιείται στις περισσότερες κατακρημνίσεις ρουτίνας. Τα κατιόντα Na⁺ συνδέονται με το αρνητικά φορτισμένο DNA με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται.

Η κατακρήμνιση μικρής ποσότητας DNA μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη φορέων συγκατακρήμνισης, όπως είναι το γλυκογόνο. Το γλυκογόνο είναι αδιάλυτο σε διαλύματα αιθανόλης, συμπαρασύρει το DNA, και κατά τη φυγοκέντρωση, καθώς κατακρημνίζεται, το παγιδεύει στη δομή του, δημιουργώντας ίζημα.

Διαλύματα-Υλικά

- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa): από stock 2,31M, τελικής συγκέντρωσης 0,3M
- Αιθανόλη (Eth): τελικής συγκέντρωσης 100% και 70%
- Γλυκογόνο (Glycogen): συγκέντρωσης 20mg/μl

Μεθοδολογία

1. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα (PCR προϊόν) νερό, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl.
2. Προσθέτουμε δυόμιση όγκους αιθανόλης 100% (σε σχέση με τον αρχικό), CH₃COONa και 0,5μl γλυκογόνο.
3. Επωάζουμε στους -20°C για 15-20 λεπτά.
4. Φυγοκεντρούμε για 10-12 λεπτά σε μέγιστες στροφές.
5. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και απομακρύνουμε τις τελευταίες σταγόνες αιθανόλης με πιπέτα, προσεχτικά να μην ξεκολλήσει το ίζημα.
6. Προσθέτουμε μισό όγκο αιθανόλης 70% (σε σχέση με τον αρχικό).
7. Φυγοκεντρούμε για 5-7 λεπτά σε μέγιστες στροφές.
8. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσεχτικά.
9. Αφήνουμε ανοικτό το καπάκι, ώστε να στεγνώσει.
10. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε νερό.

iv. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση των ζωνών του DNA, που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, και μας ενδιαφέρουν, ώστε να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε αντιδράσεις κλωνοποίησης, πέψης, αλληλούχισης, ή σήμανσης.

Ακολουθείται το πρωτόκολλο Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Kit, Promega.

Διαλύματα- Υλικά

- Διάλυμα Πρόσδεσης στη Μembrάνη (Membrane binding solution)
- Διάλυμα Πλύσης Μembrάνης (Membrane wash solution)
- Υδατικό Διάλυμα ελεύθερο Νουκλεασών (Nuclease- free water)
- Δείγμα του πηκτώματος

Μεθοδολογία

1. Εντοπίζουμε την επιθυμητή ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης και την κόβουμε προσεχτικά, τοποθετώντας την σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.
2. Υπολογίζουμε το βάρος της ζώνης αφαιρώντας το βάρος του άδειου eppendorf.
3. Προσθέτουμε 10μl Membrane binding solution ανά 10mg πηκτώματος. Αναδεύουμε και επωάζουμε στους 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα. Ελέγχουμε και αναδεύουμε ανά διαστήματα με vortex.
4. Όταν διαλυθεί πλήρως, μεταφέρουμε το διάλυμα στη στήλη (SV minicolumn). Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα στο σωλήνα συλλογής (tube collection). Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
5. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 16000 στροφές. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθέτουμε 700μl Membrane wash solution. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 16000 στροφές.
7. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
8. Προσθέτουμε 500μl Membrane wash solution και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
9. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 16000 στροφές με ανοικτό το καπάκι, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
10. Μεταφέρουμε τη στήλη προσεχτικά σε καθαρό σωληνάκι τύπου eppendorf.
11. Προσθέτουμε 25-50μl Nuclease- free water, στο κέντρο της στήλης, χωρίς να αγγίζει το φίλτρο.
12. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό, ώστε να ενυδατωθεί και πραγματοποιείται έκλυση του DNA με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 16000 στροφές.
13. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 12 και 13.
14. Απορρίπτουμε τη στήλη και αποθηκεύουμε το DNA στους 4°C.

Σημειώσεις

- Η αιθανόλη που περιέχεται στο Membrane wash solution, είναι 95%.
- Το Nuclease- free water προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο 50-65°C.
- Η μέγιστη ικανότητα δέσμευσης της μεμβράνης είναι 40μg DNA και η απόδοση ανάκτησης μπορεί να φτάσει το 95%. Όταν το βάρος του πηκτώματος είναι πάνω από 500mg, κόβουμε το πηκτώμα και το τοποθετούμε σε δύο διαφορετικά σωληνάκια τύπου erpendorf, η μέγιστη ποσότητα πηκτώματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε στήλη είναι 350mg.

2.3 Χειρισμοί Πλασμιδιακού DNA

i. Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια. Ένα τυπικό πλασμίδιο- φορέας κλωνοποίησης πρέπει να περιέχει:

- Μία περιοχή ori (origin of replication) για ανεξάρτητη έναρξη της αντιγραφής, ώστε να μπορεί να αντιγράφεται στο βακτηριακό κύτταρο ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα.
- Ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα (ή και περισσότερα) αντιβιοτικά για δυνατότητα εργαστηριακής επιλογής (π.χ. Amp, Tet, Kan) (Bolivaretal, 1977; Bernard, 1995).
- Ένα γονίδιο αναφοράς, συνήθως της β-γαλακτοσιδάσης, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των βακτηρίων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- Μία περιοχή πολυσυνδέτη. Η περιοχή αυτή περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης πολλών ενζύμων περιορισμού, ώστε να μπορεί να κατατηθεί και να ενσωματώσει ένα ξένο τμήμα DNA.

ii. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη του DNA γίνεται με ένζυμα περιορισμού που είναι ειδικές ενδονουκλεάσες με δυνατότητα να αναγνωρίζουν ειδικές περιοχές κατά μήκος των αλληλουχιών του DNA, ακολουθώντας επαναλήψιμο τρόπο πέψης. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τελικά, ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούνται τμήματα με συμπληρωματικά ή με τυφλά άκρα.

Φυσιολογικά απομονώνονται από βακτήρια, στα οποία παρέχουν προστατευτικούς μηχανισμούς, έναντι εισβολής των φαγικών ιών στο εσωτερικό τους. Με την είσοδο του εξωγενούς DNA οι ενδονουκλεάσες περιορισμού το αποικοδομούν κόβοντάς το σε διάφορα σημεία (ίδια κάθε φορά), ενώ το μητρικό τους DNA προστατεύεται μέσω μεθυλίωσης. Το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε είναι το HindII από τους H.O. Smith, K.W. Wilcox και T.J. Kelley το 1968.

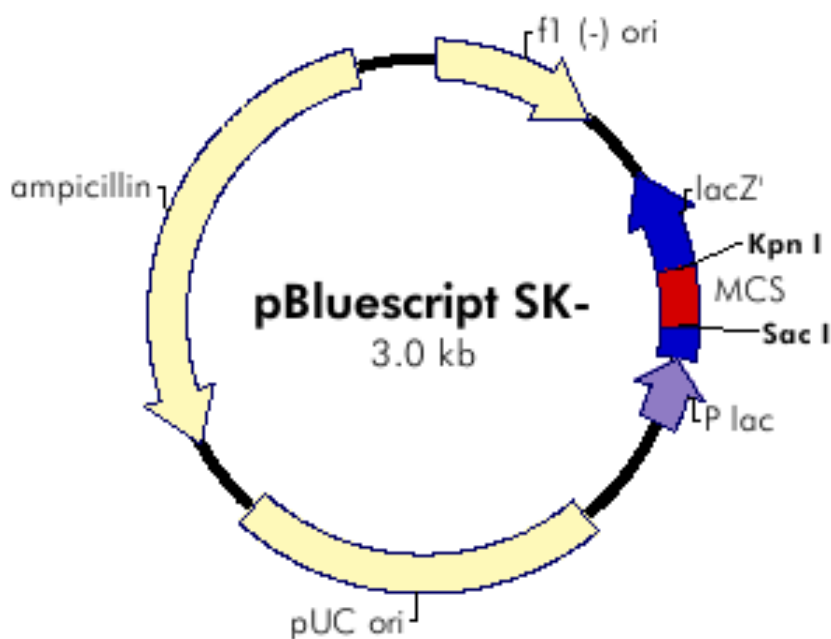
Τα ένζυμα περιορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς κατά τη διάρκεια γονιδιακής κλωνοποίησης και πρωτεϊνικής έκφρασης, καθώς και για την ταυτοποίηση αλληλομόρφων που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (πολυμορφισμός).

Για τη βελτιστοποίηση μιας αντίδρασης πέψης πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως η ιονική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος και οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου που απαιτείται σε αντίδραση συνολικού όγκου 20μl, για την υδρόλυση μg λ DNA, σε μία ώρα, στους 37°C.

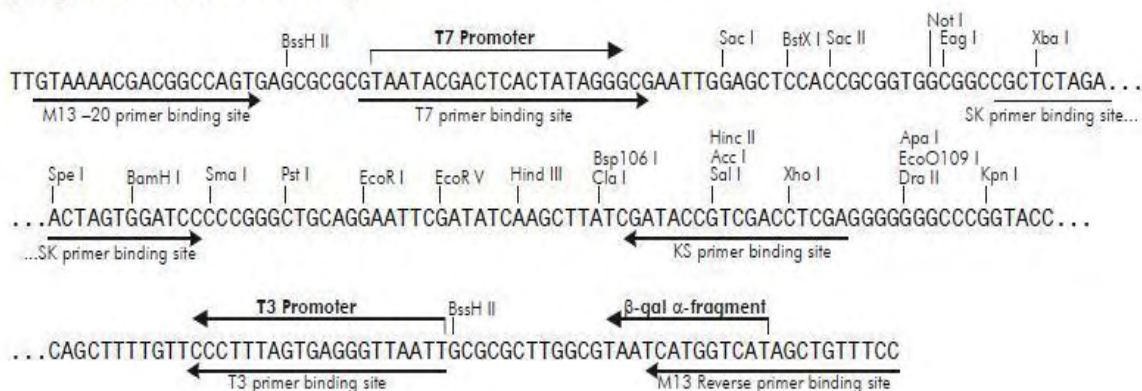
iii. Δημιουργία Φορέα Τ-άκρων

Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατάτμηση του πλασμιδίου με ενδονουκλεάση περιορισμού σε θέση του πολυσυνδέτη η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα και την επώαση του γραμμοποιημένου φορέα με Taq Πολυμεράση παρουσία dTTPs, ώστε να προστεθούν στα 3'- άκρα βάσεις Θυμίνης (3'-T overhangs). Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των κοινών Taq DNA Πολυμερασών να προσθέτουν δεοξυαδενοσίνες στο 3' άκρο των δίκλωνων DNA μορίων (Aslanidis & de Jong, 1990), με αποτέλεσμα η υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR να πραγματοποιείται σε γραμμικό πλασμίδιο που έχει προεξέχοντα 3'-T άκρα.

Ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας pBluescriptII, πέπτεται με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV και ακολουθεί αντίδραση τύπου PCR (με Taq Πολυμεράση και dTTPs). Έτσι, ο φορέας έχει συμπληρωματικά άκρα με κάθε PCR προϊόν και μπορεί να γίνει αντίδραση σύνδεσης μεταξύ κολλωδών άκρων από το ένζυμο DNA λιγάση.



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Εικόνα 2.3.ι Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS(+)

2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του '80 (Saiki et al, 1985; Mullis et al, 1986; Mullis et al, 1987). Μετά την πρώτη ανακοίνωση η τεχνική διαδόθηκε στην επιστημονική κοινότητα με την ταχύτητα αλυσιδωτής αντίδρασης. Το 1993, ο K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της PCR.

Η PCR αποτελεί μία γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA, ανεξαρτήτου προέλευσης. Πρόκειται για μία εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο DNA (Lietal, 1990).

Η τεχνική PCR είναι ένα σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοχημείας με σπουδαιότητα για την έρευνα εφάμιλλη των ενζύμων περιορισμού και της υβριδοποίησης του DNA σε μεμβράνες. Σήμερα, χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που έχουν ως βάση τον ειδικό πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA. Αποτελεί πρωτεύον εργαλείο στη μοριακή διαγνωστική νοσημάτων και εκτός από τη διάγνωση, η μέθοδος αυτή βοηθάει και στη θεραπεία και την αντιμετώπιση ασθενειών.

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και 2 ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα 2 εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινήτες- primers) και την ειδική DNA πολυμεράση (Taq DNA Polymerase). Το δείγμα θερμαίνεται στους 94- 95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ψύχεται στους 50- 65°C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινήτες με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται ως στόχος στην PCR εξαρτάται από τον επιθυμητό αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες μπορεί θεωρητικά να ενισχυθεί η αλληλουχία στόχος από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Παρόλα αυτά σε μία τυπική αντίδραση, η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται, εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος του υπό μελέτη οργανισμού και αντιστοιχεί σε αρκετές χιλιάδες αντίγραφα του στόχου.

Οι εκκινήτες (primers) αποτελούν ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Ο σχεδιασμός και η συγκέντρωση τους στο μείγμα καθορίζεται αυστηρά, ώστε να μην προκληθεί λανθασμένη έναρξη, ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων και δημιουργία διμερών (primer- dimer) που χρησιμοποιούνται επίσης ως DNA στόχος.

Στην PCR χρησιμοποιείται η Taq DNA Πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al, 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Δεν περιέχει 3'-5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα. Η ποσότητα του ενζύμου στο μείγμα οριοθετείται από την εταιρεία και από την PCR που διεξάγεται.

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq DNA Πολυμεράσης χρησιμοποιείται ώστε να παραμένουν σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης και να δρα επιθυμητά το ένζυμο. Σε αυτό συμβάλλει και το διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου. Η παρουσία δισθενών κατιόντων Mg είναι απαραίτητη για τη δράση της Taq DNA Πολυμεράσης, καθώς σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η Πολυμεράση.

Τέλος, απαραίτητο συστατικό ώστε να διεξαχθεί σωστά μία PCR είναι το διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε κατάλληλη ποσότητα. Έλλειψη ισορροπίας στο μείγμα των dNTPs μειώνει την πιστότητα της Taq DNA Πολυμεράσης και μπορεί να προκαλέσει λανθασμένη εισαγωγή νουκλεοτιδίου στην παραγόμενη αλυσίδα.

