

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

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

ΒΑΛΕΝΤΙΝΑ Ν. ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΟΥ

***«Ανάπτυξη μιας Multiplex PCR για την ανίχνευση και τον
μοριακό χαρακτηρισμό των υψηλού κίνδυνου ιών HPV
16,18,45,58,51,66,35,33,31»***

**«Development of a Multiplex PCR for the detection and molecular
characterization of high-risk HPV types
16,18,45,58,51,66,35,33,31»**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μαρκουλάτος Παναγιώτης: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων).

Κομιώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τόσο για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε όσο και για την εμπιστοσύνη, το αμέριστο ενδιαφέρον και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κομιώτη Δημήτριο, Καθηγητή Οργανικής Χημείας, όπως και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στην Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, μέλος του Ειδικού Τεχνικού και Διδακτικού προσωπικού του Τμήματος, στους υποψήφιους διδάκτορες Ρούτερ Ειρήνη, Δημητρίου Τηλέμαχο για την συνεργασία τους και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε το χρειάστηκα στο εργαστήριο και κυρίως στον υποψήφιο διδάκτορα Τσακογιάννη Δημήτρη για την πολύτιμη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη του απέναντι μου. Η στήριξη του ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Ιστορικά στοιχεία.....	1
2. Ταξινόμηση των Papillomaviruses.....	2
3. Δομήτων Human Papilloma Virus(HPV).....	4
3.1 Δομή του καψιδίου.....	4
3.2 Οργάνωση του ιϊκούγενώματος.....	6
3.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1.....	7
3.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2.....	8
3.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4.....	9
3.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5.....	10
3.7 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6.....	11
3.8 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7.....	13
3.9 Μορφή του γενώματος.....	15
4. Κύκλος ζωής των Human Papilloma Viruses.....	16
4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	16
4.2 Διατήρηση του γονιδιώματος.....	17
4.3 Παραγωγική φάση (proliferative – phase).....	18
4.4 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος.....	19
4.5 Συναρμολόγηση ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	20
4.6 Ύφεση των αλλοιώσεων και λανθάνουσα λοίμωξη.....	22
4.7 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	22
5. Μέθοδοι ελέγχου HPV λοιμώξεων.....	24
5.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap).....	24
5.2 Σύγχρονες Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης.....	25
5.2.1 Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό.....	25
5.2.2 Τεχνικές βασισμένες στην PCR.....	26
5.2.3 Τεχνικές βασισμένες στον συνδυασμό τους.....	27
5.2.4 Τεχνικές για την ανίχνευση ιϊκών μεταγράφων.....	27
5.3 Εν δυνάμει Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης.....	27
5.4 Εμβόλιο κατά του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV).....	28

ΣΚΟΠΟΣ	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
1. Κλινικά δείγματα.....	31
2. Απομόνωση του DNA από δείγματα που φυλάσσονται σε thinprep.....	34
3. Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου L1.....	34
4. Multiplex PCR.....	35
5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
6. Παρασκευή πλασμιδίων για έλεγχο της ευαισθησίας με τη βοήθεια της Real Time PCR	37
6.1 Απομόνωση PCR προϊόντων από πηκτή αγαρόζης.....	38
6.2 Αντίδραση λιγάσης (Ligation).....	38
6.3 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	38
6.4 Κλωνοποίηση σε στερεή και υγρή καλλιέργεια.....	39
6.5 Απομόνωση των φορέων από τα βακτήρια.....	39
6.6 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης.....	39
7. Real Time PCR.....	40
8. Πειράματα ανταγωνισμού.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
1. Αποτελέσματα της Multiplex PCR με τυποειδικούς εκκινητές για την ενίσχυση του L1 γονιδίου.....	43
1.1 Multiplex PCR για το μείγμα I.....	43
1.2 Multiplex PCR για το μείγμα II.....	44
1.3 Multiplex PCR για το μείγμα III.....	45
1.4 Συγκεντρικά αποτελέσματα της Multiplex PCR και για τα 3 μείγματα.....	46
2. Αποτελέσματα πέψης προϊόντων κλωνοποίησης.....	47
3. Αποτελέσματα της Real Time PCR.....	48
4. Αποτελέσματα πειραμάτων ανταγωνισμού.....	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) συγκροτούν μια ομάδα δίκλωνων DNA ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Μολύνουν μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα πτηνά μέχρι τα θηλαστικά. Έχουν εντοπιστεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV οι οποίοι ανάλογα με τον τροπισμό τους κατηγοριοποιούνται στους δερματικούς και τους βλεννογόνιους ενώ με βάση το κακοήθες δυναμικό τους διακρίνονται σε χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου αποτελούν βασική αιτία πρόκλησης καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας, ενώ οι HPV τύποι χαμηλού κινδύνου προκαλούν κοινά κονδυλώματα του γενετικού συστήματος. Εκτός από τις κυτταρολογικές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται (test pap), τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές εντοπισμού και ταυτοποίησης των πιο συχνά εμφανιζόμενων τύπων HPV. Ωστόσο, η ετερογένεια του φάσματος των HPV και το γεγονός ότι οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη τη διάγνωση αυτών. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των HPV οι οποίες μπορούν να προβλέπουν σε πρώιμα στάδια τη μόλυνση, την εξέλιξη του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και την μεταβολή της αλλοίωσης σε καρκίνο.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής η οποία θα μπορούσε να ανιχνεύει και ταυτόχρονα να ταυτοποιεί τους εννιά πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους HPV υψηλού κινδύνου οι οποίοι εμπλέκονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Σχεδιάστηκαν λοιπόν τυποειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος της L1 γενωμικής περιοχής, της πιο συντηρημένης περιοχής του ιικού γενώματος με τα χαμηλότερα επίπεδα μεταλλαξιγένεσης. Στη συνέχεια με τη μέθοδο της Multiplex PCR ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι ογκογόνοι τύποι HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 και 66. Με βάση τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών οι τύποι που επιλέγηκαν για την συγκεκριμένη τεχνική καλύπτουν πάνω από το 90% των περιπτώσεων ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που οφείλεται σε HPV λοίμωξη.

Συνοψίζοντας λοιπόν, στην εργασία αυτή: α) αναπτύχθηκε μια Multiplex PCR για την ανίχνευση και ταυτόχρονα την ταυτοποίηση των 9 πιο συχνά εμφανιζόμενων τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16,-18,-45,-66,-31,-33,-35,-51,-58) στοχεύοντας με τυποειδικούς εκκινητές στην L1 γενωμική περιοχή του ιού β) αποδείχθηκε ότι η παραπάνω τεχνική είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV τύπων έναντι τεχνικών που στοχεύουν στην E6/E7 περιοχή καθώς σε ποσοστό 6,7% των δειγμάτων που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε με τη χρήση της παρούσας Multiplex PCR η ύπαρξη επιπλέον τύπων HPV γ) πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου για τον κάθε τύπο HPV με τη χρήση ποσοτικής Real time PCR αφού πρώτα σχεδιάστηκαν πρότυπες καμπύλες με τα προϊόντα που προέκυψαν από τη Multiplex PCR και δ) αποδείχθηκε ότι η ελάχιστη δυνατή ανίχνευση ιικών αντιγράφων σε συνθήκες

ανταγωνισμού είναι τα 10 αντίγραφα/τεστ και σε συνθήκες μη ανταγωνισμού 1 αντίγραφο/τεστ.

Η μέθοδος Multiplex PCR με τη χρήση L1-τυποειδικών εκκινητών που αναπτύχθηκε έχει ως στόχο σε σύντομο χρονικό διάστημα να ανιχνεύει με ακρίβεια και ειδικότητα τους εννέα πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους HPV οι οποίοι εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή και συμβάλουν στην ανάπτυξη αλλοιώσεων οι οποίες ενδεχομένως στην συνέχεια να μετατραπούν σε καρκίνο. Η παρούσα τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί μελλοντικά παράλληλα με το τεστ Pap τόσο για την ανίχνευση της παρουσίας των 9 πιο συχνά εντοπιζόμενων HPV υψηλού κινδύνου σε κλινικές περιπτώσεις όσο και για την ταυτοποίηση των τύπων, πληροφορία εξαιρετικής σημασίας για τη εξέλιξη και πρόληψη της ασθένειας.

ABSTRACT

Papillomaviruses constitute a group of double-stranded DNA viruses without envelope infecting a wide range of organisms, which extend from birds to mammals. There are over 100 distinct types of HPV which are categorized into cutaneous and mucous, depending on their tropism further divided into low, intermediate and high risk, according to their malignant potential. Experimental studies shown that high-risk HPV types are a major cause of cancer in the cervix, while low-risk types of HPV cause common warts of the genetic system. Several techniques, apart from the cytology test (test pap), have been developed to detect and identify the most frequently occurring types of HPVs. However, the variability of HPVs and the fact that most HPV infections are asymptomatic make their diagnosis particularly difficult. For this reason it is necessary to develop new methods for the detection and identification of the HPVs which will be able to detect early-stage infections.

The aim of this study was to develop a technique that could detect and simultaneously identify the nine most frequently occurring types of high risk HPVs involved in cancerous lesions. For this purpose type specific primers were designed to amplify part of the genomic region L1, which is the most conserved region of the viral genome with the lowest levels of mutagenesis. Afterwards, the detection and identification of the most frequently-occurring oncogenic types of HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 and 66 was performed by a Multiplex PCR assay which was developed for the purposes of the present study. The nine HPV types that were selected for the purposes of the present study cover more than 90% of the cases of intraepithelial lesions caused by HPV infection, based on epidemiological studies.