Διαλύματα- Υλικά

- DNA μήτρα (στόχος)
- Εκκινητές (Primers)
- Taq DNA Πολυμεράση (Taq DNA Polymerase)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Taq DNA Πολυμεράσης (Buffer)
- Διάλυμα Χλωριούχου Μαγνησίου ($MgCl_2$)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- ddH₂O

Μεθοδολογία

Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια που επαναλαμβάνονται κυκλικά (30-40 κύκλοι χωρίς ενδιάμεση ανανέωση των αντιδραστηρίων) ως εξής:

1. Στάδιο Αποδιάταξης (denaturation). Αφού αναμειχθούν όλα τα συστατικά, η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του δείγματος στους 93-95°C για λίγα λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA.
2. Στάδιο Υβριδοποίησης (annealing). Ακολούθως, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-70°C (ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξης - T_m - των αλυσίδων που αναμένεται να σχηματιστούν) και οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο συνολικό μείγμα του DNA. Συνήθως, η κατάλληλη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών υπολογίζεται με αρνητική απόκλιση 5 °C από το αναμενόμενο T_m ($T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + 2 * (\text{αριθμός βάσεων A+T})$).
3. Στάδιο Πολυμερισμού (synthesis). Τελικά η πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση του DNA από το τέλος κάθε εκκινητή. Η θερμοκρασία σταθεροποιείται στους 72°C έως ότου ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός από το ένζυμο.

-Real Time PCR

Η τεχνική Real Time PCR, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, δε χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση του προϊόντος της. Ο λόγος είναι πως η Real Time PCR χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια μέσω των οποίων το προϊόν της αντίδρασης παρακολουθείται άμεσα κατά τη διάρκεια σύνθεσής του. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης, η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης και η δυνατότητα άμεσης ποσοτικοποίησης, ενώ μειονέκτημα αποτελεί ο υψηλό κόστος συσκευής και αναλώσιμων.

-Nested PCR

Η μέθοδος αυτή θεωρείται ότι επαυξάνει την ευαισθησία και την ειδικότητα της PCR, γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε δείγματα που έχουν καλής ποιότητας DNA-RNA. Η μέθοδος της Nested PCR βασίζεται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR. Η πρώτη αντίδραση χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers), ενώ η δεύτερη δύο εσωτερικούς εκκινητές (inner-nested primers). Το προϊόν της πρώτης PCR χρησιμοποιείται ως δείγμα για τη δεύτερη PCR που παράγει προϊόν μικρότερου μήκους. Η αύξηση της ειδικότητας έγκειται στη διαδοχική χρήση 2 ζευγών εκκινητών, ενώ η μεγαλύτερη ευαισθησία προκύπτει από τον αυξημένο αριθμό κύκλων.

i. Χρήση ειδικών ενζύμων πολυμερισμού για την ανίχνευση HPV μόλυνσης

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ένζυμα πολυμερισμού. Η Bioline Taq Polymerase και η Biosystems Kapa HOTStart Polymerase.

Η βασική διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα 2 ένζυμα είναι πως η HOTAstart Polymerase είναι πιο ειδική. Αποτελεί ένα μείγμα Taq DNA Polymerase και ενός αναστολέα, ο οποίος δεσμεύεται πάνω στο ένζυμο και αναστέλλει τη δραστηριότητά του σε θερμοκρασία κάτω των 45°C. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η παραγωγή των μη επιθυμητών προϊόντων κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του μείγματος, που μπορεί να γίνει σε συνθήκες δωματίου, καθώς και πριν αρχίσει η κανονική διαδικασία ενίσχυσης στον κυκλοποιητή. Έτσι, με τη χρήση αυτού του ενζύμου η PCR καθίσταται πιο ευαίσθητη και πιο ειδική. Άλλα 2 πλεονεκτήματα της HOTAstart Polymerase είναι πως μπορεί να ενισχύσει ακόμα και αν υπάρχουν πολύ λίγα αντίγραφα ή αν είναι μεγαλύτερου μεγέθους γενωμικού DNA (6kb η HOTAstart Polymerase- 5kb η Taq Polymerase).

ii. Χρήση ειδικών εκκινητών για την ανίχνευση HPV μόλυνσης (Primers)

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA στα κλινικά δείγματα και για τη διαπίστωση ότι η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού έχει πραγματοποιηθεί σωστά και δεν υπάρχουν αναστολές της PCR, πραγματοποιείται PCR με στόχο την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης, ενός «housekeeping» γονιδίου. Οι εκκινητές GH₂O- Forward και PCO₄- Reverse ενισχύουν ένα τμήμα 268 bp στην L1 περιοχή.

Στη συνέχεια, διεξάγονται δύο PCRs με το set εκκινητών PGMY09/11- HMB01 και το εκφυλισμένο ζεύγος MY09/11. Οι PGMY11- A, B, C, D, E και ο MY09 αποτελούν τους Forward-εκκινητές, ενώ οι PGMY09- F, G, H, I, J, K, L, M, N, P, Q, R, HMB01 και MY11 τους Reverse εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν ένα τμήμα 450 bp στην L1 περιοχή.

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το προϊόν αυτών των PCRs, διεξάγεται η δεύτερη PCR, nested, με εκκινητές το ζεύγος GP5+/6+, GP5+- Forward εκκινητής και GP6+- Reverse εκκινητής. Οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν επίσης την L1 περιοχή, αλλά μικρότερο τμήμα της, εσωτερικό αυτού που ενισχύουν οι PGMY και MY, μεγέθους 150 bp.

Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 2.4 ii.i.

Σημειώσεις

- Οι εκκινητές υπάρχουν ως stock λυοφιλιωμένης μορφής. Γι' αυτό το λόγο συνήθως προσθέτουμε την απαραίτητη ποσότητα νερού, ώστε να δημιουργήσουμε stock υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 100pmol/μl που μας διευκολύνει για τους περαιτέρω χειρισμούς.
- Σύμφωνα με το βιβλίο "Roche M.Biochemicals PCR Applications Manual" τα όρια των εκκινητών σε μία αντίδραση PCR είναι 0.1mM- 0.6μM. Επομένως τα όρια διαμορφώνονται ως 0.1 pmol/μl- 0.6 pmol/μl. Για μία αντίδραση των 20.0 μl τα όρια προσαρμόζονται σε 2pmol- 12 pmol.

Για να αποφευχθεί η μόλυνση στους εκκινητές φτιάχνω ένα αραιωμένο stock επιθυμητής συγκέντρωσης, ώστε για την PCR να χρησιμοποιώ αυτό, π.χ.:

- Αρχικό stock εκκινητών 100pmol/μl.
- Επιθυμητό stock 8pmol/μl, όγκου 10μl

- $C_{αρχ} * V_{αρχ} = C_{τελ} * V_{τελ}$
 $100 * V_{αρχ} = 8 * 10$
 $V_{αρχ} = 80/100 = 0.8μl$ εκκινητή από το αρχικό stock και 9.2μl H₂O

Εκκινητές για την ανίχνευση HPV μόλυνσης	
Όνομα Εκκινητή	5'-3- Αλληλουχία
GH₂O	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
PCO₄	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
MY09**	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
MY11**	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C
**Όπου M=A ή C, W=A ή T, Y=C ή T, R=A ή G	

Πίνακας 2.4 *ii.i*.

iii. Real- Time PCR

Όλα τα δείγματα, αφού απομονωθεί και καθαριστεί πλήρως το DNA, αναλύονται με Real-time PCR, ώστε να γίνει η πρώτη διάγνωση της μόλυνσης από HPV. Έπειτα καταγράφονται ως αρνητικά και θετικά (αναφορά και των υποτύπων). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τα δείγματα, μαζί με τα αποτελέσματα, αποστέλλονται στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

iv. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-γλοβουλίνης με εκκινητές GH₂O/PCO₄

Η αντίδραση της PCR διεξάγεται όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 iv.i σε τελικό όγκο 20 μl.

Taq Polymerase	
DNA (15 ng/μl)	2.00 μl
Buffer (10x-1x)	2.00 μl
MgCl ₂ (50mM- 4 mM)	1.60 μl
dNTPs (10mM- 200 μM each)	1.60 μl
Primers: H ₂ O (2.5pmol) PCO ₄ (2.5pmol)	0.25 μl 0.25 μl
Taq (5u/μl- 2u)	0.40 μl
H ₂ O	11.90 μl
Τελικός	20.00 μl

Πίνακας 2.4 iv.i

Σημειώσεις

- Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες.
- Το ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer) και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν, είτε στο vortex (κυρίως το Buffer) είτε με το χέρι.

Η αντίδραση διεξάγεται σε Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή («PCR Srint Thermal Cycler», Thermo Electron Corporation) όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 iv.ii.

Taq Polymerase			
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Αποδιάταξη	95°C	1 min	39
Υβριδισμός	55°C	1 min	
Πολυμερισμός	72°C	1 min	
Τελικός Πολυμερισμός	72°C	10 min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Πίνακας 2.4 iv.ii

v. PCR με εκκινητές PGMY09/11- HMB01

Η αντίδραση της PCR διεξάγεται όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 v.i σε τελικό όγκο 20 μl.

Taq Polymerase	
DNA (15 ng/μl)	2.00 μl
Buffer (10x-1x)	2.00 μl
MgCl ₂ (50mM- 4 mM)	1.60 μl
dNTPs (10mM- 200 μM each)	1.60 μl
Primers: Forward (0.5 pmol x 5) Reverse (0.5 pmol x 13)	2.50 μl 6.50 μl
Taq (5u/μl- 2u)	0.40 μl
H ₂ O	3.40 μl
V τελικός	20.00 μl

Πίνακας 2.4 v.i

Σημειώσεις

- Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες.
- Το ρυθμιστικό Διάλυμα- Buffer και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν, είτε στο vortex (κυρίως στο Buffer) είτε με το χέρι.
- Στους εκκινητές PGMY09/11-HMB01 δεν χρησιμοποιήθηκε HotStart Polymerase, καθώς ανιχνεύθηκε μόλυνση.

Η αντίδραση διεξάγεται σε συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή («PCR Sprint Thermal Cycler», Thermo Electron Corporation) όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 v.ii.

Taq Polymerase			
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Αποδιάταξη	95°C	1 min	39
Υβριδισμός	55°C	1 min	
Πολυμερισμός	72°C	1 min	
Τελικός Πολυμερισμός	72°C	10 min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Πίνακας 2.4 v.ii

vi. PCR με εκκινητές MY09/11

Η αντίδραση της PCR διεξάγεται όπως φαίνεται στους πίνακες 2.4 vi.i- ii- iii- iv, σε τελικό όγκο 20 μ l. Διεξάγεται και μία PCR με εκκινητές τους MY09/11 σε συνδυασμό με τον εκκινητή HMB01.

Taq Polymerase	
DNA (15 ng/ μ l)	2.00 μ l
Buffer (10x-1x)	2.00 μ l
MgCl ₂ (50mM- 4 mM)	1.60 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
MY09 (8 μ mol)	0.80 μ l
MY11 (8 μ mol)	0.80 μ l
Taq (5u/ μ l- 2u)	0.40 μ l
H ₂ O	10.80 μ l
V τελικός	20.00 μ l

Πίνακας 2.4 vi.i.

Taq Polymerase	
DNA (15 ng/ μ l)	2.00 μ l
Buffer (10x-1x)	2.00 μ l
MgCl ₂ (50mM- 4 mM)	1.60 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
MY09 (8 μ mol)	0.80 μ l
MY11 (8 μ mol)	0.80 μ l
HMB01(2 μ mol)	0.20 μ l
Taq (5u/ μ l- 2u)	0.40 μ l
H ₂ O	10.60 μ l
V τελικός	20.00 μ l

Πίνακας 2.4 vi.ii.

HOTStart Polymerase	
DNA (10 ng/ μ l)	1.00 μ l
Buffer (5x-1x)	4.00 μ l
MgCl ₂ (25mM- 3 mM)	2.40 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
MY09 (8 μ mol)	1.00 μ l
MY11 (8 μ mol)	1.00 μ l
HMB01(2 μ mol)	0.20 μ l
Taq (5u/ μ l- 1u)	0.20 μ l
H ₂ O	8.60 μ l
Vτελικός	20.00 μ l

Πίνακας 2.4 vi.iii

HOTStart Polymerase	
DNA (10 ng/ μ l)	1.00 μ l
Buffer (5x-1x)	4.00 μ l
MgCl ₂ (25mM- 3 mM)	2.40 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
MY09 (8 μ mol)	1.00 μ l
MY11 (8 μ mol)	1.00 μ l
Taq (5u/ μ l- 1u)	0.20 μ l
H ₂ O	8.80 μ l
Vτελικός	20.00 μ l

. Πίνακας 2.4 vi.iv.

Σημείωση:

- Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες.
- Το ρυθμιστικό Διάλυμα- Buffer και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν, είτε στο vortex (κυρίως στο Buffer) είτε με το χέρι.

Η αντίδραση διεξάγεται σε συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή («PCR Srint Thermal Cycler», Thermo Electron Corporation) όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 vi.v.

Στάδιο	Θερμοκρασία		Χρόνος		Κύκλοι	
	Taq Polym.	HOTStart Polym.	Taq Polym.	HOTStart Polym.	Taq Polym.	HOTStart Polym.
Αποδιάταξη	95°C	95°C	9 min	5 min	1	1
Αποδιάταξη	95°C	95°C	1 min	1 min	39	40
Υβριδισμός	55°C	55°C	1 min	30 sec		
Πολυμερισμός	72°C	72°C	1 min	30 sec		
Τελικός Πολυμερισμός	72°C	72°C	5 min	5 min	1	1
Διατήρηση	4°C	4°C	-	-	-	-

Πίνακας 2.4 vi.v.

vii. Nested PCR με εκκινητές GP5+/6+

Η αντίδραση της PCR διεξάγεται όπως φαίνεται στους πίνακες 2.4 vii.i- ii, σε τελικό όγκο 20 μ l.

Taq Polymerase	
DNA (15 ng/ μ l)	2.00 μ l
Buffer (10x-1x)	2.00 μ l
MgCl ₂ (50mM- 3.5 mM)	1.40 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
GP5+ (2.0 μ mol)	1.00 μ l
GP6+ (2.0 μ mol)	1.00 μ l
Taq (5u/ μ l- 2u)	0.40 μ l
H ₂ O	10.60 μ l
V τελικός	20.00 μl

Πίνακας 2.4 vi.i.

HOTStart Polymerase	
DNA (15 ng/ μ l)	1.00 μ l
Buffer (5x-1x)	4.00 μ l
MgCl ₂ (25mM- 3 mM)	2.40 μ l
dNTPs (10mM- 200 μ M each)	1.60 μ l
Primers:	
GP5+ (2 μ mol)	1.00 μ l
GP6+ (2 μ mol)	1.00 μ l
Taq (5u/ μ l- 1u)	0.20 μ l
H ₂ O	8.80 μ l
Υ τελικός	20.00 μl

Πίνακας 2.4 vi.ii.

Σημείωση:

- > Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες.
- > Το ρυθμιστικό Διάλυμα- Buffer και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν, είτε στο vortex (κυρίως στο Buffer) είτε με το χέρι.

Η αντίδραση διεξάγεται σε συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή («PCR Sprint Thermal Cycler», Thermo Electron Corporation) όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 vi.iii.