During the present study a) a Multiplex PCR was developed for the detection and identification of the 9 most frequently occurring high-risk HPV types (HPV-16, -18, -45, -66, -31, -33, -35, -51, -58) using type specific primers to target the virus' L1 genomic region b) it was proved that the above technique is more effective in the detection and identification of different HPV types than techniques targeting the E6/E7 region, as in 6.7 % of the tested samples, using this Multiplex PCR assay, additional types of HPVs were detected c) quantification of viral load for each of the nine types of HPV was performed by using quantitative Real time PCR and d) finally it was proved that the minimal detection of viral copies was 10 copies / test under competitive conditions and 1 copy / test under no competitive conditions.

The developed Multiplex PCR assay using L1- type specific primers, aims to accurately determine with specificity and sensitivity the nine most frequently occurring types of HPV which have a worldwide distribution and contribute to the development of lesions which may progress into cancer. This technique can be

applied in the future along with the test Pap in order to detect the presence of the 9 most frequently identified high-risk HPV types in clinical samples and to accurately identify the different types, information which is important for the outcome of the disease.

ΙΣΤΑΓΩΓΗ

1. Ιστορικά στοιχεία

Οι Papilloma ιοί (από τη λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν τη μεγάλη οικογένεια των *Papillomaviridae* (Hatama, 2011). Πρόκειται για ιούς με δίκλωνο κυκλικό DNA, μεγέθους περίπου 7900bp οι οποίοι στερούνται εξωτερικού περιβλήματος (Zheng και Baker, 2006). Έχει αποδειχθεί ότι οι Papilloma ιοί προκαλούν καλοήθεις αλλοιώσεις του δέρματος και των βλεννογόνων, γνωστές ως κονδυλώματα, καθώς επίσης και ότι εμπλέκονται σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου.

Τα κονδυλώματα ήταν γνωστά στον ιατρικό κόσμο της αρχαιότητας από την εποχή του Ιπποκράτη ο οποίος στα κείμενα του αναφέρεται με τη λέξη «κονδύλις» ή «κονδύλωμα» σε παθολογικές καταστάσεις των οστών ενώ για την περιγραφή των γεννητικών θηλωμάτων χρησιμοποιεί τη λέξη «θύμιον» ή «κίων» περιγράφοντας την εκβλάστηση του αιδοίου ως πολυπλοειδές μόρφωμα που χρήζει χειρουργικής αφαίρεσης (Διαμαντής, 2008). Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι είχαν συσχετίσει τα γεννητικά θηλώματα με τη σεξουαλική ζωή και μάλιστα είχαν παρατηρήσει μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σε ομοφυλόφιλους άντρες. Ωστόσο, την εποχή εκείνη, δεν ήταν γνωστός ο αιτιολογικός παράγοντας που προκαλούσε την εμφάνιση τους και επικράτησε η άποψη ότι πιθανόν να αποτελούν μια μορφή σύφιλης ή γονόρροιας. Το 1907 ο Ιταλός ερευνητής Ciuffo απέδειξε πρώτος την ιογενή αιτιολογία των κονδυλωμάτων. Περαιτέρω πειράματά του έδειξαν, επίσης, ότι οι αιτιολογικοί παράγοντες των κοινών κονδυλωμάτων του δέρματος και των γεννητικών οργάνων σχετίζονται στενά.

Το 1933 έγιναν οι πρώτες πειραματικές μελέτες σε ζώα (κουνέλια) για την ανάπτυξη κονδυλωμάτων από το Shope ο οποίος κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τις αλλοιώσεις αυτές της προκαλούσε κάποιος ιός παρόμοιος με αυτόν που ήταν υπεύθυνος για την εμφάνιση παραπλήσιων βλαβών στους ανθρώπους, στα βοοειδή και στους σκύλους (Shope, 1933). Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι κάποιες από τις παραπάνω αλλοιώσεις των κουνελιών του γένους *sylvilagus*, μετά από σύντομο χρονικό διάστημα, μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε διάφοροι τύποι της ομάδας αυτής των ιών εντοπίστηκαν και συνδέθηκαν με την δημιουργία όγκων σε πολλά είδη μεταξύ των οποίων και στον άνθρωπο. Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 όταν ο Harald zur Hausen το 1983 απομόνωσε τον πρώτο HPV-16 σε γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι συγκεκριμένοι τύποι του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papilloma Viruses) συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin και συν., 2000).

2. Ταξινόμηση των Papillomaviruses

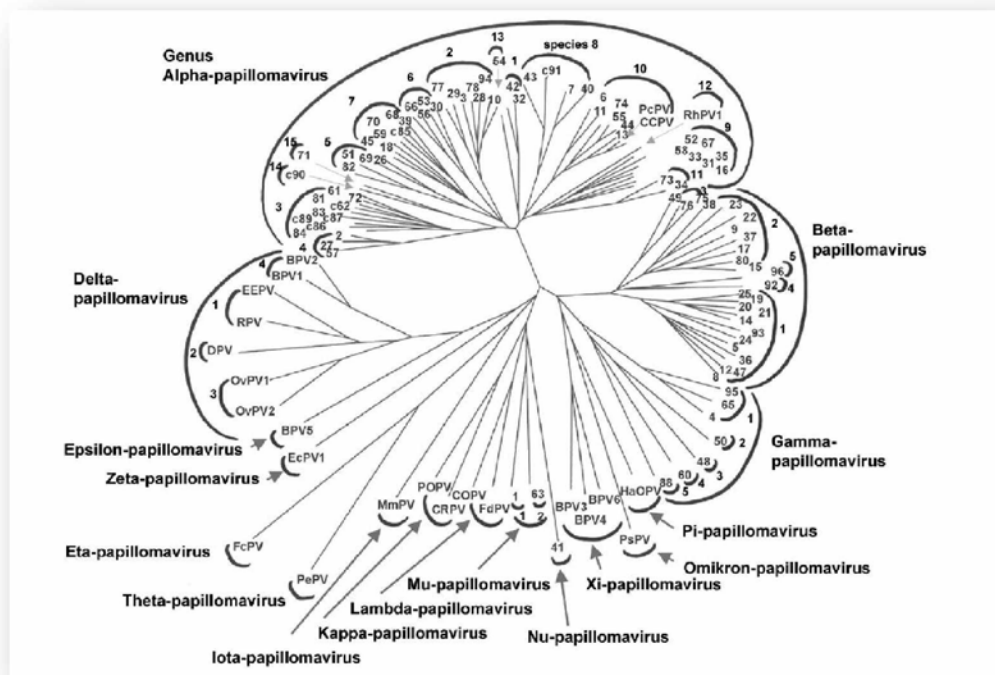
Οι Papilloma ιοί συνιστούν μια μεγάλη και ιδιαίτερα πολυμορφική ομάδα ιών η οποία μολύνει, κυρίως θηλαστικά και πτηνά. Στον άνθρωπο, τον κατεξοχήν ξενιστή προς μελέτη, εντοπίστηκαν περίπου 100 διαφορετικοί τύποι Papilloma ιών (de Villiers και συν., 2004). Αρχικά, ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων

(Papillomaviruses) ταξινομήθηκε από κοινού με τους Polyoma ιούς και τον SV40 στην οικογένεια των *Papovaviridae*, το όνομα της οποίας προήλθε από τα δύο αρχικά γράμματα των ονομάτων των ιών που περιλαμβάνονται στην οικογένεια αυτή (Papilloma, Polyoma, Vacuolating). Η ομαδοποίηση αυτή βασίστηκε στην ομοιότητα του καψιδίου των παραπάνω ιών, στην απουσία περιβλήματος καθώς επίσης και στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού DNA ως γενετικό υλικό (Danos και συν., 1989).

Ωστόσο, παρά τις παραπάνω ομοιότητες οι δύο ομάδες ιών διέφεραν αισθητά ως προς το μέγεθός και την οργάνωση του γενώματός τους καθώς επίσης και ως προς τις νουκλεοτιδικές και αμινοξικές τους αλληλουχίες (de Villiers και συν., 2004). Έτσι, η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των ιών (ICTV) διαχώρισε τους Papilloma και Polyoma ιούς σε δύο ξεχωριστές οικογένειες, την *Papillomaviridae* και την *Polyomaviridae* (Rebrikov και συν., 2002).

Αν και οι πρώτοι Papilloma ιοί απομονώθηκαν περίπου πριν από 30 χρόνια (Coggin και zur Hausen, 1979), η δυσκολία εύρεσης ενός κατάλληλου συστήματος καλλιέργειας κυττάρων ώστε οι ιοί να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν αποτέλεσε εμπόδιο στη μελέτη των ιικών λειτουργιών και περιόρισε τη δημιουργία ενός συστήματος ταξινόμησης το οποίο να βασίζεται στις βιολογικές τους ιδιότητες. Επειδή λοιπόν δεν υπάρχουν διαθέσιμες κυτταρικές καλλιέργειες για τους ιούς αυτούς, η ταξινόμηση τους βασίζεται στον προσδιορισμό του γενοτύπου και όχι του ορότυπου του ιού όπως εφαρμόζεται παραδοσιακά στην Ιολογία.