Στάδιο	Θερμοκρασία		Χρόνος		Κύκλοι	
	Taq Polym.	HOTStart Polym.	Taq Polym.	HOTStart Polym.	Taq Polym.	HOTStart Polym.
Αποδιάταξη	95°C	95°C	5 min	5 min	1	95°C
Αποδιάταξη	95°C	95°C	1 min	1 min	39	95°C
Υβριδισμός	40°C	55°C	2 min	1 min		55°C
Πολυμερισμός	72°C	72°C	1 min	1 min		72°C
Τελικός Πολυμερισμός	72°C	72°C	10 min	10 min	1	72°C
Διατήρηση	4°C	4°C	-	-	-	4°C

Πίνακας 2.4 vi.iii.

2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων με εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, τη βιοχημεία, την πρωτεϊνική χημεία, τη φαρμακολογία κα. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος καθώς και για το διαχωρισμό μιγμάτων μορίων που δε μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται, κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα, μετανάστευση).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα (gels) αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του τμήματος που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα, ενώ τα πήκτωμα αгарόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος εμεταξύ των μορίων (από 50bp μέχρι Mb).

Η πρώτη καταγραφή ηλεκτροφόρησης μορίων πραγματοποιήθηκε το 1942, όπου οι Colemankαι Miller ανέφεραν τη μετακίνηση ουδέτερων εξόζων προς την άνοδο, σε διάλυμα βορικού νατρίου, ενώ η χρήση του βρωμιούχοαιθιδίου ως μέσο χρώσης για την οπτικοποίηση του DNA, εισήχθη το 1972 (Aaij et al, 1972).

-Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης- Παρασκευή πήκτωματος

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH (π.χ. ύστερα από κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού για τη χαρτογράφηση κλωνοποιημένων τμημάτων ή τη μεταφορά κατά Southernκαι την υβριδοποίηση, καθώς και για την ανάλυση PCR προϊόντων όπως στη μοριακή διάγνωση ασθενειών). Υπό αυτές τις συνθήκες (ουδέτερο pH) το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φορτισμένων του ομάδων . Επομένως, αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο θα κινηθούν προς την άνοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους (Hellingetal, 1974).

Η αгарόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα φύκη του γένους *Rhodophyceae* και το πήκτωμα που σχηματίζει δεν είναι συμπαγές, αλλά περιλαμβάνει πόρους, το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση. Η ικανότητά της να δημιουργεί πήκτωμα οφείλεται στην ιδιότητά της να τήκεται σε θερμοκρασία βρασμού του νερού και να στερεοποιείται όταν η θερμοκρασία μειώνεται στους 40-42°C.

Ο ρόλος του ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer) είναι να διατηρεί σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται περιέχουν Tris-οξικό, βορικό, φωσφορικό και EDTA. Το EDTAεξασφαλίζει τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων, ώστε να παραμποδιστεί η δράση νουκλεασών. Η ρυθμιστική ικανότητα του Tris-οξικού είναι αρκετά χαμηλή γι' αυτό προτιμάται να χρησιμοποιείται το Tris- φωσφορικό ή Tris-βορικό (TBE), που δίνουν εξίσου καλό διαχωρισμό και έχουν υψηλή ρυθμιστική ικανότητα.

Το διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Loading Buffer) περιέχει κυανό της ξυλόλης, μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και dH₂O. Το κυανό της ξυλόλης και το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι 2 χρωστικές ικνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο και επομένως κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων, ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή τους στα «πηγαδάκια» της ηλεκτροφόρησης.

Οι ζώνες του DNA που προκύπτουν από το διαχωρισμό είναι ορατές, λόγω χρωματισμού. Η μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μικρές συγκεντρώσεις μιας χρωστικής, του βρωμιούχοαιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχοαιθίδιο είναι η πιο κοινή χρωστική που χρησιμοποιείται σε αυτή τη διαδικασία. Περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η UV ακτινοβολία, η οποί απορροφάται είτε από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχοαιθίδιο, είτε από την ίδια τη χρωστική στα 302nmκαι στα 366nm, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρό- πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος, με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να φθορίζουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία (Sharpetal, 1973).

Το πρότυπο των ζωνών που δημιουργείται επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους αλλά και της ποσότητας των τμημάτων, μετά από σύγκρισή τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους (DNA ladders).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα καθορίζεται από πολλές παραμέτρους. Περιοριστικός παράγοντας της ταχύτητας μετακίνησης των μορίων είναι το μέγεθος των μορίων της πηκτής. Συνδυαστικά, όσο μεγαλύτερα είναι τα μόρια τόσο πιο αργά μετακινούνται διαμέσου μικρών πόρων. Η συγκέντρωση της αгарόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης) που χρησιμοποιείται καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης από την ένταση του ρεύματος που παρέχεται, ή αλλιώς την τάση του ηλεκτρικού πεδίου (volts), με αποτέλεσμα να μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αгарόζης όσο αυξάνεται η τάση που εφαρμόζεται. Η κινητικότητα του DNA εξαρτάται και από τη στερεοδιάταξή του. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή, η ανοικτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα. Σημαντικό ρόλο παίζει και η παρουσία χρωστικών. Χαρακτηριστικά το βρωμιούχοαιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική ικανότητα γραμμικών μορίων κατά 15%. Τέλος, βασική παράμετρο αποτελεί η σύσταση και η ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Buffer). Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη με αποτέλεσμα το DNA να κινείται με αργό ρυθμό, ενώ υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε τήξη του πηκτώματος και καιαποδιάταξη του DNA.

Διαλύματα-Υλικά

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (TBE Buffer): τελικής συγκέντρωσης 0.5x, 5,4gr TrisBase, 2,75gr βορικό οξύ, 2ml EDTA 0,5M (pH 8.0)
- Διάλυμα Φόρτωσης Δειγμάτων (Loading Buffer): τελικού όγκου ¼ ως προς τον όγκο του δείγματος, 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόζης, 15% φικόλη- type 400, Pharmacia
- Βρωμιούχοαιθίδιο (EtBr): τελικής συγκέντρωσης 0,1 mg/ml
- Μάρτυρας (DNA Ladder)
- Δείγματα DNA

Μεθοδολογία

Για την παρασκευή 100ml πηκτώματος αгарόζης 1,2% και 1,5% με 0,5x TBE:

1. Ζυγίζουμε 1,2 και 1,5 γραγαρόζης.
2. Προσθέτουμε 100ml TBE 0,5x στην κωνική φιάλη που περιέχει την αгарόζη.
3. Ζυγίζουμε όλη την κωνική φιάλη με το περιεχόμενο.
4. Θερμαίνουμε την κωνική φιάλη με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να παρατηρήσουμε ότι η αгарόζη διαλύθηκε και το διάλυμα έγινε διαυγές.
5. Όταν διαλυθεί η αгарόζη, παγώνουμε τη φιάλη με τρεχούμενο νερό.
6. Ξαναζυγίζουμε την κωνική φιάλη και συμπληρώνουμε με νερό τη διαφορά.
7. Προσθέτουμε βρωμιούχοαιθίδιο και ανακινούμε.
8. Προσθέτουμε το διάλυμα αгарόζης στις ειδικές βάσεις ηλεκτροφορητικής συσκευής (μήτρα πολυμερισμού), αφού πρώτα έχουμε τοποθετήσει τα ειδικά χτενάκια (το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα, «πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης»).
9. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, ετοιμάζουμε τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση.

Σημειώσεις

- Τα προϊόντα των PCR PGMY09/11-HMBO1 και MY09/11 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα 1,2%, ενώ τα προϊόντα της nested PCR GP5+/6+ σε πήκτωμα 1,5%.
- Οι Ladders που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο #331 για τις PCR PGMY09/11-HMBO1 και MY09/11 και ο #3233G για τη nested PCR GP5+/6+.

-Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης - Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Μεθοδολογία

1. Αφαιρούμε το ειδικό χτενάκι και τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθέτουμε διάλυμα TBE 0,5x (ίδια συγκέντρωση με αυτή που περιέχει το TBE του πήκτωματος) μέχρις ότου καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα.
3. Προσθέτουμε στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης (1/4) και αναδεύουμε με την πιπέτα.
4. Μεταφέρουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια, ενώ σε ένα πηγαδάκι προσθέτουμε 2μl μάρτυρα (DNALadder), προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους του DNA.
5. Ξεκινούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ρυθμίζοντας την τάση στα 95-100V.
6. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά από 20-30 λεπτά.
7. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε είναι πλέον ορατό το πρότυπο ζωνών του DNA που έχει προκύψει από το διαχωρισμό.

Σημειώσεις

- Από τα προϊόντα των PCR PGMY09/11-HMBO1 και MY09/11 ηλεκτροφορούνται 10-12μl, ενώ από τα προϊόντα της nested PCR GP5+/6+ ηλεκτροφορούνται 15-20μl.

2.6 Κλωνοποίηση σε Πλασμιδιακούς Φορείς

i. Μοριακή Κλωνοποίηση

Ένα γονιδίωμα μπορεί να περιέχει από λίγα μέχρι δεκάδες χιλιάδες γονίδια. Αν θέλουμε να μελετήσουμε ένα γονίδιο ή οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία, που έχουμε ήδη απομονώσει με άλλες διαδικασίες (βλ. Χειρισμοί ΓενωμικούDNA), την εισάγουμε σε έναν «εύχρηστο» φορέα, ώστε να μπορούμε να την αναπαράγουμε με σκοπό τη χρησιμοποίησή της σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μοριακή κλωνοποίηση.

ii. DNA που συμμετέχουν στην κλωνοποίηση

Το σημαντικότερο στην αντίδραση κλωνοποίησης είναι η σωστή σύνδεση του μορίου που μας ενδιαφέρει με τον φορέα.

- Μόριο DNA- ένθεμα: Χρησιμοποιούνται όλες οι αλληλουχίες HPV ιών που μας ενδιαφέρουν, έχουν ενισχυθεί με PCR και έχουν καθαριστεί με τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω.
- Φορέας: Χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pBluescriptII με άκρα θυμίνης. Ο φορέας αυτός χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ποικιλία θέσεων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για την κλωνοποίηση των ενθεμάτων και την παρουσία υποκινητών/εκκινητών T3 και T7 εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης. Γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την κλωνοποίηση μορίων DNA με σκοπό είτε την ανάλυση του προτύπου τμηματοποίησης τους από ενδονουκλεάσες περιορισμού, είτε τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους σύστασης με εκκινητές T3 και T7. Επιπλέον, η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται στην κωδικήπεριοχή του γονιδίου LacZ, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η επιλογή των ανασυνδυασμένωνβακτηριακών αποικιών, ανιχνεύοντας τη β-γαλακτοσιδάση (παρουσία X-gal) στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες.

iii. Αντίδραση Σύνδεσης Μορίων DNA (Ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης καθιστά δυνατή την κλωνοποίηση της αλληλουχίας ενός γονιδίου σε κατάλληλους φορείς, όπως τα πλασμίδια. Η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένουπλασμιδίου περιλαμβάνει στην πιο απλή της μορφή μία διαμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με ένα άκρο του ενθέματος. Συνοπτικά, ο φορέας και το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε επωάζονται παρουσία T4 λιγάσης (T4 ligase), η οποία συνδέει ελεύθερα άκρα όλων των ειδών (Sgaramella et al, 1972; Sgaramella et al, 1978).

Έπειτα, τοποθετούμε την κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου (Buffer T4 ligase) και ενέσιμου ύδατος, ώστε να συμπληρωθεί ο επιθυμητός τελικός όγκος.

Η αντίδραση επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των ιόντων, το είδος των άκρων του DNA, η σχετική συγκέντρωση των άκρων DNA και το μοριακό βάρος των τμημάτων.

Διαλύματα-Υλικά

- Ένθεμα (DNA)
- Φορέας (pBluescriptII)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα T4 λιγάσης (Buffer T4 ligase): αρχικής συγκέντρωσης 10x, τελικής 1x
- T4 λιγάση (T4 ligase): 5u/μl
- ddH₂O

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι προστίθενται 1.0μl φορέα pBluescriptII συγκέντρωσης 35ng/μl, 1.0μl Ρυθμιστικού Διαλύματος T4 λιγάσης, κατάλληλη ποσότητα ενθέματος, ddH₂O (μέχρι να συμπληρωθεί ο επιθυμητός τελικός όγκος) και 1.0μl T4 λιγάσης.

2. Το δείγμα αναδεύεται με πιπέτα και επωάζεται στους 22°C για 2,5 ώρες.

3. Μετά το τέλος της επώασης, οι αντιδράσεις διατηρούνται στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό βακτηρίων.

- Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται, εξαρτάται από τον τύπο του πλασμιδίου και υπολογίζεται σε ng από τον κάτωθι τύπο

$$\text{Ποσότητα ενθέματος (ng)} = \left[\text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \frac{\text{μέγεθος ενθέματος (bp)}}{\text{μέγεθος φορέα (bp)}} \right] \times 5/1$$

Αντίδραση Σύνδεσης

DNA (10 ng/μl- 10ng)	1.0μl
Φορέας (35ng/μl- 35ng)	1.0μl
Buffer T4 λιγάσης (10x- 1x)	1.0 μl
T4 λιγάση (5u/μl- 5u)	1.0 μl
ddH₂O	6.0 μl
Τελικός	10.0 μl

Σημειώσεις

- Το ένζυμο απενεργοποιείται είτε με θέρμανση στους 65° C για 15 λεπτά, είτε ψύχεται στους -20° C.
- Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA, όσο και τα πλασμιδια έχουν την τάση επανακυκλοποίησης προς το σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη κατάλληλης αναλογίας ενθέματος/φορέα.
- Η αναλογία φορέα/ενθέματος μπορεί να φτάσει από 3/1 μέχρι 8/1.

iv. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η ανάπτυξη των τεχνικών εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε κοινούς εργαστηριακούς οργανισμούς, όπως τα βακτήρια *E.coli*, επέτρεψε την αποτελεσματική κλωνοποίηση. Χωρίς την εισαγωγή τους σε βακτήρια, τα μόρια DNA που έχουν σχηματιστεί *in vitro* με DNA λιγάση, θα καταστρέφονταν μέσα σε λίγες ώρες. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μία χημική μέθοδος που εξελίχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 80 (Wirth, 1989). Η μέθοδος αυτή πρωτοαναπτύχθηκε για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Σήμερα χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό διαφόρων ειδών βακτηριακών κυττάρων με αποδόσεις που κυμαίνονται από 10^9 - 10^{10} αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων/ μg DNA. Βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου για ελάχιστο χρόνο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδατικών μονοπατιών (στιγμιαίο σχηματισμό πόρων) στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα της μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων, από όπου είναι δυνατή η είσοδος εξωγενούς DNA εντός του κυττάρου (Prausnitz, 1995). Οι αλλαγές στη μεμβράνη μπορεί να είναι αντιστρεπτές ή μη, ανάλογα με το μέγεθος και τη διάρκεια του παλμού (Prausnitz, 1995). Το εξωγενές DNA ενυπάρχει μετά την εισαγωγή ως εξωχρωματικό γενετικό υλικό (στις περισσότερες περιπτώσεις) ή ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό (πιο σπάνια). Κατά την δεύτερη περίπτωση, μεταβιβάζεται από γενιά σε γενιά.