Με βάση την εξελικτική θεώρηση, οι HPV διακρίνονται σε δεκαέξι γένη, τα οποία ονομάζονται με βάση το ελληνικό αλφάβητο από α (Alpha) έως π (Pi) με κυριότερα τα Alpha, Beta, Gamma, Mu, και Nu (**Εικόνα 1**). Όλα τα μέλη ενός γένους εμφανίζουν ομοιότητα 60% στην L1 αλληλουχία. Η ταξινόμηση των ιών των θηλωμάτων σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές (variants) βασίζεται στην αλληλουχία των L1 γονιδίων η οποία πρέπει να διαφέρει μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 10%, 2-10% και ως 2% αντίστοιχα (de Villiers και συν., 2004). Αν ληφθεί υπόψη ο τροπισμός τους, οι ιοί HPV μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε δερματικούς και βλεννογόνιους, ενώ με βάση το κακοήθες δυναμικό τους διακρίνονται σε χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου (**Πίνακας 1**).



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καπιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers και συν., 2004).

Τα δύο κύρια γένη των HPV είναι οι Alpha και οι Beta, στους οποίους ανήκουν περίπου το 90% των ιών θηλωμάτων που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα. Οι περισσότεροι ιοί HPV ανήκουν στο γένος Alpha, όπως για παράδειγμα οι τύποι που σχετίζονται με γεννητικές λοιμώξεις. Στο γένος Beta ανήκουν οι ιοί HPV που προκαλούν λοιμώξεις οι οποίες δεν είναι κλινικά εμφανείς. Δυνητικά, όμως, σχετίζονται με την ανάπτυξη μη μελανωματικού καρκίνου δέρματος σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ ενοχοποιούνται και για τη συμμετοχή στην παθογένεια μια σπάνιας μορφής κληρονομούμενης θηλωμάτωσης, γνωστής ως ακροχορδονώδους επιδερμοδυσπλασίας (Harwood και Proby, 2002). Οι υπόλοιποι τύπου HPV ανήκουν στα γένη Gamma, Mu, και Nu προκαλώντας θηλώματα που δεν εξελίσσονται σε καρκίνο.

Όπως αναφέρθηκε, οι ιοί των θηλωμάτων ανάλογα με τον τροπισμό τους διακρίνονται στους δερματικούς και στους βλεννογόνιους. Σε κάθε μια από τις κατηγορίες αυτές περιλαμβάνονται ιοί χαμηλού και υψηλού κινδύνου, ανάλογα με το δυναμικό για κακοήγη εξαλλαγή των βλαβών που προκαλούν. Οι περισσότεροι ιοί HPV είναι χαμηλού κινδύνου και προκαλούν εντοπισμένα καλοήγη θηλώματα που δεν εξαλλάσσονται ακόμα και αν αφεθούν χωρίς θεραπεία. Ωστόσο υπάρχουν και ορισμένοι HPV υψηλού κινδύνου οι οποίοι ευθύνονται για τη δημιουργία ενδοεπιθηλιακών βλαβών οι οποίες μπορεί να εξελιχθούν σε διηθητικά καρκινώματα (Bosch και συν., 2002). Η πλειονότητα των καρκινωμάτων

τραχήλου μήτρας σχετίζονται με λοίμωξη από ιούς HPV υψηλού κινδύνου. Κύριος εκπρόσωπος τους είναι ο ιός HPV16, που ευθύνεται για το 50% περίπου των καρκίνων τραχήλου μήτρας, καθώς επίσης οι ιοί HPV18, HPV31 και HPV33.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των HPV σε ομάδες επικινδυνότητας

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

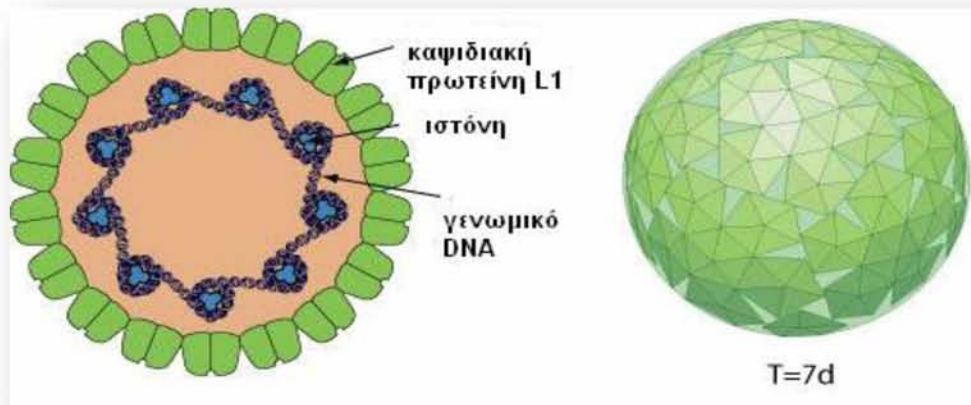
Από: de Villiers και συν., 2004

3. Δομή των Human Papilloma Virus (HPV)

3.1 Δομή του καψιδίου

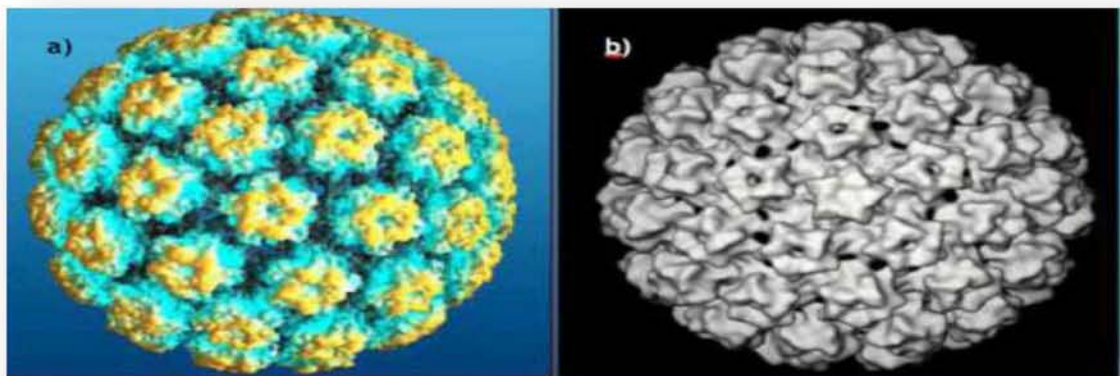
Όπως αναφέρθηκε, οι Papilloma ιοί είναι μια ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών μεγέθους 7900 bp και διαμέτρου της τάξης των 50 - 60 nm. Κοινό γνώρισμα των ιών αυτών είναι ότι στερούνται εξωτερικού περιβλήματος και ότι αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο με χαρακτηριστική γεωμετρία εντός του οποίου προφυλάσσεται το γενετικό τους υλικό (Zheng και Baker, 2006). Πιο συγκεκριμένα, τα καψίδια των ιών αυτών είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας και αποτελούνται από δυο πρωτεΐνες, τις L1 και L2, οι οποίες μεταφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου μόλυνσης του ιού. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες ενθυλακώνουν το συνδεδεμένο με ιστόνες κυκλικό δίκλωνο DNA του ιού (**Εικόνα 2**).

Η πρωτεΐνη L1 με μοριακό βάρος 55 kDa, αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου και αντιπροσωπεύει το 80% της συνολικής ιικής πρωτεΐνης. 360 αντίγραφα της L1 οργανώνονται σε 72 πενταμερικά καψομερή τα οποία συγκροτούν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με triangulation number T=7 (Baker και συν., 1991) (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 2. T=7 HPV-16, αλληλεπίδραση ιϊκού DNA με ιστόνες (Swiss institute of Bioinformatics).

Η πρωτεΐνη L2 με μοριακό βάρος 74 kDa, αποτελεί το δεύτερο συστατικό του ιϊκού καψιδίου. Περίπου δώδεκα αντίγραφα της πρωτεΐνης αυτής συμμετέχουν στη συγκρότηση του. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της L1 ενώ ο δομικός της ρόλος δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται με την L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής 44 αμινοξέων η οποία εντοπίζεται κοντά στο C- τελικό της άκρο. Εκτιμάται ότι ένα μόριο της L2 πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με πέντε μόρια της L1. Μέσω αυτής της σύνδεσης η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 (Finnen και συν., 2003). Η βασική της, ωστόσο, λειτουργία είναι η καθοριστικής σημασίας αλληλεπίδρασή της με την ιϊκή πρωτεΐνη E2 κατά το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά καψίδια (Buck και συν., 2004). Τέλος, μια άλλη επικράτεια της L2 εκτίθεται στην επιφάνεια του καψιδίου σχηματίζοντας έναν ειδικό επίτοπο που αναγνωρίζεται από το ανοσοβιολογικό σύστημα του ξενιστή. Αυτή η εκτεθειμένη επιφάνεια της L2 μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με έναν κυτταρικό υποδοχέα ώστε να διευκολύνει την είσοδο των ιϊκών σωματιών εντός του ιού (Kawana και συν., 2001).