Διαλύματα-Υλικά

- Δεκτικά κύτταρα: DH5a (supE44, ΔlacU169), hDR17, recA1, endA1, gyrA96, th-1, relA1
- Πλασμίδια
- Στερεό Θρεπτικό Υλικό LB agar: 10gr Bactrotryptone, 5gr Bacto-yeastextract, 15gr Arg και 5gr NaCl ανά λίτρο.
- Υγρό Θρεπτικό Υλικό L- Broth
- LB-αμπικιλίνης: αποστειρώνεται LB-agar και όταν η θερμοκρασία πέσει στους 55°C προστίθεται 1 ml για κάθε 1 ml LB-agar.
- Θερμικό υλικό SOC: 20gr tryptone, 5gr yeastextract, 0,5gr NaCl, 20ml glycose 1M ανά λίτρο.
- X-gal: 20mg/ml
- IPTG: 200mg/ml
- Γλυκερόλη 10%

-Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Μεθοδολογία

1. Υγρό θρεπτικό μέσο L-Broth (1ml) ενοφθαλμίζεται με βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους DH5a της *E.coli* από stock γλυκερόλης (-80°C) και επωάζεται στους 37°C στις 210 rpm.
2. Μετά το τέλος της επώασης η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο L-Broth (100ml) και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση, έως ότου η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm παρουσιάσει τιμή 0,4- 0,5 μονάδες. Το L-Broth περιέχει 15gr L-Broth και 5gr NaCl ανά λίτρο και πάντα αποστειρώνεται πριν τη χρήση.
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 2 σωλήνες τύπου falcon και ψύχεται σε πάγο για 10 λεπτά.
4. Τα falcons φυγοκεντρώνονται σε 4000 στροφές, στους 4°C , για 15 λεπτά.
5. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται με ήπια ανακίνηση σε 50ml παγωμένο ddH₂O.
6. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται με ήπια ανακίνηση σε 500ml παγωμένο ddH₂O.
7. Πραγματοποιείται πάλι φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται στο υγρό που απέμεινε.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, το υπεκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4ml/ falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4000 στροφές, στους 4°C , για 10 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε γλυκερόλη 10% (250ml/ falcon) και μοιράζονται σε κλάσματα (40ml) σε παγωμένα σωληνάκια. Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C .

-Τιτλοδότηση δεκτικών κυττάρων

Μεθοδολογία

1. Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων (40μl) με 2 μl φορέα συγκέντρωσης 35ng/μl.
2. Προσθήκη 500μl διαλύματος SOC.
3. Αραίωση του διαλύματος 1/100. Σε 2μl, 4μl και 8μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, προστίθενται 198μl, 196μl, 192μl (τελικός όγκος 200μl), X-gal (30μl από stock 20 mg/ml) και IPTG (3μl από stock 200 mg/ml).
4. Επιστρώνονται σε τρυβλία και επωάζονται στους 37° C για 16 ώρες.

Σημείωση:

- Μετά την επώαση καταμετρούνται οι αποικίες και ανάγονται σε μονάδες pfu/μg .

-Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Μεθοδολογία

1. Κλάσματα (40μl) παρασκευασμένων για ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων E. coli τήκονται από τους -80° C στον πάγο.
2. Στα δεκτικά κύτταρα προστίθενται 2μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από το 1/10 της αντίδρασης σύνδεσης (συγκέντρωση περίπου 1ng/μl).
3. Επωάζονται στον πάγο για 1 λεπτό.
4. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλη παγωμένη κυβέττα, η οποία τοποθετείται στη θέση υποδοχής της συσκευής και ακολουθεί η ηλεκτροδιάτρηση.
5. Αμέσως προστίθενται 500μl θρεπτικού υλικού SOC (κλείνει τους πόρους στην κυτταρική μεμβράνη) και όλο το μίγμα μεταφέρεται σε σωλήνα καλλιέργειας.
6. Ακολουθεί επώαση στους 37° C σε 180rpm για 60 λεπτά.
7. Η επιθυμητή ποσότητα (150μl) επιστρώνεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri LB- agar- αμπικιλίνης [προσθέτοντας X-gal(30μl από stock 20mg/ml) και IPTG (3μl από stock 200mg/ml) όπου χρειάζεται] και αφήνονται μέχρι να απορροφηθεί το υγρό.
8. Στη συνέχεια επωάζονται στους 37° C για περίπου 16 ώρες.

v. Διάκριση ανασυνδυασμένων- μη ανασυνδυασμένων κυττάρων

Η διάκριση των ανασυνδυασμένων κλώνων βασίζεται σε 2 σημεία επιλογής. Το πρώτο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμιδίο (ανεξάρτητα αν περιέχει το ένθεμα) και το δεύτερο είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν.

Το πρώτο σημείο επιλογής οφείλεται στην παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Η αμπικιλίνη προκαλεί το θάνατο των δεκτικών κυττάρων. Εάν όμως τα κύτταρα έχουν προσλάβει τον τροποποιημένο φορέα που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, τα κύτταρα επιβιώνουν.

Το δεύτερο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των αποικιών με βάση το χρώμα. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο γονίδιο β- γαλακτοσιδάσης που υπό φυσιολογικές συνθήκες υδρολύει τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Το ένζυμο αυτό επίσης υδρολύει τη χημική ουσία X-gal (ανάλογο της γαλακτόζης) παράγοντας μια αδιάλυτη μπλε χρωστική. Στο φορέα η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται μέσα σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης και ονομάζεται lacZ+. Ο φορέας μεταφέρεται σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος στο χρωμόσωμα του οποίου κωδικοποιείται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, από όπου απουσιάζουν κάποιες αλληλουχίες που κωδικοποιούν το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου. Έτσι, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που παράγονται από το μεταλλαγμένο γονίδιο και την lacZ+ συνδυάζονται και προκύπτει το ενεργό ένζυμο. Συνεπώς, οι αποικίες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση αποκτούν μπλε χρώμα, όταν στην καλλιέργεια προστεθεί X-gal και IPTG (επαγωγέας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης). Αντιθέτως, οι βακτηριακές αποικίες που

περιέχουν ανασυνδυασμένους φορείς παραμένουν άχρωμες, καθώς η ένθεση του τμήματος DNA στο lacZ⁺ προκαλεί την αδρανοποίησή του (Watson, 2007).

Μεθοδολογία

1. Τρυβλία petri επιστρωμένα με ανασυνδυασμένα κύτταρα που έχουν επωαστεί για 16 ώρες, τοποθετούνται στους 4°C, για 4 ώρες, ώστε να γίνει πιο ευδιάκριτο το χρώμα των αποικιών.
2. Ενοφθαλμιζονται σωλήνες καλλιέργειας που περιέχουν 3 ml LB- αμπικιλίνης με λευκές αποικίες.
3. Οι σωλήνες επιάζονται στους 37°C σε 210 rpm για 12 ώρες.

-Δημιουργία stock γλυκερόλης

Μεθοδολογία

1. Προστίθενται σε σωληνάκι 0,85 ml από την πολλαπλασιασμένη υγρή καλλιέργεια ανασυνδυασμένων βακτηρίων και 0,15 ml γλυκερόλης.
2. Γίνεται ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C.

vi. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με Mini-PrePs

Είναι μία γρήγορη μέθοδος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, που ανακαλύφθηκε από τους Birnboim και Doly (Birnboimetal, 1979). Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να απομονώσουμε αρκετό πλασμιδιακό DNA από πολύ μικρούς όγκους καλλιέργειας. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να απομονωθεί το ανασυνδυασμένο DNA από υγρή καλλιέργεια με αλκαλική λύση. Συνίσταται στη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, τη μερική καταστροφή και απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος και στη συνέχεια τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA ύστερα από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η μέθοδος βασίζεται σε τρία διαλύματα: το Διάλυμα I (GET), το Διάλυμα II (alkali) και το Διάλυμα III.

Τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Ακολουθεί, αναδιάλυση με το Διάλυμα I. Το Διάλυμα I αποτελείται από Tris που ρυθμίζει το pH, EDTA που αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη και παρεμποδίζει τη δράση των νουκλεασών και γλυκόζη που διατηρεί την οσμωτικότητα.

Επόμενο στάδιο είναι η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται με το Διάλυμα II που περιέχει SDS για τη διαλυτοποίηση των πεπτιδίων και φωσφολιπιδίων και NaOH για την καταστροφή των δεσμών δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών.

Η εξουδετέρωση της αντίδρασης λύσης πραγματοποιείται με προσθήκη του Διαλύματος III. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο Διάλυμα III προκαλεί κατακρήμνιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των υπολειμμάτων του κυττάρου, ενώ η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να συλλεχθεί μέσω κατακρήμνισης με αιθανόλη.

Το πλασμιδιακό DNA απαλλάσσεται από το βακτηριακό RNA με αναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer RNAaseA) το οποίο περιέχει RNAase A.

Διαλύματα-Υλικά

- Διάλυμα I (GET): 50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0).
- Διάλυμα II (alkali): 0.2N NaOH, 1% SDS.
- Διάλυμα III: 60ml 5M potassium acetate (CH₃COOK), 11,5ml glacial acetic acid, 28,5ml ddH₂O.
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer TE- RNAase): 0,5mM EDTA, 2mM Tris- HCl (pH 7.5).
- TE- RNAase (TE- RNAase): τελικής συγκέντρωσης 20μg/ml.

Μεθοδολογία

1. Αναδεύουμε ήπια την υγρή καλλιέργεια.
2. Προσθέτουμε 1,5ml κορεσμένης καλλιέργειας σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
3. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά σε 3000 στροφές. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό, ώστε να κολλήσει καλύτερα το ίζημα.
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και εισαγωγή 100 μl Διαλύματος I. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Οι σωλήνες τοποθετούνται στον πάγο και εισάγονται 200μl Διαλύματος II. Ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 3-5 λεπτά στον πάγο.
6. Εισάγονται 150μl παγωμένου Διαλύματος III, ενώ οι σωλήνες βρίσκονται στον πάγο. Ανακινούμε δυνατά και επωάζουμε για 8-10 λεπτά στον πάγο.
7. Φυγοκεντρούμε για 7 λεπτά σε μέγιστες στροφές.
8. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα.
9. Κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 50μl Ρυθμιστικό Διάλυμα RNAασης A.
10. Καθαρισμός με φαινόλη/ χλωροφόρμιο.
11. Κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 50μl ddH₂O.

2.7. Αλληλούχηση και ταυτοποίηση με προγράμματα Βιοπληροφορικής

Η ανίχνευση των ιών HPVs θα ήταν τελείως ανούσια αν δε μπορούσε να γίνει η αλληλούχηση και η ταυτοποίηση των στελεχών. Σε αυτό έχει βοηθήσει πολύ η Βιοπληροφορική με τα προγράμματα και τις βάσεις δεδομένων που υπάρχουν στο διαδίκτυο.

Την τελευταία δεκαετία η τεχνολογική εξέλιξη βοήθησε στη διεκπεραίωση μεγάλου όγκου πειραματικής εργασίας, η οποία σε συνάρτηση με τον διαρκή προσδιορισμό γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών αύξησε τον όγκο της πληροφορίας στο επίπεδο της ακολουθίας και όχι μόνο, σε δυσθεώρητα μεγέθη. Οι βάσεις πλέον δεν περιέχουν απλώς πολλά δεδομένα αλλά και η διαδικασία ανανέωσης τους είναι απαραίτητα καθημερινή υπόθεση. Πλέον η συντήρηση μιας βάσης απαιτεί ένα πολυάριθμο επιτελείο επιστημόνων οι οποίοι ασχολούνται αποκλειστικά με το σχολιασμό (annotation) των νεοεισερχόμενων δεδομένων καθώς και με τη διόρθωση λαθών των ήδη υπαρχόντων. Η πρόσβαση στις βάσεις αυτές είναι πλέον εύκολη μέσω της χρήσης του διαδικτύου. Ο χρήστης μπορεί να επισκεφτεί την ιστοσελίδα που διατηρείται από τους υπευθύνους της βάσης και να κάνει αναζητήσεις αποθηκεύοντας στον υπολογιστή του δεδομένα του άμεσου ενδιαφέροντός του. Παράλληλα έχουν δημιουργηθεί και μια σειρά από βάσεις που αποσκοπούν στην ταξινόμηση της πληροφορίας στο επίπεδο της ακολουθίας και της δομής προκειμένου να οργανωθεί η πληροφορία και να εξαχθούν συμπεράσματα για την βιολογική τους σημασία.

-Βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αποτελούν τις μεγαλύτερες βάσεις στο ευρύτερο πεδίο της Βιολογίας τόσο από άποψη του όγκου της πληροφορίας που περιέχουν όσο και από την άποψη του εκθετικού ρυθμού συσσώρευσης δεδομένων που εμφανίζουν. Τα τελευταία χρόνια λόγω της εξέλιξης της τεχνολογίας στην εύρεση της αλληλουχίας (sequencing) πολυνουκλεοτιδίων έγινε εφικτός σε μικρό χρονικό διάστημα, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρων γονιδιωμάτων αρκετών οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Σε αρκετές περιπτώσεις μάλιστα υπάρχουν εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων που περιέχουν τις αλληλουχίες για ένα και μόνο οργανισμό.

Εδώ πρέπει να σημειώσουμε τις τρεις μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι ελεύθερα διαθέσιμες στην ακαδημαϊκή κοινότητα. Πρόκειται για τις GENBANK (NCBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) και EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI) οι οποίες σε συνεργασία έχουν δημιουργήσει την International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Η συνεργασία μεταξύ των βάσεων περιλαμβάνει την ανταλλαγή σε καθημερινή βάση εγγραφών που κατατίθενται ανεξάρτητα σε κάθε βάση δεδομένων έχοντας θέσει παράλληλα και κοινούς κανόνες για την ταξινόμηση και το σχολιασμό των δεδομένων.