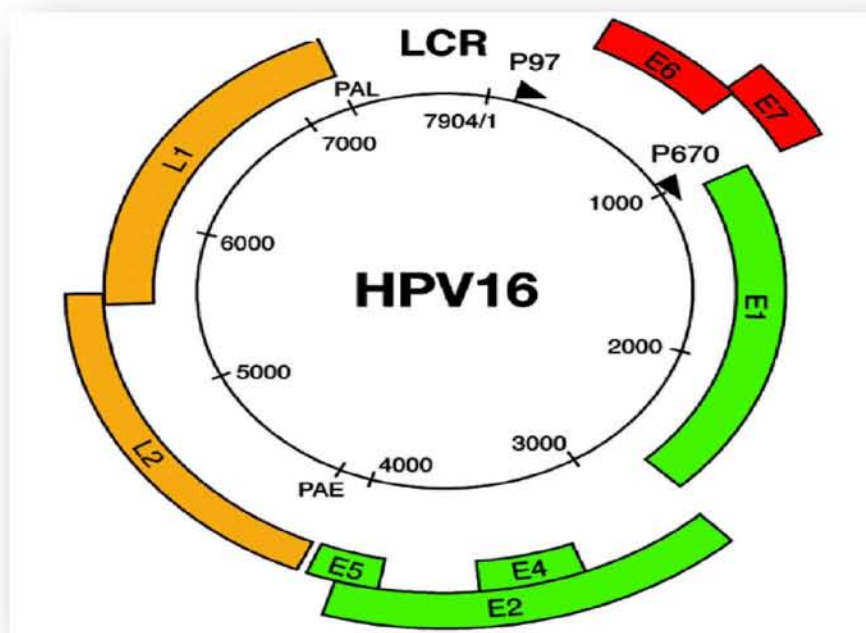
Εικόνα 3. Πλήρης δομή T=7 του καψιδίου του HPV. Διακρίνονται οι δομές των L1 πενταμερών (Hagensee και συν., 1994).

3.2 Οργάνωση του ιϊκού γενώματος

Όλοι οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) περιέχουν ένα δίκλωνο, κυκλικό DNA μεγέθους περίπου 8 kb, το οποίο μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις κύριες περιοχές: την πρόιμη (early, E), την όψιμη (late, L) και τη ρυθμιστική περιοχή (long control region, LCR ή non coding region, NCR ή upstream regulatory region, URR). Σε όλους τους ιούς HPV οι περιοχές αυτές χωρίζονται μεταξύ τους από δυο περιοχές πολυαδενυλίωσης (pA): την πρόιμη pA (A_E) και την όψιμη pA (A_L). Η πρόιμη περιοχή των ιών HPV αποτελεί περισσότερο από το 50% του συνολικού ιϊκού γενώματος και κωδικοποιεί έξι πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) και συγκεκριμένα τα E1, E2, E4, E5, E6 και E7 τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες (Danos και συν., 1982).

Η όψιμη περιοχή όλων των HPV ιών αποτελεί σχεδόν το 40% του ιϊκού γενώματος, βρίσκεται καθοδικά της πρόιμης περιοχής και κωδικοποιεί τα πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 για τη μετάφραση της μείζονος (L1) και της ελάσσονος (L2) καψιδιακής πρωτεΐνης.

Η ρυθμιστική περιοχή αποτελείται περίπου από 850 bp (10% του γονιδιώματος των HPV) και δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη. Στο 3' άκρο της περιέχει ρυθμιστικά στοιχεία σχετικά με την αντιγραφή και τη μεταγραφή, ενώ στο 5' άκρο της περιέχει την όψιμη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (untranslated region, UTR) όπου βρίσκονται δύο ενεργές όψιμες περιοχές πολυαδενυλίωσης. Η ρυθμιστική περιοχή φέρει τη θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και πολλαπλές θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II, τόσο από τους πρόιμους όσο και από τους όψιμους υποκινητές των διαφόρων τύπων HPV (Bernard, 2002) (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του ιϊκού γενώματος (Doorbar, 2007).

3.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 kDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος (Ustav και Stenlund, 1991). Το E1 ORF είναι μαζί με το L1 ORF οι πιο συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διαφόρων τύπων του ιού (zur Hausen, 1996). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης, ΑΤΡάσης και σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

Η E1 πρωτεΐνη, παρουσία ΑΤΡ, προσδένεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε A-T προκαλώντας δομικές αλλαγές. Ως πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους: πρώτον, έχει δράση πρωτεΐνης πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον, έχει δράση ελικάσης με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει την θέση έναρξης της αντιγραφής (Liu και συν., 1995). Η E1 πρωτεΐνη προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της E2 πρωτεΐνης, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo και συν., 2003). Οι θέσεις πρόσδεσης της E2 είναι παρακείμενες των θέσεων αναγνώρισης της E1. Από τη στιγμή της πρόσδεσης οι E1 πρωτεΐνες σχηματίζουν εξαμερή με υψηλή συγγένεια για το DNA (Sedman και Stenlund 1998). Τα εξαμερή της E1 δρουν σαν ελικάσες και ξετυλίγουν επιτυχώς το υπερελικωμένο DNA, καθώς αυτό διέρχεται διαμέσου του κέντρου του

εξαμερικού δακτυλίου (Li και συν., 1998). Σε αυτό συμβάλλει και μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (chaperone proteins).

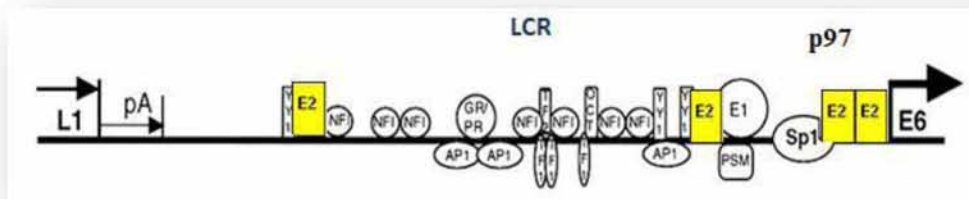
3.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη έχει μέγεθος 50 kDa, δρα σε διμερή μορφή και ρυθμίζει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιϊκού DNA (Laimins 1998). Διακρίνεται σε τρεις περιοχές, την C – τελική, την N – τελική και μια ενδιάμεση περιοχή, οι οποίες διαφέρουν τόσο στη δομή τους όσο και στη λειτουργία τους. Η C – τελική περιοχή αποτελείται από 90-100 αμινοξέα, κωδικοποιεί μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA και σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελιού (Hedge και συν., 1992). Η N- τελική περιοχή, μεγέθους περίπου 220 αμινοξέων, αποτελείται από μία α-έλικα πλούσια σε γλουταμίνη πακεταρισμένη σε ένα πλαίσιο β-πτυχωτού φύλλου (Antson και συν., 2000). Το άκρο αυτό κωδικοποιεί μια περιοχή ενεργοποίησης η οποία διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αντιγραφή και στην μεταγραφή του ιϊκού γενώματος (Chen και Stenlund, 2000). Μεταξύ του C- τελικού και του N – τελικού άκρου, υπάρχει η περιοχή αρμός (hinge region), η οποία εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια ως προς το μήκος της και την αμινοξική της αλληλουχία. Η ενδιάμεση αυτή περιοχή δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής και ο ρόλος της περιορίζεται στη σύνδεση των δυο άλλων περιοχών.

Η E2 είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Crise και συν., 1987). Η E2 αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε συντηρημένες παλινδρομικές αλληλουχίες 12 ζευγών βάσεων με μοτίβο ACCN6GGT που ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης της E2 (E2BSs) (Laimins και συν., 1998). Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες περιοχές πρόσδεσης εντός της ρυθμιστικής περιοχής (LCR) του ιϊκού γενώματος και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin και Wettstein, 1986). Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο πλαίσιο TATA, ακριβώς ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SP1 και στο 3' άκρο με μία θέση πρόσδεσης του παράγοντα δέσμευσης στο πλαίσιο TATA (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του SP1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni και συν., 1991).

Οι άλλες δύο θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham και συν., 1994). Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις (**Εικόνα 5**). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται σε θέσεις που τοποθετούνται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger και Corbach, 1997). Όταν η

συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή καταλαμβάνονται και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7 (Romanczuk και συν., 1990, Steger and Corbach 1997). Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιϊκό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 (Bechtold και συν., 2003).



Εικόνα 5. Ρυθμιστική περιοχή LCR. Αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη E2 (Desaintes και Demeret, 1996).

3.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του E4 γονιδίου βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) του E2 (**Εικόνα 4**). Παρόλο που η E4 έχει χαρακτηριστεί ως μια εκ των έξι πρώιμων πρωτεϊνών του ιού (Early proteins), η έκφρασή της γίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά την πρώιμη φάση της ιϊκής μόλυνσης, ενώ αυξάνεται δραματικά κατά την όψιμη φάση. Επομένως, η E4 συντίθεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPV και μάλιστα εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού αποτελώντας το 20-25% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται μαζί με τα πέντε πρώτα αμινοξέα του E1 γονιδίου σχηματίζοντας την E1^{E4} πρωτεΐνη, καθώς απουσιάζει από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του E4 το κωδικόνιο έναρξης AUG (**Εικόνα 6**) (Howley και συν., 1996).

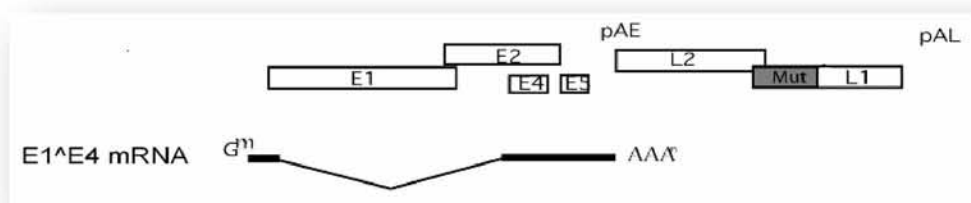
Αν και έχουν γίνει εκτενείς ερευνητικές μελέτες, ο ρόλος της E4 στον κύκλο ζωής των ιών δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Πιθανολογείται ότι η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στην απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιών. Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV 16 αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Doorbar και συν., 1991). Πιο συγκεκριμένα ένα συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) το οποίο εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο της E1^{E4}, αλληλεπιδρά με το

δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 συμμετέχει στην καταστροφή του (Roberts και συν., 1994).