GENBANK: Η GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) αποτελεί μια βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι ελεύθερα διαθέσιμη στην επιστημονική κοινότητα. Βρίσκεται υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α. Η κύρια πηγή της πληροφορίας που περιέχεται στην GENBANK προέρχεται από απευθείας υποβολές δεδομένων όπως προκύπτουν από πειραματικές διεργασίες διαφόρων ερευνητικών ομάδων. Τα νεοεισερχόμενα δεδομένα υφίστανται επεξεργασία και προστίθενται σχόλια (annotation) για την διευκόλυνση των ερευνητών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα ήδη κατατεθειμένα δεδομένα επανεξετάζονται και γίνονται διορθώσεις αν προκύπτουν νέα δεδομένα σχετικά με τις εγγραφές. Η διαδικασία κατάθεσης των δεδομένων μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ γρήγορα μέσω του Διαδικτύου με την συμπλήρωση κατάλληλης φόρμας και στη συνέχεια οι υπεύθυνοι της βάσης αναλαμβάνουν το σχολιασμό της εγγραφής και τη δημοσιοποίηση της στην βάση

EMBL-Bank: Η EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) αποτελεί τη μεγαλύτερη βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην Ευρώπη και βρίσκεται υπό την αιγίδα του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL). Εδράζεται και συντηρείται στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) στο Cambridge, UK. Τα δεδομένα προέρχονται από ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια καθώς και από ομάδες που ασχολούνται με τον προσδιορισμό των γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών. Η κατάθεση ακολουθιών στην EMBL-Bank είναι μια διαδικασία απλή και πραγματοποιείται μέσω του Διαδικτύου κατ' αντίστοιχο τρόπο με αυτό της GENBANK. Στη συνέχεια οι νεοεισερχόμενες ακολουθίες υφίστανται επεξεργασία και σχολιασμό από τους υπευθύνους της βάσης προτού γίνουν διαθέσιμες στην επιστημονική κοινότητα. Επιπλέον μέσω του Διαδικτύου παρέχονται μια σειρά από εργαλεία ανάλυσης ακολουθιών (π.χ. Fasta, BLAST).

DDJB: Η DNA Databank of Japan (- <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) ιδρύθηκε το 1986 στο Εθνικό Ινστιτούτο Γενετικής (NIG) το οποίο βρίσκεται υπό την αιγίδα του Υπουργείου Παιδείας, Επιστημών και Αθλητισμού της Ιαπωνίας. Αποτελεί τη μοναδική διεθνώς αναγνωρισμένη βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην Ιαπωνία ενώ η κύρια πηγή δεδομένων της είναι οι εργασίες Ιαπώνων ερευνητών. Επιπλέον παρέχονται μια σειρά από εργαλεία για την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

-Ολοκληρωμένα συστήματα ανάκτησης πληροφοριών από βάσεις δεδομένων

SRS: Το SRS είναι ένα ισχυρό, εύχρηστο σύστημα διαχείρισης δεδομένων το οποίο διατίθεται από την εταιρία LION Bioscience. Το SRS μέσω ενός φιλικού προς το χρήστη γραφικού περιβάλλοντος δίνει την δυνατότητα αναζήτησης και ανάκτησης δεδομένων από περισσότερες από 400 βάσεις δεδομένων οι οποίες μπορεί να είναι αποθηκευμένες στον ίδιο κεντρικό υπολογιστή. Το μεγάλο του πλεονέκτημα είναι ότι μπορείς να κάνεις ταυτόχρονη αναζήτηση για ένα ζήτημα άμεσου ενδιαφέροντος σε παραπάνω από μια βάσεις δεδομένων που δεν περιέχουν ανάλογο είδος πληροφορία και η μορφοποίηση των δεδομένων σε καθεμιά να είναι διαφορετική. Ένα άλλο μεγάλης σημασίας πλεονέκτημα είναι η ταχύτητα με την οποία εκτελούνται οι αναζητήσεις παρά το γεγονός ότι διαχειρίζεται πραγματικά τεράστιο όγκο πληροφορίας λόγω του μεγάλου αριθμού βάσεων που μπορεί να διαχειρίζεται ταυτόχρονα. Τέλος δίνεται η δυνατότητα στον κάτοχο του συστήματος να ενσωματώνει σε αυτό και βάσεις που έχει δημιουργήσει ο ίδιος ή προγράμματα για κάθε είδος υπολογιστική ανάλυση χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση του συστήματος.

Entrez: Το Entrez αποτελεί ένα σύστημα διαχείρισης για την αναζήτηση και ανάκτηση πληροφοριών ανάλογο του SRS όλων των βάσεων δεδομένων που περιέχονται στο NCBI (National Center for Biotechnology Information) των ΗΠΑ. Το Entrez δίνει τη δυνατότητα αναζήτησης σε βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών ακολουθιών, δομές βιομορίων, γονιδιωμάτων και στη βάση για την αναζήτηση βιβλιογραφίας MEDLINE μέσω του ίδιου γραφικού περιβάλλοντος επιτρέποντας και πιο πολύπλοκες αναζητήσεις ανάμεσα στα στοιχεία τους. Βέβαια το γεγονός ότι περιορίζεται μόνο στις βάσεις δεδομένων του NCBI και ότι δεν επιτρέπει πολύπλοκες αναζητήσεις το καθιστούν υποδεέστερο έναντι του SRS.

Όσα θετικά δείγματα ανιχνεύθηκαν με τις PCR, απομονώθηκαν από το gel, καθαρίστηκαν με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω και αραιώθηκαν, ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 60-100 ng ανά 1000bp. Έπειτα στάλθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας για αλληλούχηση. Στη συνέχεια με προγράμματα Βιοπληροφορικής (GenBank, NCBI) ταυτοποιήθηκαν οι υπότυποι των HPV.

Όπως αναφέρθηκε, η ανίχνευση των ιών βασίστηκε στην καλά συντηρημένη L1 περιοχή. Παρακάτω παρουσιάζονται L1 περιοχές από κάποιους τύπους HPV από τη GENBANK και αναγράφονται κάποιοι HPVs των οποίων το γονιδίωμα υπάρχει ολόκληρο στην τράπεζα δεδομένων.

Human papillomavirus t. 16-L1 ORIGIN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/S60413.1>)

```
1 cgtaagctgt aagtattgta tgtatgttga attagtgttg tttgttgtt atatgtttgt
61 atgtgcttgt atgtgcttgt aatattacg ttgtatgtgt gtttgtatgt atggatatgt
121 aaacacgtgt gtatgtgttt ttaaagtctt gtgtaactat tgtgtcatgc aacataaata
181 aacttattgt ttcacacct actaattgtg ttgtggttat tcattgtata taaactatat
241 ttgtacatt ttgttttgt tttatatata ctatattttg tagcgcaccg gccattttgt
301 agctcaacc gaattcgggt tgcattgctt ttggcacaaa ctgtattttt taaatagtt
361 ctatgtcagc aactatagtt taaacttga cgtttcctgc ttgcatgcg tgccaaatcc
421 ctgttttctt gacctgcact gttgccaac cattccattg tttttacac tgcactatgt
481 gcaactactg aactactatg tacgttgtgt catataaaat aaattactat gcgccaacgc
541 cttaaatacc gctgttaggc acatattttt ggcttgtttt aactcaccta attgcatgtt
601 tggcataagg ttaaacttt taggccaact aatgtcacc ttagttcata catgaactgt
661 gtaaaggta gtcatacatt gttcatttgt aaaactgcac atgggtgtgt gcaaaccgtt
721 ttgggttaca catttacaag gaacttatat aataacta aactacaata attcatgtat
781 aaaactaagg gcgtaaccga aatcgggtga accgaaaccg gttagtataa aagcagacat
841 ttatgcacc aaaagagaac tgcaatgttt caggaccac agg
```

Human papillomavirus t. 59- L1 ORIGIN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U45930>)

```
1 gctcagggtt taaacaatgg tatatgttgg cacaatcaat tgttttaac agttgtagat
61 actactcgca gcaccaatct ttctgtgtgt gtttacta ctctctat tcctaatgta
121 tacacaccta ccagtttaa agaataatgcc agacatgtgg aggaatttga tttgcagttt
181 atatttcaac tgtgtaaaat aacattaact acagaggtaa tgcatacat tcataatag
241 aatacacta ttttgagga ttggaatttt ggtgttacac cacctctac tgctagtta
301 gttgacacat accgttttgt tcaatctgct gctgtaactt gtcaaaagga caccgcaccg
361 ccagttaaac aggacccta tgacaaacta aagttttgga ctgtagatct taaggaaagg
421 tttctgcag atcttgatca gtttctttg ggacg
```

Human papillomavirus t. 39-L1 ORIGIN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/u45903.1>)

```
1 gccagggtc ataataatgg tatatgttgg cataatcaat tatttctac tgttggac
61 actaccgta gtaccaactt tacattatct acctctatag agtcttccat accttaca
121 tatgatcctt ctaagtttaa ggaatatacc aggcacgtgg aggagtatga tttacaattt
181 atatttcaac tgtgtactgt aacattaaca actgatgta tgtcttatat tcacactatg
241 aattcctcta tattggaaa ttggaattct gctgtagctc ctccaccatc tgccagttg
301 gtagacactt acagatactt acagtctgca gccattacat gtcaaaagga tgctccagca
361 cctgaaaaga aagatccata tgacggctta aagttttgga atgttgactt acgggaaaag
421 tttagtttg aacttgatca gtatccctt ggacg
```

HPV type	L1 ORIGIN- NCBI
18	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ448211.1
33	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ448214.1
31	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ448212.1
56	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ007187.1
53	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ007181.1
66	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ007163.1
44	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF548858.1

HPV type	Complete genome- NCBI
4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001457.1
63	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001458.1
41	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001354.1
61	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U31793.1
16	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001526.2
48	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001690.1
50	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001691.1

Αποτελέσματα

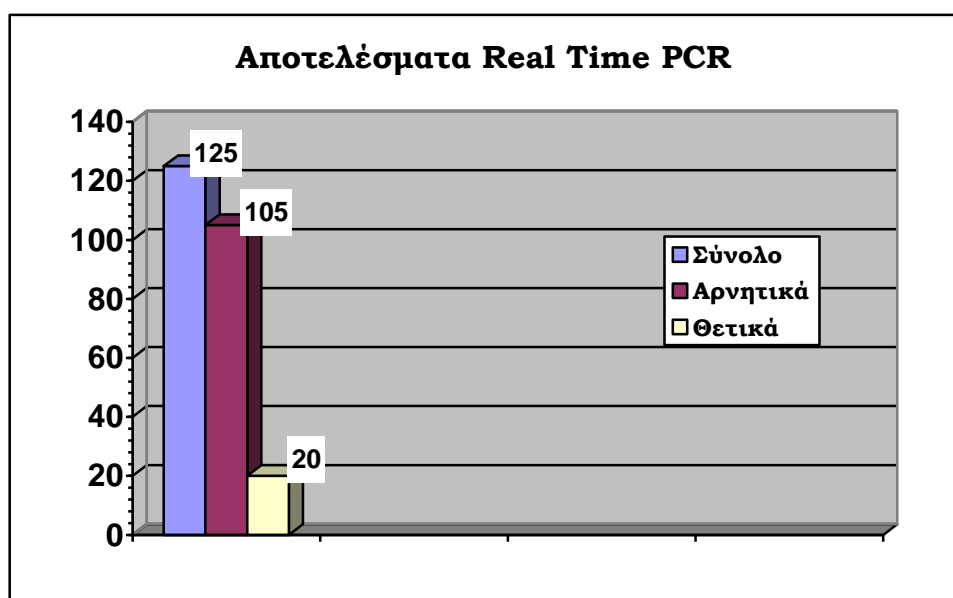
3.1. Αποτελέσματα Real- Time PCR

Τα δείγματα που έχουν καθαριστεί στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υποβλήθηκαν σε Real-Time PCR στο ίδιο εργαστήριο.

Στον πίνακα 3.1.i και στο Διάγραμμα 3.1.i παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων σε μόλυνση από HPVs.

Σύνολο Δειγμάτων	Θετικά (+)	Αρνητικά (-)
125	20	105

Πίνακας 3.1.i



Διάγραμμα 3.1.i

Στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας γίνεται νέα κωδικοποίηση (αρίθμηση) των δειγμάτων και καταγραφή των υποτύπων HPV, σύμφωνα με την Real-Time PCR που έχει διεξαχθεί (Πίνακας 3.1.ii, 3.1.iii).

Κωδικοποίηση των Δειγμάτων
#-α, #-β, #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #22, #49, 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11,12, 13, 14,, 114, 115

Πίνακας 3.1.ii.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-	Υπότυποι HPVs
#1	56, 59
#2	16
#3	31, 39
#4	56
#5	31, 51, 56
#6	16
#7	56
#49	51, 56
06	16
14	16, 56
15	31, 56
16	16, 51
25	56
29	34, 45, 48, 49
30	33, 39, 56
31	51
35	31
36	31, 39, 45, 51, 59
37	39, 45
86	56

Πίνακας 3.1.iii.

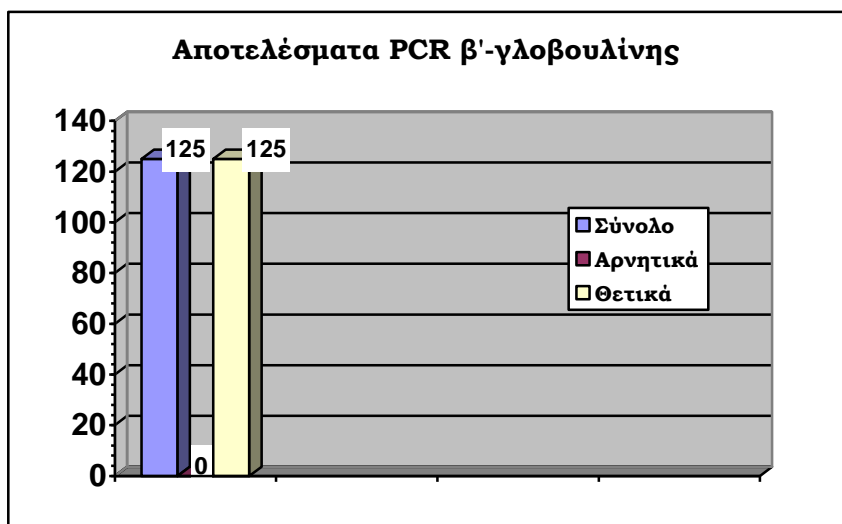
3.2. Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-γλοβουλίνης με εκκινητές GH₂O/PCO₄

Τα δείγματα στη συνέχεια στάλθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-γλοβουλίνης με εκκινητές GH₂O/PCO₄.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.2.i. και στο Διάγραμμα 3.2.i. όλα τα δείγματα βγήκαν θετικά, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία κυτταρικού DNA και ότι η διαδικασία απομόνωσης-καθαρισμού έχει πραγματοποιηθεί σωστά και δεν υπάρχουν αναστολείς της PCR.

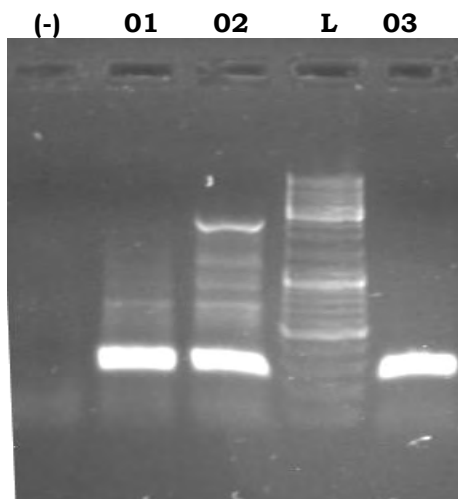
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	125	0

Πίνακας 3.2.i.