Η E1^{E4} αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της αντιγραφής του ιϊκού γενώματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού (Wilson και συν., 2005) αν και άλλες μελέτες αναφέρουν την E1^{E2} ως ρυθμιστή της όψιμης και της πρώιμης φάσης της ζωής των HPV. Παρόλα αυτά όμως η λειτουργία της E1^{E4} μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών (Fang και συν., 2006).

Έχει ακόμη αποδειχτεί ότι υπερέκφραση της E1^{E4} σε πολλούς HPV τύπους, όπως ο HPV-11 και ο HPV-16, μπορεί να επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 σε διάφορους τύπους κυττάρων (Davy και συν., 2002). Ακόμα και μικρή ποσότητα της E4 είναι ικανή ώστε να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση αυτή. Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος της επαγόμενης αυτής παύσης του κυτταρικού κύκλου. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι συμβαίνει προκειμένου να εξισορροπηθούν οι επιδράσεις της E7 ογκοπροτεΐνης, η οποία ωθεί τα κύτταρα στη φάση S και επομένως προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Chang και Laimins 2000, Flores και συν., 2000).

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



Εικόνα 6. Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E1^{E4} πρωτεΐνης (Klumprr και Laimins, 1999).

3.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5

Η E5 είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη μεγέθους 10 kDa η οποία εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στο συσκευή Golgi. Ο ρόλος της στον κύκλο ζωής των HPV παραμένει άγνωστος. Στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών, η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke και συν., 1986). Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με την ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών (BVP) και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά. Η E5 διατηρείται σε πολλούς τύπους του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων αλλά εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Bubb και συν., 1988). Η E5 των HPV υψηλού κινδύνου θεωρείται καρκινογόνος και ενισχύει τη δράση των E6 και E7. Συνδέεται με κυτταρικούς υποδοχείς της

μεμβράνης, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor, EGF), ο υποδοχέας του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα b (platelet derived growth factor b, PDGF), ο υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης του κλώνου I (colony stimulating factor I receptor) και διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων (Hwang και συν., 1995). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η E5 εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi και συν., 2006).

3.7 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6

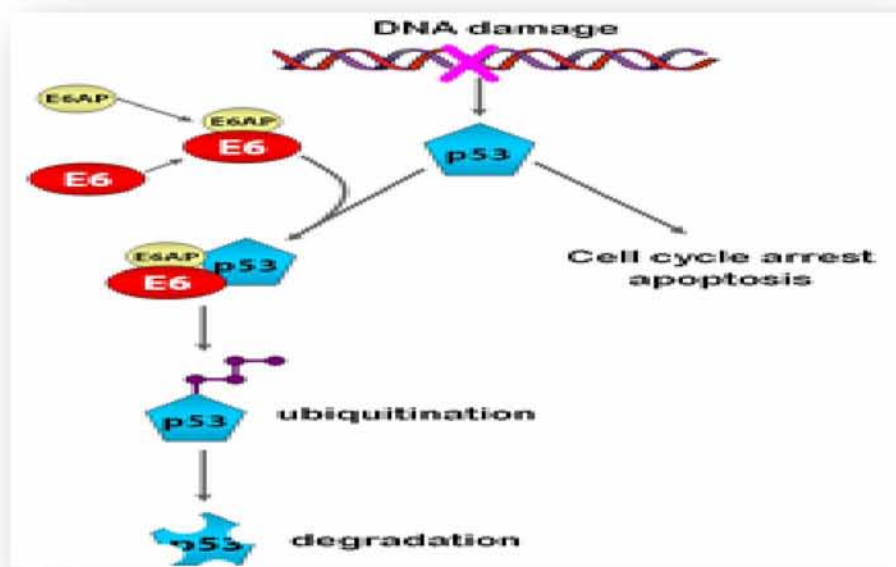
Η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 150 αμινοξέα και περιέχει δυο περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου με μοτίβο Cys-X-X-Cys. Η πρωτεΐνη E6 παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού HPV, στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην κυτταρική αθανασία. Βέβαια το E6 γονίδιο δεν είναι σε θέση από μόνο του να οδηγήσει τα κύτταρα σε αθανатоποίηση και γι αυτό ενεργεί μαζί με το E7 για να προκαλέσει τις αλλαγές που οδηγούν σε αυτή. Τρεις είναι οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους η E6 συμβάλλει στην ογκογένεση:

- α) η δημιουργία συμπλόκου με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και η επακόλουθη αποδόμηση της στο πρωτεάσωμα
- β) η αύξηση της ενεργότητας της τελομεράσης
- γ) η σύνδεση με τις πρωτεΐνες PDZ

Αποδόμηση της p53

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι το πιο συχνά απενεργοποιούμενο ογκοκατασταλτικό γονίδιο στους καρκίνους του ανθρώπου και σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες stress (Oren, 2003). Η απενεργοποίηση της p53 από την E6 επηρεάζει πολλές λειτουργίες που σχετίζονται με την απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, τη γήρανση και τη διαφοροποίηση. Η απενεργοποίηση της p53 από την πρωτεΐνη E6 ξεκινάει με τη δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ της E6 και της p53 το οποίο ακολούθως σημαίνεται από το ένζυμο E6AP (E6 associated protein) που δρα ως λιγάση ουβικουιτίνης. Αποτέλεσμα της σήμανσης είναι η μεταφορά του συμπλόκου στο πρωτεάσωμα 26S και η αποδόμηση του (Werness και συν., 1990, Li και Coffino, 1996). Εφόσον η p53 ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή της δράσης της έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση αυτών των σημείων ελέγχου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται χρωμοσωμικοί διπλασιασμοί και ανωμαλίες στα κεντροσώματα (Foster και συν., 1994, Kassis και συν., 1993). Επιπλέον η διάσπαση της p53 οδηγεί στην απώλεια ελέγχου του

μηχανισμού της απόπτωσης με αποτέλεσμα να επιβιώνουν κύτταρα με ανωμαλίες (Nguyen και συν., 2007). Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi και συν., 2005). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η διάσπαση της p53 καθιστά ανενεργό και το μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μέσω της p21, αποτρέποντας την απόπτωση. Τέλος η E6 μπορεί επίσης να μειώσει έμμεσα τη δράση της p53 μέσω της σύνδεσής της με την p300/CBP, συνενεργοποιητή της p53 (Lechner και Laimins 1994).



Εικόνα 7. Αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 μέσω της δράσης της E6 των HPV (Hoenil και Weon, 2005).

Ενεργοποίηση της τελομεράσης

Η E6 των HPV υψηλού κινδύνου είναι υπεύθυνη και για την ενεργοποίηση της τελομεράσης. Το ένζυμο τελομεράση είναι μια κυτταρική ριβονουκλεοπρωτεΐνη, υπεύθυνη για τη σύνθεση των επαναληπτικών αλληλουχιών TTAGGG των τελομερών των χρωμοσωμάτων τα οποία βραχύνονται με την πάροδο της ηλικίας. Ενώ τα κανονικά ανθρώπινα σωματικά κύτταρα υφίστανται βράχυνση των τελομερών και οδηγούνται στη γήρανση μετά από τους συνεχείς διπλασιασμούς, τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν το μήκος των τελομερών κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της τελομεράσης. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού αναγέννησης των τελομερών με ενεργοποίηση της τελομεράσης θεωρείται καθοριστικό γεγονός στη διαδικασία αθανатоποίησης των κυττάρων

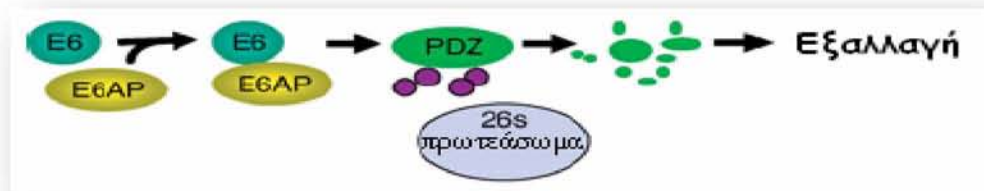
(Kim και συν., 1994). Η ενεργοποίηση του ενζύμου από την E6 επιτυγχάνεται μέσω της υπερέκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT (human telomerase reverse transcriptase) που αυτή φέρει (Nguyen και συν., 2007). Έχουν περιγραφεί δύο διακριτοί μηχανισμοί σχετικά με την υπερέκφραση της hTERT από την E6 (Klingelutz και συν., 1996):

α) άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση του προαγωγέα της hTERT από το σύμπλεγμα E6/c-Myc (Veldman και συν., 2001)

β) έμμεση ενεργοποίηση του ίδιου προαγωγέα μέσω της αποδόμησης του NFX1-91, ενός καταστολέα της hTERT (Gewin και Galloway, 2001)

Σύνδεση με τις πρωτεΐνες PDZ

Οι πρωτεΐνες PDZ αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες PDZ ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων άλλων πρωτεϊνών και οι λειτουργίες τους περιλαμβάνουν την κυτταρική σήμανση, την κυτταρική προσκόλληση, τη σωστή λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και την αγγειογένεση (Craven και Bredt, 1998). Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια αυτή συνδέονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου, με αποτέλεσμα την αποδόμησή τους (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Διαμεσολαβούμενη από την E6 των HPV υψηλού κινδύνου αποδόμηση των PDZ πρωτεϊνών (Massimi και συν., 2008).