Διάγραμμα 3.2.i.

Στην εικόνα 3.2.i. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #331, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 268 bp.



Εικόνα 3.2.i

3.3. Αποτελέσματα PCR με εκκινητές PGMY09/11- HMB01

Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητές το ζεύγος PGMY09/11-HMB01 για να καθοριστεί η παρουσία του ιού HPV.

Στους πίνακες 3.3.i. και 3.3.ii παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν με τη συγκεκριμένη διαδικασία.

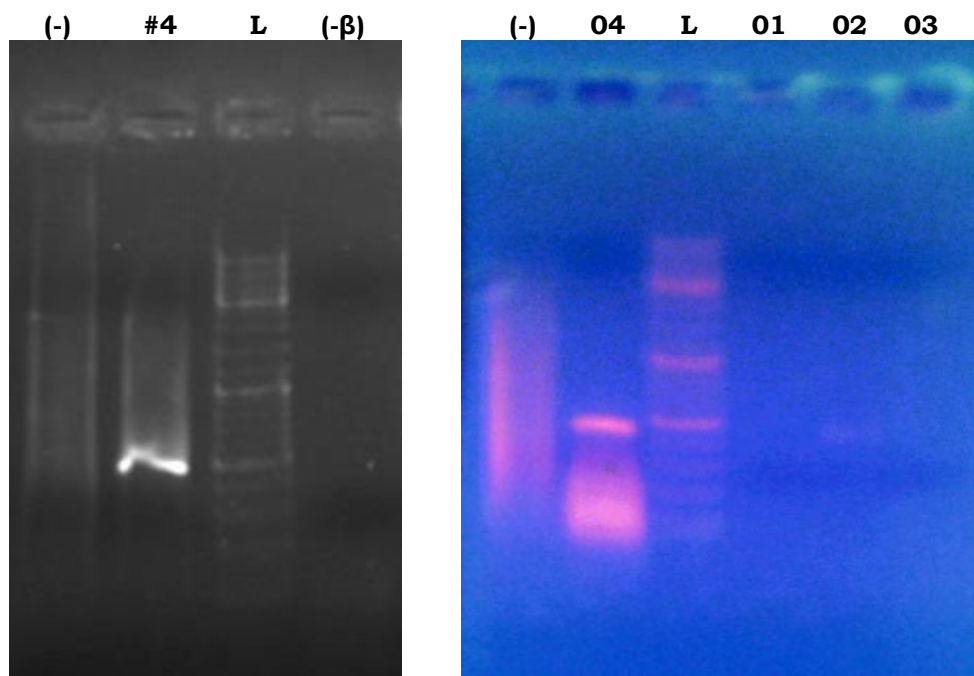
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	7	118

Πίνακας 3.3.i.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-
(-α), #4, #5, #7, #49, 04, 06

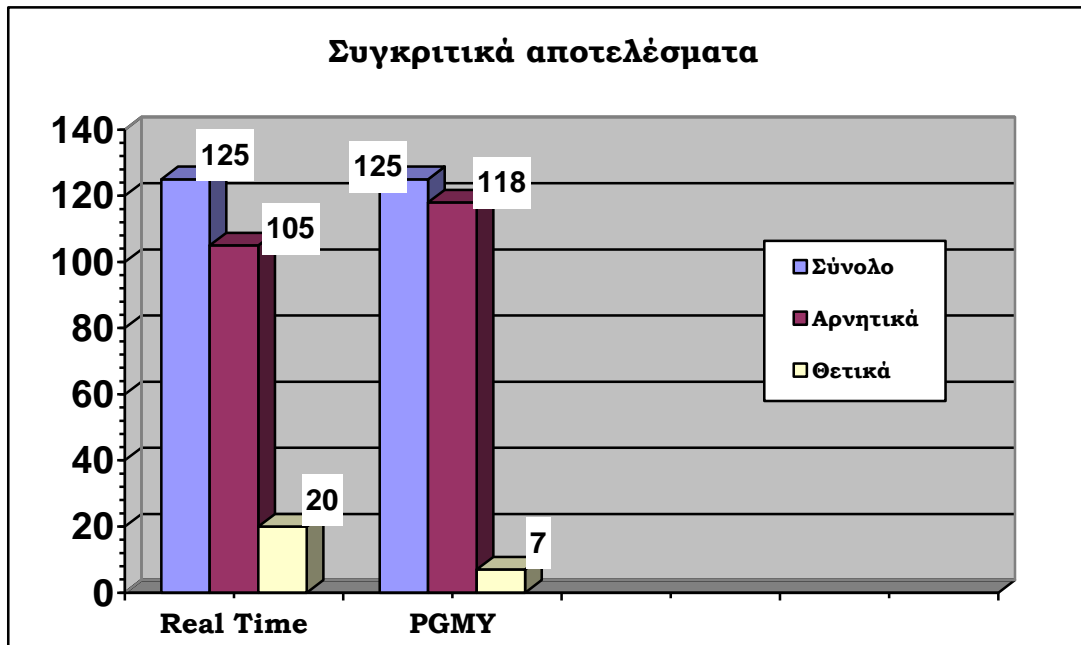
Πίνακας 3.3.ii.

Στην εικόνα 3.3.i. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #331, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 450 bp.



Εικόνα 3.3.i.

Στο Διάγραμμα 3.3.i. παρουσιάζεται η επιτυχία ανίχνευσης HPV της PCR με εκκινητές τους PGMY09/11-HMB01 σε σχέση με τη Real Time PCR.



Διάγραμμα 3.3.i.

Λόγω μόλυνσης δεν χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο HotStart Polymerase σε PGMY09/11-HMB01 PCR. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω δεδομένα η συγκεκριμένη PCR αδυνατεί να ανιχνεύσει τους ιούς, σύμφωνα με τη Real Time PCR.

3.4. Αποτελέσματα PCR με εκκινητές MY09/11

Ομοίως με την προηγούμενη περίπτωση, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητές το ζεύγος MY09/11 σε συνδυασμό με τον εκκινητή HMB01.

- **Bioline Taq Polymerase**

Στους πίνακες 3.4.i. και 3.4.ii. παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν με αυτή την PCR.

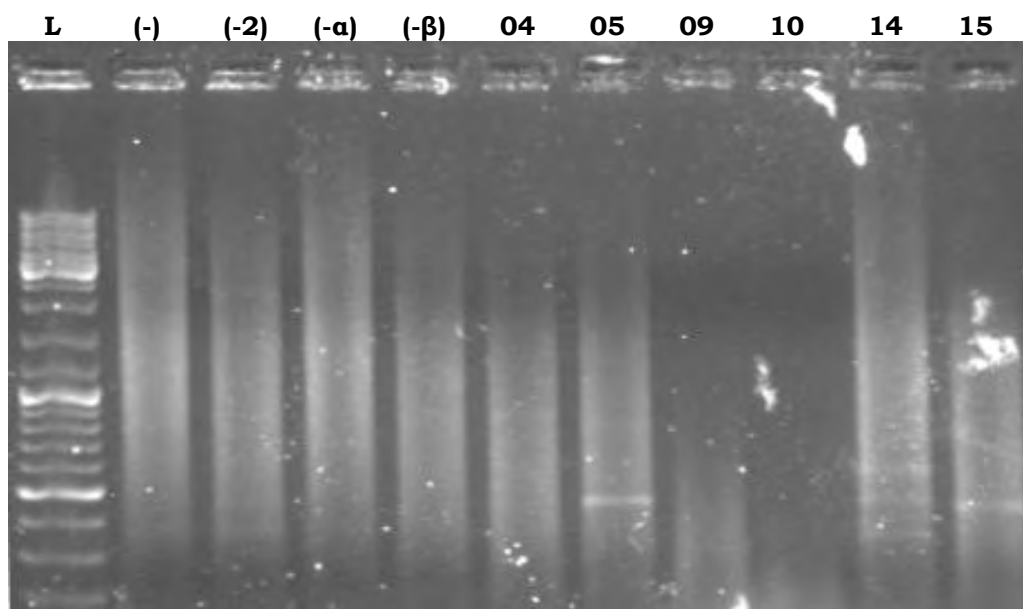
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	9	116

Πίνακας 3.4.i.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-
#1, #4, #5, #7, #49, 05, 06, 14, 15

Πίνακας 3.4.ii.

Στην εικόνα 3.4.i. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #331, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 450 bp.



Εικόνα 3.4.i.

- **HotStart Polymerase**

Στους πίνακες 3.4.iii. και 3.4.iv. παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν με αυτή την PCR.

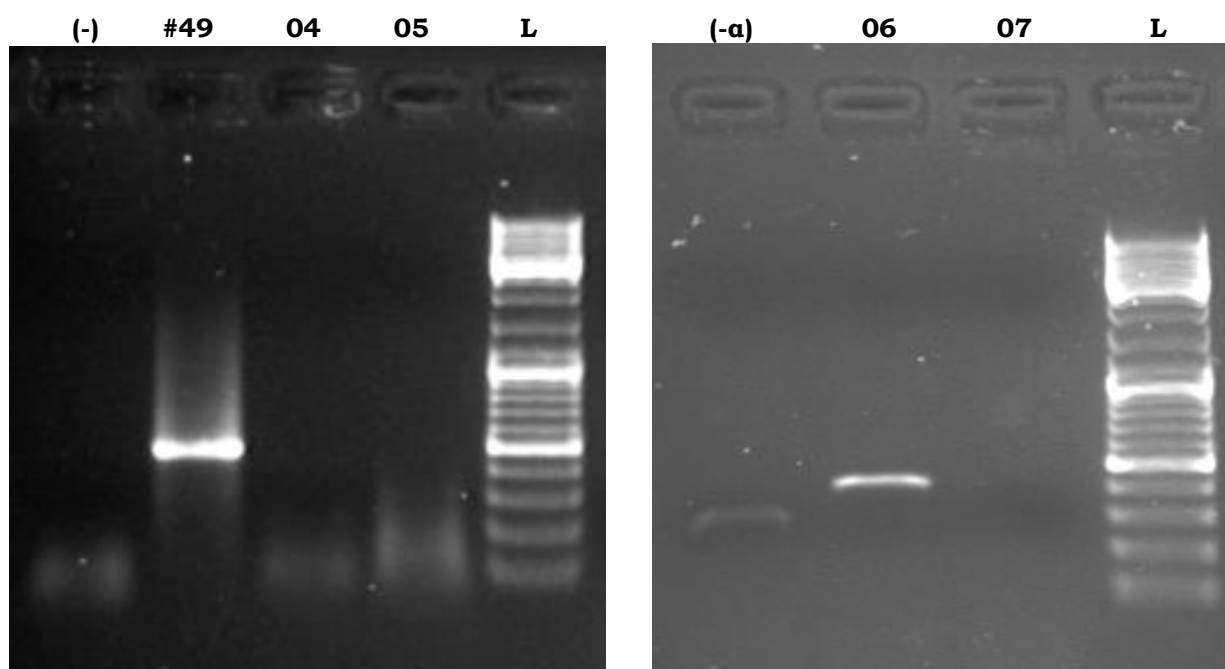
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	12	113

Πίνακας 3.4.iii.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-
#1, #2, #3, #4, #5, #7, #49, 06, 14, 15, 16, 25

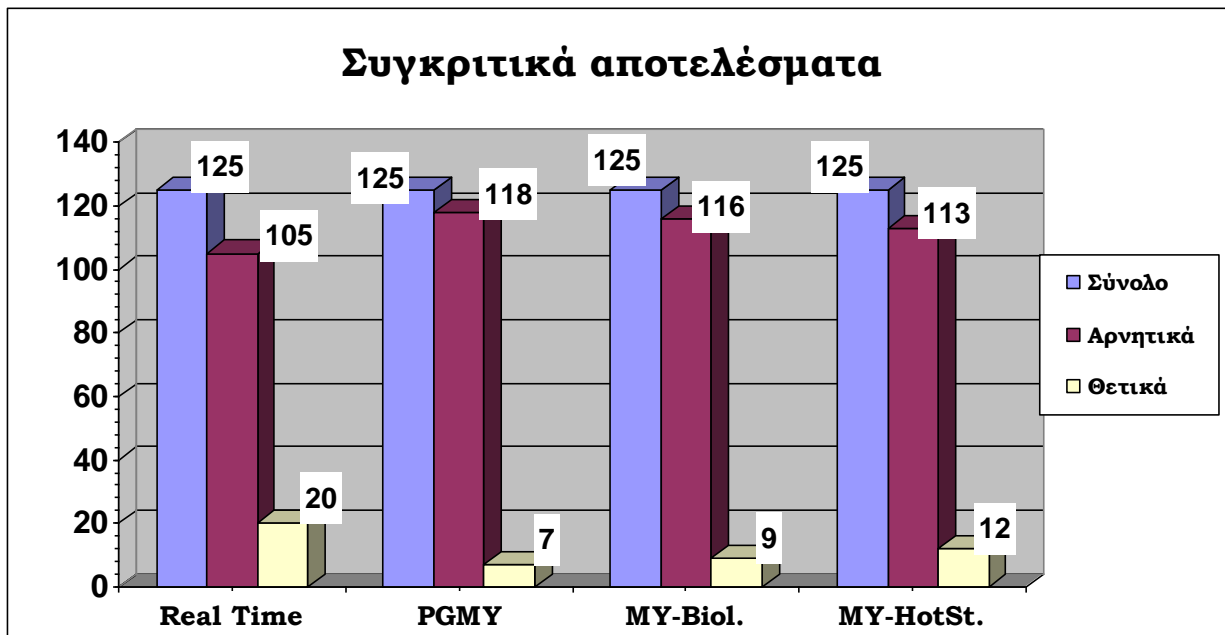
Πίνακας 3.4.iii.

Στην εικόνα 3.4.ii. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #331, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 450 bp.



Εικόνα 3.3.ii.

Στο Διάγραμμα 3.4.i. παρουσιάζεται η επιτυχία ανίχνευσης HPV των PCR με εκκινητές τους PGMY09/11-HMB01 και MY09/11-HMB01 με τα 2 ένζυμα, σε σχέση με τη Real Time PCR.



Διάγραμμα 3.4.i.

Όπως παρουσιάζεται στους παραπάνω πίνακες και στο συγκριτικό διάγραμμα, η MY09/11-HMB01 PCR έχει μεγαλύτερη επιτυχία ως προς την ανίχνευση των ιών με το ένζυμο HotStart Polymerase.

3.5. Αποτελέσματα Nested PCR με εκκινητές GP5+/6+

Στα προϊόντα των 2 προηγούμενων PCRs, εφαρμόστηκε μία Nested PCR με εκκινητές τους GP5+/6+ των οποίων το προϊόν ενίσχυσης έχει μέγεθος 150 bp.

- **Bioline Taq Polymerase**

Στους πίνακες 3.5.i. και 3.5.ii. παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν.

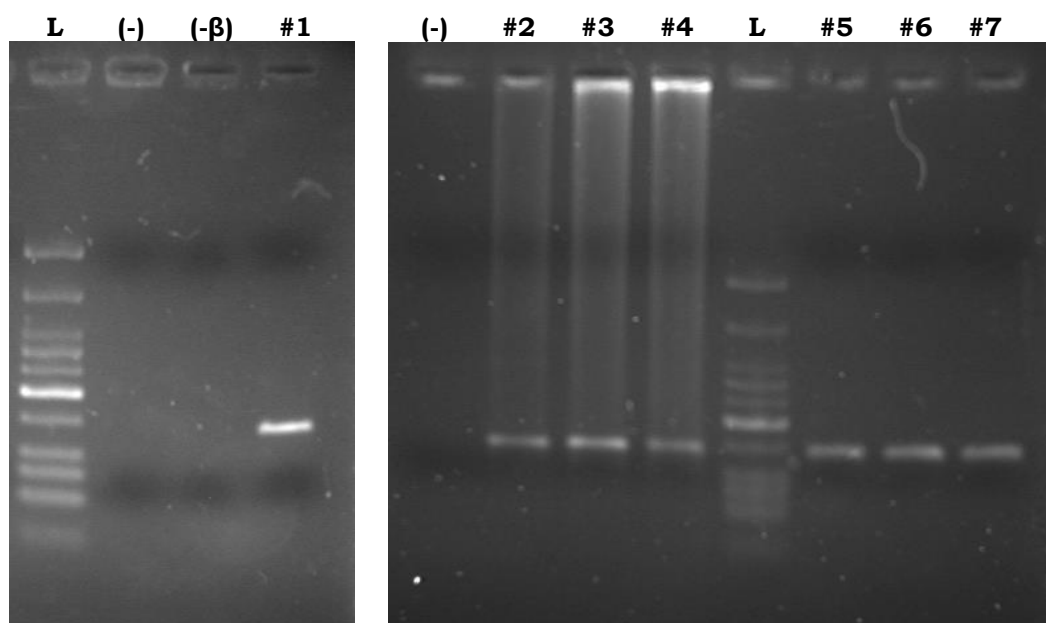
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	16	109

Πίνακας 3.5.i.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-
#1,#2, #3, #4, #5, #6, #7, #49, 06, 14,15, 16, 25,29,30,31

Πίνακας 3.5.ii.

Στην εικόνα 3.5.i. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #3233G, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 150 bp.



Εικόνα 3.5.i.

- **HotStart Polymerase**

Στους πίνακες 3.5.iii. και 3.5.iv. παρουσιάζεται ο αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν με αυτή την PCR.

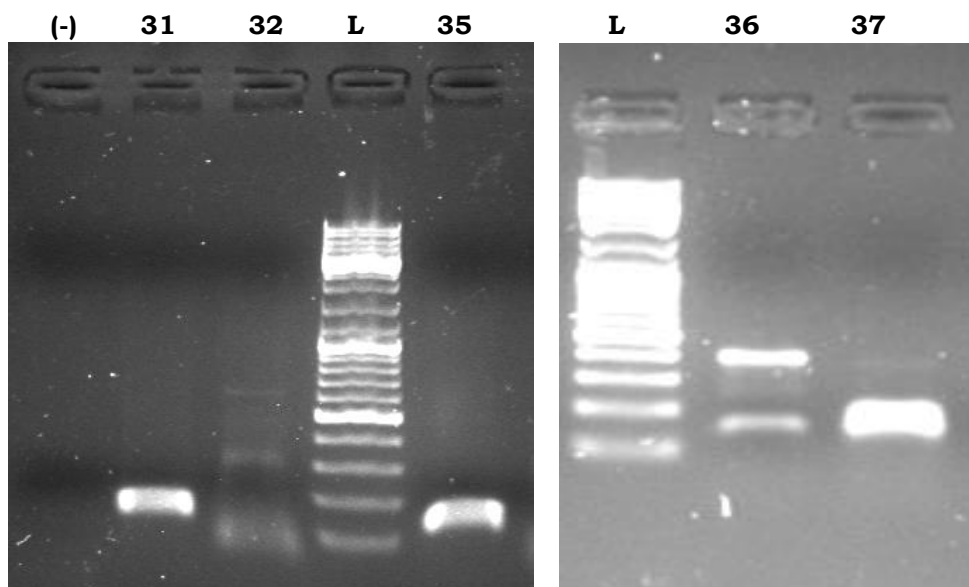
Σύνολο Δειγμάτων	Σύνολο Θετικών	Σύνολο Αρνητικών
125	19	106

Πίνακας 3.5.iii.

Θετικά Δείγματα -Νούμερα-
#1,#2, #3, #4, #5, #6, #7, #49, 06, 14,15, 16, 25,29,30,31,35,36,37

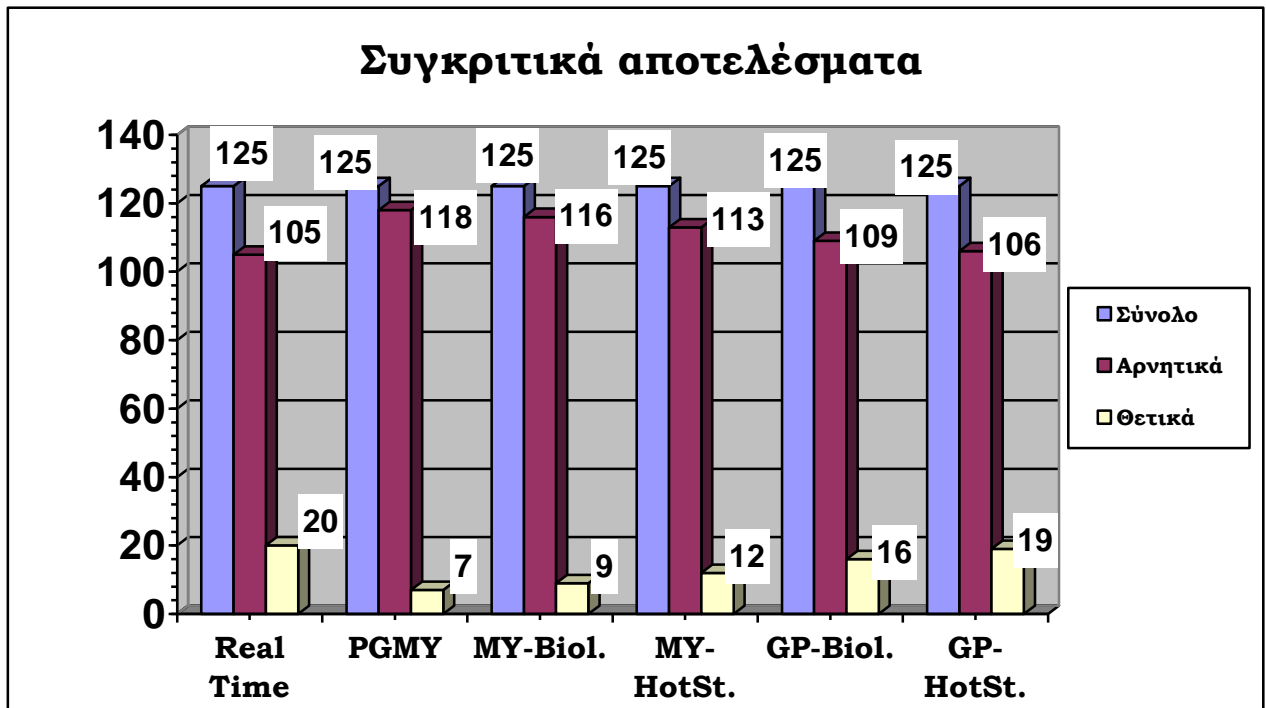
Πίνακας 3.5.iv.

Στην εικόνα 3.5.ii. παρουσιάζονται κάποια από τα θετικά δείγματα. Σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, Ladder #331, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση του τμήματος των 150 bp.



Εικόνα 3.5.ii.

Στο Διάγραμμα 3.5.i. παρουσιάζεται η επιτυχία ανίχνευσης HPV των PCR με εκκνητές τους PGMY09/11-HMB01, MY09/11-HMB01 και GP5+/6+ με τα 2 ένζυμα σε σχέση με τη Real Time PCR.



Διάγραμμα 3.5.i.

3.6. Αποτελέσματα Κλωνοποίησης

Τα επιθυμητά προϊόντα ενίσχυσης μετά από nested PCR, ηλεκτροφορήθηκαν ξανά, ανακλήθηκαν από το πήκτωμα αгарόζης και απομονώθηκαν. Οι ζώνες κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pBluescript II, ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, με σκοπό να αλληλουχιθούν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο PvuII, για να επιβεβαιωθεί πως τα πλασμίδια φέρουν το ένθεμα. Ο φορέας έχει μέγεθος 3000 bp και 2 θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν έχει ενσωματώσει το ένθεμα, αναμένονται 2 μπάντες: μία των 2500 bp και μία των 500 bp. Αντίθετα, εάν έχει ενσωματώσει το ένθεμα, οι αναμενόμενες ζώνες θα είναι: μία των 2500 bp και μία των 500 bp προσαυξημένη κατά το μέγεθος (500 bp + 150 bp= 650 bp) του ενθέματος.

Συζήτηση

Οι ιοί HPVς προσβάλλουν κύτταρα του επιθηλίου και του βλεννογόννου και κατατάσσονται σε high και low risk τύπους, ανάλογα με την ογκογενετική τους ικανότητα να προκαλούν υπερπλαστικές και ογκόμορφες αλλοιώσεις του δέρματος και του τραχήλου, κονδυλώματα, αναπνευστική παπιλωμάτωση και καρκίνους του τραχήλου και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Έχουν βρεθεί πάνω από 200 τύποι HPVς, χωρίς να έχουν όλοι αλληλουχηθεί, παρά τις συνεχείς μελέτες.

Ο πιο «εύκολος» τρόπος μετάδοσης του ιού είναι μέσω της σεξουαλικής επαφής και από τα δεδομένα προκύπτει πως με την αλλαγή της σεξουαλικής συμπεριφοράς, αλλάζει και η τοπολογία του ιού από το γεννητικό στο αναπνευστικό σύστημα. Παρότι βέβαια ο ιός αιτιοπαθογενετικά εμπλέκεται σε πολλά είδη καρκίνου, η παρουσία κάποιων άλλων παραγόντων, όπως το κάπνισμα, η ακτινοβολία κτλ., είναι εξίσου επιβαρυντική για την εκδήλωση καρκίνου.

Όπως φαίνεται, η μόλυνση από τους HPVς μπορεί να καθαριστεί από μόνη της, ανάλογα με τον τύπο του ιού και τη βλάβη που έχει προκληθεί. Μάλιστα η πιθανότητα εξομάλυνσης είναι υψηλή όταν η δυσπλασία είναι χαμηλής επικινδυνότητας, ενώ μειώνεται όταν είναι υψηλής επικινδυνότητας. Αποτελεσματική θεραπεία παρόλα αυτά υπάρχει μόνο για λίγες περιπτώσεις, ενώ παράλληλα γίνεται μεγάλη προσπάθεια για μαζική παραγωγή εμβολίων με στόχο την πρόληψη ή φαρμάκων για κατάλληλη αντιμετώπιση στους υπάρχοντες ασθενείς.

Οι HPVς απασχόλησαν την ιατρική και την ευρύτερη επιστημονική κοινότητα από την ημέρα της ανακάλυψής τους. Στοιχοποιήθηκαν πολύ γρήγορα για την πρόκληση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που καταλαμβάνει τη 2^η θέση των πιο συχνών καρκίνων που προσβάλλουν τις γυναίκες, και γενικότερα για δυσπλασίες, είτε μη καρκινικές είτε καρκινικές, του γυναικείου και αντρικού γεννητικού συστήματος. Αργότερα, αποδείχτηκε από πολλές επιστημονικές ομάδες και ινστιτούτα ανά τον κόσμο πως παίζουν σημαντικό ρόλο και στην πρόκληση καρκίνου του στοματοφάρυγγα, που σήμερα καταλαμβάνει την 6^η θέση στην παγκόσμια λίστα. Τελικά σήμερα υπολογίζεται ότι προκαλούν το 5% των ετήσιων μορφών καρκίνου παγκοσμίως σε άνδρες και γυναίκες, ανεξάρτητα από την ηλικία, γεγονός που εντείνει τη μελέτη τους ως προς την ανίχνευση, αλλά και ως προς τη θεραπεία.

Στην Ευρώπη τα ποσοστά μόλυνσης του στοματοφάρυγγα από HPVς είναι χαμηλότερα από ότι σε ηπειρούς όπως η Αμερική, αν και ο αριθμός των κρουσμάτων συνεχώς αυξάνεται. Σύμφωνα με στατιστικές έρευνες το ποσοστό των ατόμων που προσβάλλονται από HPVς έχει αυξηθεί κατά 50% σε μία 30ετία. Η Γαλλία και η Ελβετία έρχονται πρώτες στη λίστα των ευρωπαϊκών χωρών, ενώ η Ελλάδα και η Κύπρος τελευταίες.

Στη χώρα μας δεν υπάρχουν ακόμα αναλυτικά επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα του ιού στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα στον υγιή πληθυσμό, ενώ αντίστοιχα υπάρχουν μελέτες για την παρουσία του ιού σε τραχηλικά επιχρίσματα γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί ο τρόπος μετάδοσης- αποικισμού του ιού στο στοματοφάρυγγα, δηλαδή δεν έχει βρεθεί αν ο αποικισμός του γεννητικού συστήματος συνυπάρχει με αποικισμό του αναπνευστικού του ίδιου ατόμου ή των οικείων του.

Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί τρόποι για την ανίχνευση των ιών HPVς σε νοσοκομειακό και εργαστηριακό επίπεδο. Σε περιπτώσεις μόλυνσης του γεννητικού συστήματος η διάγνωση έχει σχεδόν τελειοποιηθεί με το τεστ Παπ, τις κολποσκοπήσεις-κωλοσκοπήσεις και τις κατευθυνόμενες βιοψίες. Σε περιπτώσεις όμως μόλυνσης του ανώτερου αναπνευστικού, η διαδικασία είναι δυσκολότερη και απαιτεί πολύ αξιόπιστες και αποτελεσματικές τεχνικές, που επιβάλλουν την άρρηκτη σύνδεση με την εργαστηριακή μελέτη σε υψηλότερο επίπεδο.

Στην παρούσα έρευνα διερευνήθηκε με τη μέθοδο της Nested PCR η συχνότητα του ιού στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα σε 125 δείγματα, φαρυγγικού επιχρίσματος, που έχουν ληφθεί από ειδικό ωτορινολαρυγγολόγο ιατρό με στυλεό και έχουν σταλεί στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Παράλληλα, εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα διαφόρων διαγνωστικών τεστ για τον ιό.