3.8 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι μία ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την αθανатоποίηση των κυττάρων, καθώς, επίσης και με την ιϊκή παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 100 αμινοξέα και περιέχει τρεις συντηρημένες περιοχές, την CR1, CR2 και την CR3 (Barbosa και συν., 1990, Dyson και συν., 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο, ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλει στην σύνδεση της E7 πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Dyson και συν., 1992). Η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (Munger και συν., 1989). Σημαντική διαφορά ανάμεσα στην E7 των χαμηλού και υψηλού κινδύνου HPV είναι ο

εντοπισμός του υποκινητή, ο οποίος για τους μεν χαμηλού κινδύνου εντοπίζεται στη κωδικοποιούσα περιοχή (URR/LCR) και για τους υψηλού κινδύνου εντός του E6 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Howley και συν., 1996).

Η ικανότητα της E7 να συνδέεται με μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος Rb (p105 Rb, p107, p130) είναι η πλέον χαρακτηριστική της ιδιότητα. Η ικανότητα πρόσδεσης της E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου στην Rb είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή των HPV χαμηλού κινδύνου. Η διαφορά αυτή προκύπτει πιθανώς από μία τροποποίηση ενός μόνο αμινοξέος στη θέση 21 (Heck, 1992) που επηρεάζει την ικανότητα της E7 να συνεργάζεται με ενεργοποιημένα γονίδια *ras* κατά τον μετασχηματισμό νεφρικών κυττάρων αρουραίων (Banks, 1990). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η πρωτεΐνη Rb μπορεί να βρίσκεται είτε σε φωσφορυλιωμένη είτε σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή. Η αποφωσφορυλιωμένη Rb συνδέεται με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1 αναστέλλοντας τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Κατά την εξέλιξη από τη G1 στη φάση S, σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την Rb, αποδεσμεύοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1. Αυτός με τη σειρά του ενεργοποιεί γονίδια σχετιζόμενα με τη σύνθεση DNA και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η E7 συνδέεται με την αποφωσφορυλιωμένη Rb, διαταράσσει τα σύμπλοκα Rb- E2F και επιτρέπει την είσοδο του κυττάρου σε πρόωμη S φάση (Weintraub και συν., 1995). Παράλληλα η E7 μπορεί να συμβάλει στην αποσύνθεση της Rb, αναστέλλοντας ακόμα περισσότερο τη δράση της (Wang και συν., 2001). Το κύτταρο οδηγείται σε μη προγραμματισμένο πολλαπλασιασμό και μπορεί να γίνει και αθάνατο. Έτσι παρέχει ένα περιβάλλον πρόσφορο για την αντιγραφή του ιού (Chakrabarti και Krishna 2003, Finzer και συν., 2002).

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

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών η οποία αλληλεπιδρά με την E7 πρωτεΐνη είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F/υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο-ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν, επιπρόσθετα, να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F, αναστέλλοντας την λειτουργία του. Ακόμη, έχει αναφερθεί, ότι η πρόσδεση της E7 πρωτεΐνης στην HDAC οδηγεί σε αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την απορύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC, με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth και συν., 2004, Brehm και συν., 1999).

3.9 Μορφή του γενώματος

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

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

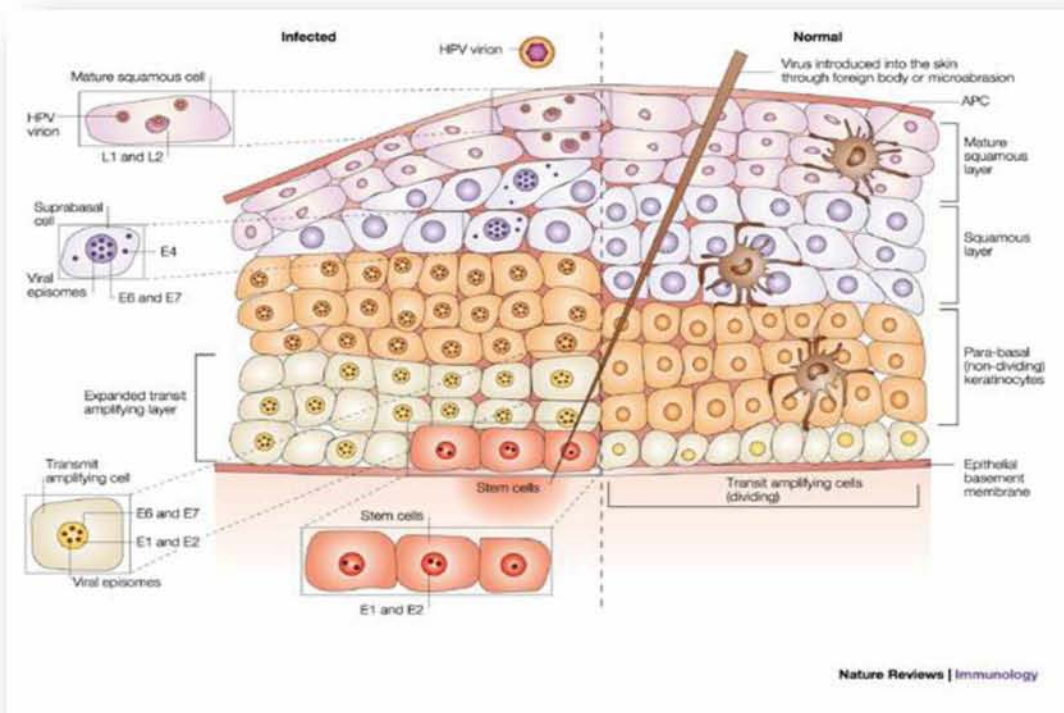
Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 και με μικρότερη συχνότητα στο γονίδιο E4 (Arias- Pulido και συν., 2006). Η διάσπαση του E2 γονιδίου είναι ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς μετά την μόλυνση του κυττάρου από τον ιό. Επιπλέον είναι ένα κρίσιμο σημείο για την έναρξη τραχηλικής νεοπλασίας και ένας πιθανός μοριακός δείκτης της εξέλιξης της νόσου. Η θραύση των γονιδίων E2 και E1 απορρυθμίζει τον έλεγχο της μεταγραφής των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα να μεταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακόμη τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων είναι πιο σταθερά καθώς περιλαμβάνουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες (Lehn και συν., 1988, Couturier και συν., 1991). Από όλα τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι τα τραχηλικά κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένα ιϊκά ογκογονίδια έχουν ένα ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μετατραπούν σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα.

Επιπλέον σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται διάφορες κυτταρογενετικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια ή κέρδος λειτουργίας πολλών κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες κυτταρογενετικές αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του HPV με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών γονιδίων. Μερικά γονίδια γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου έχει παρατηρηθεί ότι διαρρηγνύονται λόγω ενσωμάτωσης του HPV. Μερικά από αυτά είναι τα MYC, TP63, NR4A2, APM-1, FANCC, TNFAIP2 και hTERT (Wentzensen και συν., 2004).

4 Κύκλος ζωής των Human Papilloma viruses

4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων. Η αρχική μόλυνση απαιτεί πρόσβαση του ιού στα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου, γεγονός που πραγματοποιείται μέσω μικροτραυματισμών ή εκδορών. Ο κύκλος ζωής που ακολουθούν οι HPV είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του εκάστοτε επιθηλίου. Τα κύτταρα αυτά είναι κύτταρα που διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Ο ιός αφού ενσωματωθεί στα κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας, ακολουθεί τον κύκλο ζωής του εκφράζοντας σε κάθε στάδιο της διαφοροποίησής τους τις διάφορες πρωτεΐνες του. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται μόνο στις ανώτερες στοιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και οι νέοι ιοί απελευθερώνονται με την απόπτωση των κυττάρων στα οποία περιέχονται (Egawa, 2003, Schmitt και συν., 1996) **(Εικόνα 9)**.



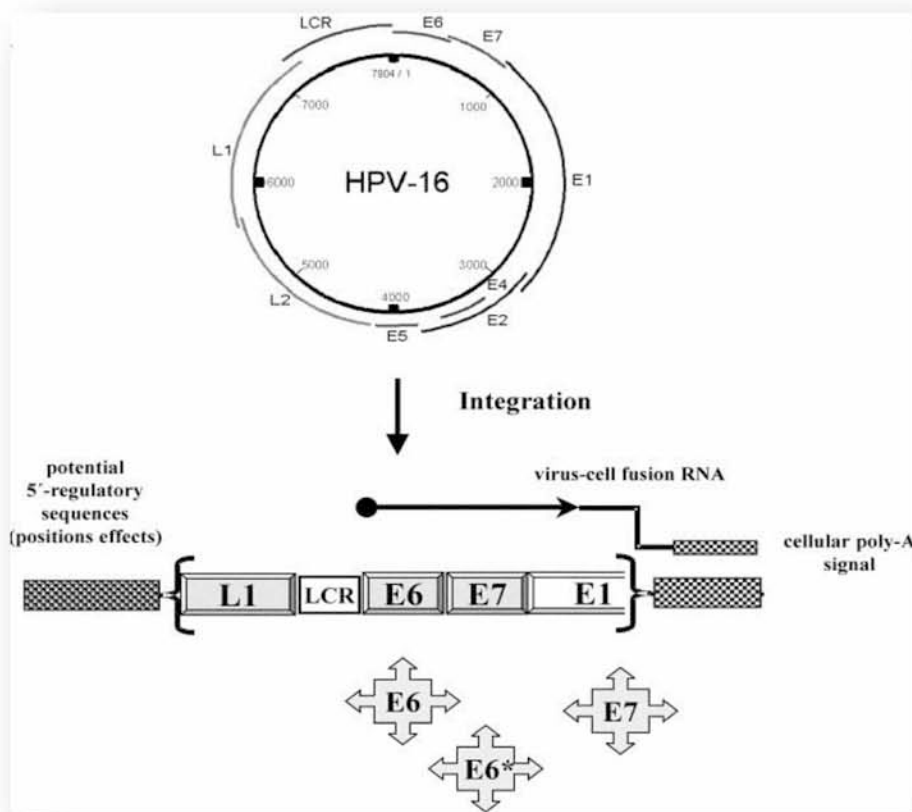
Εικόνα 9. Είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Τα θυγατρικά κύτταρα των επιθηλιακών κυττάρων διαιρούνται κατά μήκος της βασικής στοιβάδας και εν συνεχεία ωριμάζουν κάθετα του επιθηλίου χωρίς περαιτέρω διαίρεση (δεξιά πλευρά). Μετά την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου αρχίζει η έκφραση των μη δομικών πρωτεϊνών. Υπό την ρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών, τα διαιρούμενα κύτταρα εκτείνονται κάθετα και η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων καθυστερεί. Κατά τη διαφοροποίηση οι ιϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται διαδοχικά και τα ώριμα ιϊκά σωματίδια παράγονται μόνο στις πιο επιφανειακές στοιβάδες του επιθηλίου (Frazer, 2004).

Ο μολυσματικός κύκλος του ιού ξεκινάει με την είσοδο και εγκατάσταση του ιού διαμέσου του τραυματισμένου επιθηλίου. Η φύση του υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων που επιτρέπει την αρχική προσκόλληση του ιού, δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες προτείνουν ότι η είσοδος του ιού στα κύτταρα παρουσιάζει μια εξάρτηση από την παρουσία της θειικής ηπαρίνης σε αυτά, η οποία αντιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της L1 καψιδιακής πρωτεΐνης (Giroglou και συν., 2001, Joyce και συν., 1999). Η αποτελεσματικότερη είσοδος του ιού στα κύτταρα επιτυγχάνεται, όμως, ως επί το πλείστον από την ύπαρξη και ενός δεύτερου υποδοχέα ή πρωτεογλυκανικού σταθεροποιητή, όπως η α6-ιντεγκρίνη και η λαμίνη-5 που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culpr και Christensen., 2006).

Πρόσφατες, επίσης, έρευνες προτείνουν ότι η είσοδος του δεσμευμένου στον υποδοχέα ιϊκού σωματιδίου είναι μια αργή διαδικασία με χρόνο ημίσειας ζωής της τάξης των μερικών ωρών και ότι αυτή η διαδικασία συμβαίνει μέσω ενδοκυττάρωσης σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη ή καβεολίνη, ανάλογα με τον τύπο του εκάστοτε ιού (Culpr και Christensen., 2006, Day και συν., 2003, Selinka και συν., 2002). Ακολούθως, το καψίδιο του ιού αποσυναρμολογείται (απέκδυση) στα ενδοσώματα ή στα λυσοσώματα και το ιϊκό DNA, αφού διεισδύσει στην πυρηνική μεμβράνη, καταλήγει στον πυρήνα του προσβεβλημένου κυττάρου με τη σύμπραξη της καψιδιακής L2 πρωτεΐνης (Day και συν., 1998, Li και συν., 1998).

4.2 Διατήρηση του γονιδιώματος

Στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου ο ιός διατηρεί το γενετικό υλικό του σε επισωματική μορφή, με μικρό αριθμό αντιγράφων. Το ακριβές πρότυπο της έκφρασης των ιϊκών γονιδίων δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά πιστεύεται ότι το ιϊκό DNA διατηρείται σε επισωματική μορφή εντός του πυρήνα μέσω της έκφρασης των ιϊκών πρωτεϊνών E1 και E2 (Wilson και συν., 2002), διευκολύνοντας παράλληλα το σωστό διαχωρισμό του γενετικού υλικού του ιού κατά την κυτταρική διαίρεση (You και συν., 2004) (**Εικόνα 10**). Η αποτυχία έκφρασης της E1 πρωτεΐνης πλήρους μήκους, για παράδειγμα, στον HPV31, αποτρέπει τη διατήρηση του γενώματος σε επισωματική μορφή και προάγει την ενσωμάτωση του ιϊκού γενώματος σε κάποιο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (Frattini και συν., 1996). Πιστεύεται, λοιπόν, ότι το ιϊκό γονιδίωμα διατηρείται στη βασική στοιβάδα σε 10-200 αντίγραφα ανά κύτταρο και ότι οι πρώιμες ιϊκές πρωτεΐνες (E6, E7, E1 και E2) εκφράζονται σε μικρό βαθμό (De Geest και συν., 1993, Stanley και συν., 1989). Ο ρόλος των E6 και E7 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της βασικής στοιβάδας κατά τη διάρκεια της μόλυνσης δεν είναι ξεκάθαρος (Zhang και συν., 1999).

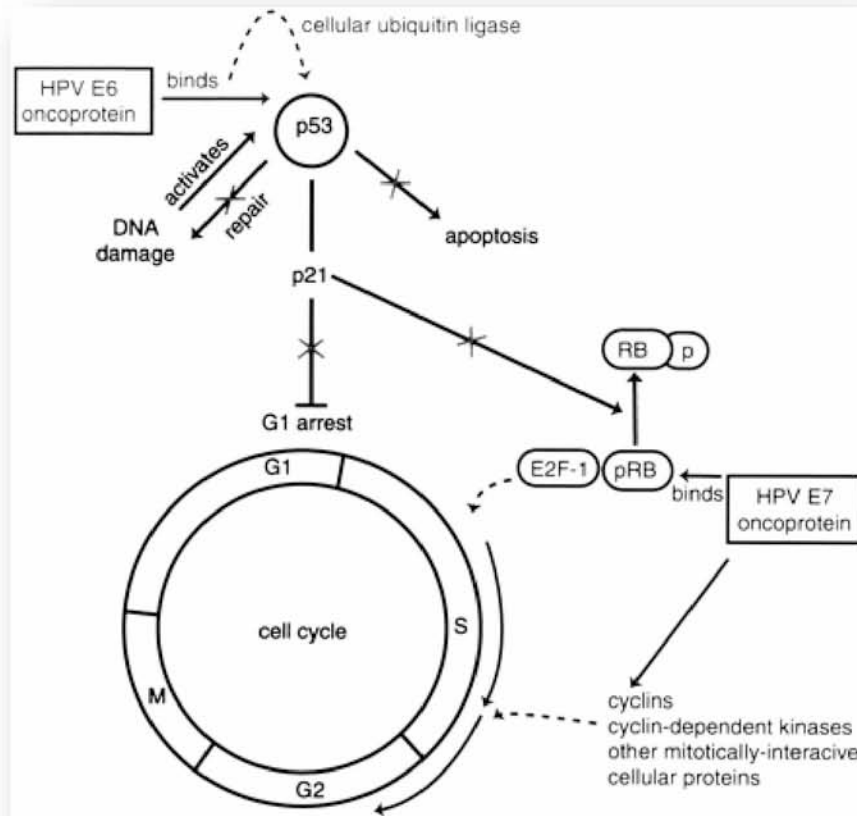


Εικόνα 10. Χαρακτηριστικές μορφές γενετικού υλικού του HPV16: Επίσωμα ή ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή (Patrick και συν., 2002).

4.3 Παραγωγική φάση (proliferative – phase)

Στο φυσιολογικό επιθήλιο αμέσως μετά τη μετανάστευση στις ανώτερες στοιβάδες, τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (basal cells) εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και υπόκεινται στη διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης. Όταν συμβεί λοίμωξη από τον ιό HPV, η έκφραση του γονιδίου E7 και πιθανώς του γονιδίου E6, προκαλεί αναστολή της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και επιβράδυνση της φυσιολογικής τελικής διαφοροποίησης (Sherman και συν., 1997). Οι πρωτεΐνες E6 και E7 συνεργάζονται ώστε να επιτύχουν το αποτέλεσμα αυτό και σε ιούς HPV υψηλού κινδύνου οι δύο αυτές πρωτεΐνες εκφράζονται από ένα δικιστρονικό mRNA (Stacey και συν., 2002) το οποίο παράγεται από τον πρώιμο προαγωγέα P97. Οι πρωτεΐνες E6 και E7 επηρεάζουν διάφορους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και προκαλούν την προαγωγή του, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3 (Munger et al., 2001) **Εικόνα 11.** Η ικανότητα της πρωτεΐνης E7 να προάγει την πρόοδο στην S φάση περιορίζεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα που είτε έχουν χαμηλά επίπεδα p21/p27 είτε εκφράζουν αρκετά υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης E7. Η πρωτεΐνη E6 συμπληρώνει τη

δράση της E7, εμποδίζοντας την επαγωγή της απόπτωσης. Εκτός από τις πρωτεΐνες E6 και E7, στο στάδιο αυτό παρατηρείται έκφραση και των υπόλοιπων πρώιμων πρωτεϊνών (E1, E2, E4 και E5) (Middleton και συν., 2003).