Την τελευταία δεκαετία σύγχρονες διαγνωστικές μέθοδοι προστέθηκαν στις ήδη υπάρχουσες, με αποτέλεσμα να ενισχυθεί όχι μόνο η θεραπεία της μόλυνσης από HPVς, αλλά και η έγκαιρη διάγνωση. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μοριακές μέθοδοι διάγνωσης που παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μεθόδους ενίσχυσης με PCR, μεθόδους άμεσης υβριδοποίησης και signal amplified hybridization assays.

Η ανίχνευση των ιών με τη μέθοδο της PCR είναι πολύ ευαίσθητη και ταυτόχρονα πολύ ειδική. Πρακτικά η ευαισθησία μίας τέτοιας μεθόδου είναι 10-100 ιικά γονιδιώματα / 100 ng κυτταρικού DNA. Η τεχνική της PCR μπορεί να εφαρμοστεί είτε με ειδικούς εκκινητές σχεδιασμένους αποκλειστικά για κάθε τύπο είτε σχεδιασμένους για ένα ευρύ φάσμα τύπων. Δυστυχώς, η χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε τύπο είναι περισσότερο δαπανηρή, χρονοβόρα και περισσότερο ευαίσθητη σε μολύνσεις. Αντιθέτως, η χρήση εκκινητών για περισσότερους τύπους

είναι πιο γρήγορη, λιγότερο χρονοβόρα, αλλά και λιγότερο αποτελεσματική. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάζονται σε καλά συντηρημένες περιοχές, όπως η L1 ή η E1 στη συγκεκριμένη περίπτωση, που φέρουν όλοι οι τύποι στο γονιδιωματά τους. Μία άλλη επίσης διαδεδομένη προσέγγιση είναι η χρήση 2 ζευγαριών εκκινητών και η εφαρμογή 2 αλληλάλληλων PCRs, η μέθοδος της Nested PCR. Η πρώτη PCR εφαρμόζεται με ένα ζεύγος εκκινητών και έχοντας ως μήτρα το προϊόν αυτής εφαρμόζεται μία δεύτερη- nested PCR- συνήθως μέσω της οποίας ενισχύεται ένα πιο μικρό κομμάτι. Αυτό καθιστά την διαδικασία ακόμα πιο ευαίσθητη και πιο ειδική. Απαραίτητη προϋπόθεση φυσικά είναι να στοχεύεται η ίδια περιοχή, π.χ. η L1 ή η E1. Αυτοί οι 2 τύποι PCR χρησιμοποιούνται κυρίως σε εργαστηριακό επίπεδο, με διάφορα πρωτόκολλα και σε διάφορες συνθήκες.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι εκκινητές είναι το ζεύγος MY09/11 και το PGMY09/11-HMB01. Όπως αποδεικνύεται, σε όλα τα πειράματα που έχουν γίνει από διάφορες επιστημονικές ομάδες, οι εκκινητές PGMY09/11-HMB01 ανιχνεύουν τους ιούς HPVs σε ποσοστό 5-10% μεγαλύτερο από ότι οι εκκινητές MY09/11. Παρότι ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ομάδων των οποίων τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα ανωτέρω ποσοστά, σε αυτή την έρευνα τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Οι εκκινητές MY09/11 ήταν πιο αποτελεσματικοί στην ανίχνευση των ιών HPVs σε θετικά δείγματα, ίσως λόγω της μόλυνσης των εκκινητών PGMY09/11.

Επιπλέον, στη βιβλιογραφία φαίνεται πως η πιο αποτελεσματική διαδικασία PCR για την ανίχνευση HPVs είναι η nested PCR με εκκινητές το ζεύγος GP5+/6+. Όλες οι ομάδες που διεξήγαγαν αυτή την τεχνική ανίχνευσαν τους ιούς σε ποσοστό πάνω από 90% επί των δειγμάτων, γεγονός που επαληθεύεται και από την παρούσα έρευνα.

Σε νοσοκομειακό επίπεδο προτιμάται η Real Time PCR στην οποία δε χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση του προϊόντος της. Ο λόγος είναι πως η Real Time PCR χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια μέσω των οποίων το προϊόν της αντίδρασης παρακολουθείται άμεσα κατά τη διάρκεια σύνθεσής του. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης, η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης και η δυνατότητα άμεσης ποσοτικοποίησης, ενώ μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό κόστος συσκευής και αναλωσίμων. Γι' αυτό το λόγο και δεν χρησιμοποιείται σε επίπεδο εργαστηρίου. Η Real Time PCR αποτέλεσε τη βάση αυτής της έρευνας, καθώς μέσω αυτής της διαδικασίας χαρακτηρίστηκαν ως θετικά και αρνητικά τα δείγματα.

Οι μέθοδοι άμεσης υβριδοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί από πολλές εργαστηριακές ομάδες όχι όμως για την βασική ανίχνευση των ιών HPVs σε δείγματα. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες καλύτερες μεθόδους, όπως η PCR. Οι κυριότερες μέθοδοι άμεσης υβριδοποίησης είναι η Southern blot hybridization (SBH) και η in situ hybridization (ISH). Το πρόβλημα με αυτές είναι η χαμηλή ευαισθησία, ο μεγάλος χρόνος και η μεγάλη ποσότητα καθαρού DNA που απαιτείται. Από τις μεθόδους άμεσης υβριδοποίησης, η ISH είναι η λιγότερο ειδική για την ανίχνευση των HPVs, ενώ γίνονται προσπάθειες για συνδυασμό με μεθόδους ενίσχυσης με PCR, ώστε να αυξηθούν τα αποτελέσματα επιτυχίας.

Τέλος, μεγάλο κομμάτι της βιβλιογραφίας ως προς την ανίχνευση των HPVs αποτελούν οι signal amplified hybridization assays. Η πιο αξιόπιστη signal amplified hybridization assay είναι το FDA-approved Hybrid Capture 2 test (HC2). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε 13 RNA ανιχνευτές για high-risk τύπους (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή, καθώς είναι σε θέση να ανιχνεύσει (για τον τύπο 16) 1 pg/mL, που ανταποκρίνεται σε 10^5 ιικά γονιδιωμικά αντίγραφα. Έχει αποδειχτεί πειραματικά πως η συγκεκριμένη μέθοδος είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματική ως προς την ανίχνευση των θετικών δειγμάτων από την ISH και από την ευρέως εφαρμοσμένη nested GP5+/GP6+ PCR. Τα μειονεκτήματα όμως αυτής της μεθόδου είναι βασικά. Αφενός δεν μπορεί να ανιχνεύσει άλλους τύπους HPVs και αφετέρου δε μπορεί να ανιχνεύσει πολλαπλές μολύνσεις, γεγονότα που δε μπορούν να αντισταθμίσουν το ιδιαίτερα μεγάλο κόστος.

Βιβλιογραφία

- Aaij C., Borst P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 269: 192-200
- Barbosa M.S., Lowy D.R., Schiller J.T. (1989) Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding protein. *J. Virology* 63:1404-1407
- Bouvard V., Storey A., Pim D., Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein:evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 13: 5451-5459
- Boyer S.N., Wazer D.E., Band V. (1996) E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin- proteasome pathway. *Cancer Res.* 56: 4620- 4624
- Chang F., Syrjanen S., Kellokoski J., Syrjanen K. (1991) Human Papillomavirus infections and their associations with oral disease. *J. Oral Pathol Med.* 20: 305- 317
- Crum C.P., Nuovo G., Friedman D., Silverstein S.J. (1988) Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J. Virology.* 62: 84- 90
- De Villiers E.M., Weidauer H., Otto H., zur Hausen (1985) Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int. J. Cancer* 36: 375- 578
- De Villiers E.M. (1997) Papillomavirus and HPV typing. *Clin. Dermatol.* 15: 199- 206
- De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H., (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324:17-27
- Dixon E.P., Pahel G.L., Rocque W.J., Barnes J.A., Lobe D.C., Hanlon M.H., Alexander K.A., Chao S.F., Lindley K., Phelps W.C. (2000) The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270:345-347
- Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratines results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-827
- Doorbar J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virology* 32: Suppl 1: 57-65
- Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110: 525-541
- Doorbar J. (2007) Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis. Markers* 23: 297-313
- Edmonds C., Vousden K.H. (1989) A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virology* 63: 2650-2656
- Egawa K. (2003) Do human papillomavirus target epidermal stem cells? *Dermatology* 207: 251- 254
- Fehrmann F., Klumpp D.J., Laimins L.A. (2003) Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virology* 77: 2819-2831
- Flores E., Allen-Hoffman B.L., Lee D., Lambert P.F. (2000) The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virology* 8:4818- 4826
- Foster S.A., Demers G.W., Etscheid B.G., Galloway D.A. (1994) The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virology* 68: 5698- 5705
- Frattini M.G., Laimins L.A. (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
- Frattini M.G., Laimins L.A. (1994) The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204: 799-804
- Funk J.O., Waga S., Harry J.B., Espling E., Stillman B., Galloway D.A. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11: 2090-2100
- Garner- Hamrick P.A., Fostel J.M., Chiem M., Banerjee N.S., Chow L.T., Broker T.R., Fischer C. (2004) Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocytes culture system. *J. Virology* 78: 9041-9050
- Grassmann K., Rapp B., Maschek H., Petry K.U., Iftner T. (1996) Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J. Virology* 70: 2339-2349

- Hebner C.M., Laimins L.A. (2006) Human Papillomavirus: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Res. Med. Virology* 16: 83-97
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14: 1235-1244
- Howley P.M. (1996) Papillomaviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology/Fundamental Virology* (3rd ed), Lippincott- Raren Publishers: 947-978
- Howley P.M., Lowry D.R. (2007) Papillomaviruses. *F.Virology*, Volume 2: 299- 354
- Hummel N., Hudson J.B., Laimins L.A. (1992) Differentiation- induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virology* 66: 6070-6080
- Joyce J.G., Tung J.S., Przysiecki C.T. (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem* 274: 5810- 5822
- Kessis T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan M.B., Plunkett B.S., Han S.M., Lorincz A.T., Hedrick L., Cho K.R. (1993) Human Papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3988-3992
- Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowry D.R., Schiller J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self- assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 89: 12180-12184
- Laimins L.A. (1998) Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. *Human tumor viruses. American Society for Mikrobiology, Washington, D.C.*, p. 201-223
- Lechner M.S., Laimins L.A. (1994) Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virology* 68: 4262- 4273
- Li H., Cui X., Arnheim N. (1990) Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4580-4584
- Liu J.S., Kuo S.R., Broker T.R., Chow L.T. (1995) The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2 and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem* 45: 27283-27291
- McMillan N.A., Payne E., Frazer I.H., Evander M. (1999) Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor- negative B-cells. *Virology* 261: 271- 279
- Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A. (1997) Hest2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795
- Miller C.S., Johnstone B.M. (2001) Human Papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma, a meta-analysis: 1982-1997. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Edod.* 91: 622- 635
- Modis Y., Trus B.L., Harrison S.C. (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 18: 4754-4762
- Morris P.J., Dent C.L., Ring C.J., Latchman D.S. (1993) The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells. *Nucleid Acids Res.* 21: 1019- 1023
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-caralyzed reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Munger K., Phelps W.C., Bubb V., Howley P.M., Schlegel R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virology* 63: 4417-4421
- Munger K., Scheffner M., Huibregtse J.M., Howley P.M. (1993) Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Sur.* 12: 197- 217
- Oren M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10: 431- 442
- Patterson N.A., Smith J.L., Ozbun M.A. (2005) Human Papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparin sulfate. *J. Virology* 79: 6838-6847
- Pfister H. (2003) Human Papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31:52-56

- Roden R.B., Day P.M., Bronco B.K., Yutzy W.H. 4th, Yang Y., Lowy D.R., Schiller J.T. (2001) Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J. Virology* 75: 10493- 10497
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350- 1354
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sedman S.A., Barbarosa M.S., Vass W.C. (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J.Virology* 65: 4860-4866
- Seo Y.S., Muller F., Lusky M., Hurwitz J. (1993) Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BMV DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 702-706
- Sgaramella V., Khorana H.G. (1972) CXII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer RNA from yeast. Enzymic joining of the chemically synthesized polydeoxynucleotides to form the DNA duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. *J Mol Biol* 72: 427-444.
- Sgaramella V., Ehrlich S.D. (1978) Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* 86: 531-537
- Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063
- Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E. (2003) Different heparin sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virology* 77: 13125-13135
- Slee E.A., O' Connor D.J., Lu X. (2004) To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23: 2809- 2818
- Sun Y., Lu J.Z., McCance D.J. (1996) Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216: 219-222
- Syrjanen K., Syrjanen S. (2000) Papillomavirus infections in human disease. Wiley, New York, pp1- 615
- Syrjanen S. (2003) Human Papillomavirus infections and oral tumors. *Med. Mikrobiol Immunol.* 192: 123- 128
- Tan S.H., Leong L.E., Walker P.A., Bernard H.U. (1994) The Human Papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of SP1 and TFIID. *J. Virology* 68: 6411- 6420
- Thomas M., Banks L. (1998) Inhibition of Bac-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17: 2943- 2954
- Thompson D.A., Belinsky G., Chang T.H., Jones D.L., Schegel R., Munger K. (1997) The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 15: 3025-3035
- Tommasino M., Adamczewski J.P., Carlotti F., Barth C.F., Manetti R., Contorni M., Cavaliere F., Hunt T., Crawford L. (1993) HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33 CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8: 195-202
- Van G.W., West M., Woutek K., Rangasamy D. (2002) Papillomavirus E1 Proteins, Form, Function and Features *Virus Genes* 24: 3275-3290
- Valle G.F., Banks L. (1995) The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J. Virology* 76: 1239- 1245
- Watt F.M. (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 831- 837
- Weintraub S.J., Chow K.N., Luo R.X., Zhang S.H., He S., Dean D.C. (1995) Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 375: 812-815
- Whang J., Raychaudhuri S.P., Bagchi S. (2001) Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV- containing cervical tumor cells *Oncogene* 20: 4740-4749

- Wilson V.G., West M., Woytek K., Rangasamy D. (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function and features. *Virus Genes* 24: 275- 290
- Yang L., Mohr I., Fouts E., Lim D.A., Nohaile M., Botchan M. (1993) The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5086-5090
- Yang L., Murillo F.M., Cui H., Blosser R., Uematsu S., Takeda K., Akira S., Viscidi R.P., Roden R.B.S. (2004) Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virology* 20: 11152-60
- Yang, Bray F.I., Parkin D.M. (2004) Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *IN. J. Cancer* 109: 418-424
- You J., Croyle J.L., Nishimuro A., Ozato K., Howley P.M. (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117: 349- 360
- Zeffass- Thome K., Swerschke W., Mannhardt B., Tindle R., Botz J.W., Jansen- Durr P. (1996) Inactivation of the cdk inhibitor p27kip1 the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13: 2323- 2330
- Zhang B., Li P., Wang E. (2003) The protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 310: 100-108
- Zur Hausen H. (1996) Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*.1288(2): F55-78
- Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350