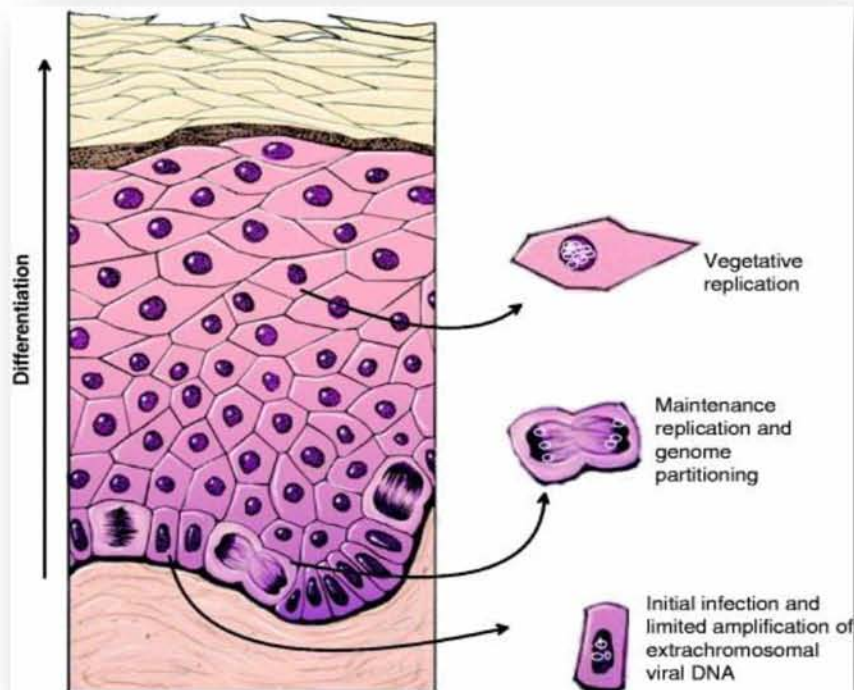


Εικόνα 11. Προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S από τις E6 και E7 πρωτεΐνες (Burd, 2003).

4.4 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Η αντιγραφή των HPV προτείνεται μέσα από ένα τριφασικό μοντέλο κατά το οποίο οι papilloma ιοί αντιγράφουν το γένωμα τους σε τρεις διαφορετικές περιόδους κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους και με διαφορετική συχνότητα (**Εικόνα 12**). Σε πρώτη φάση, το γένωμα του ιού αντιγράφεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, όπου και διατηρείται σε επισωματική μορφή σε περίπου 10-200 αντίγραφα ανά κύτταρο (**Εικόνα 10**). Σε αυτό το σημείο, το ιϊκό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα (De Geest και συν., 1993, Stanley και συν., 1989). Εν συνεχεία, το γένωμα του ιού πολλαπλασιάζεται και πάλι κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S. Σε αυτή τη φάση το DNA του ιού αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας σε κάθε κύκλο αντιγραφής δυο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής

του ιϊκού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιϊκού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιϊκού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιϊκών σωματιδίων (Hoffmann και συν., 2006).



Εικόνα 12 α) Πρώτη ενίσχυση του ιϊκού γενώματος γίνεται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας β) Σταθεροποίηση του ιϊκού γενώματος και αντιγραφή του παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S γ) Παρατεταμένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων με στόχο την παραγωγή πολυάριθμων μορίων ιϊκού DNA για την σύνθεση νέων μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων (McBride, 2008).

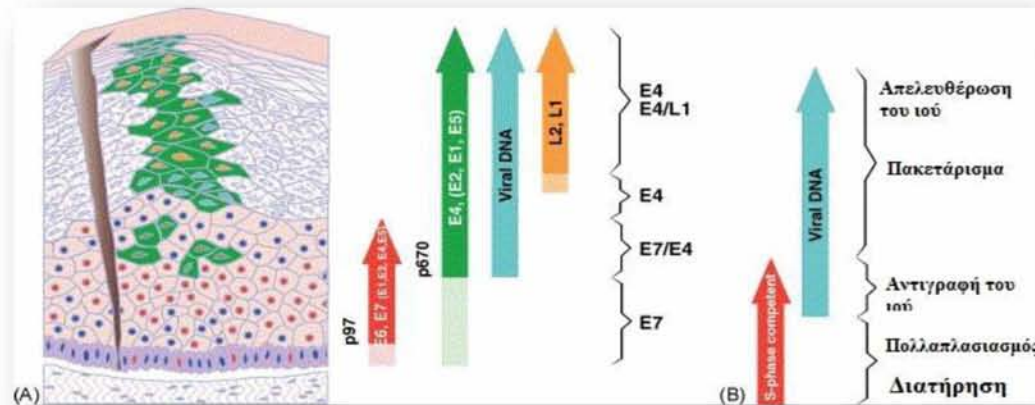
4.5 Συναρμολόγηση ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των papilloma ιών περιλαμβάνει την τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και την σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης E2 (Day και συν., 1998), η οποία συμβάλει στην τοποθέτηση του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck και συν., 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος εντός του καψιδίου (Fay και συν., 2004). Από την άλλη πλευρά η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και

είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι η βασική δομική μονάδα του καψιδίου των HPV (Florin και συν., 2002).

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

Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr και συν., 2004). Στην διαδικασία αυτή μπορεί να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^E4. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματία από το κύτταρο (Roberts και συν., 1997) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Συνοπτική απεικόνιση της έκφρασης των ιικών γονιδίων. Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση των κυττάρων της βασικής στιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97 (κόκκινο βέλος). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενόματος (E1,E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E6,E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1 και L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενόματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος). Επίσης τα γονίδια E1,E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος) (Doorbar, 2004).

4.6 Ύφεση των αλλοιώσεων και λανθάνουσα λοίμωξη

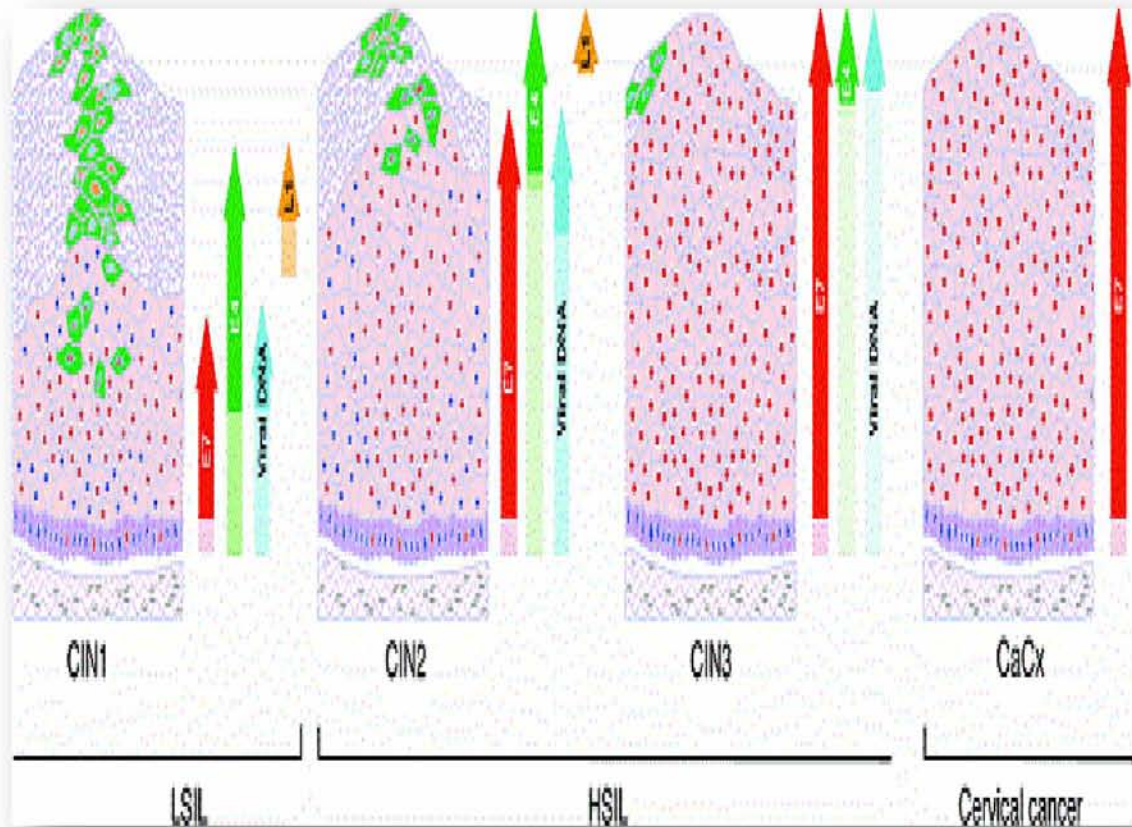
Εκτός από την αλληλουχία των γεγονότων που περιγράφηκαν παραπάνω, η πορεία της λοίμωξης με τον ιό HPV μπορεί να είναι διαφορετική. Είναι καλά τεκμηριωμένη η σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος στον έλεγχο της HPV λοίμωξης και της νόσου που προκαλεί. Ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε λοιμώξεις και μπορεί να εμφανίσουν εκτεταμένες αλλοιώσεις. Η συχνή ανίχνευση DNA από HPV υψηλού κινδύνου στον τράχηλο της μήτρας χωρίς να συνυπάρχει εμφανής νόσος μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία του ιού σε λανθάνουσα μορφή. Στην περίπτωση αυτή, η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων, αν όχι όλα, υφίστανται επιθηλιακή διαφοροποίηση χωρίς να συνυπάρχει η παραγωγική φάση του κύκλου ζωής του ιού. Το DNA του ιού παραμένει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας έχοντας υποστεί την καταστολή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας λοίμωξης, η έκφραση των ιικών γονιδίων περιορίζεται στην παραγωγή E1 και E2, ενώ η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 δεν είναι ανιχνεύσιμη (Zhang και συν., 1999).

4.7 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Όταν η καταστολή του ιού δεν είναι εφικτή, οι αλλοιώσεις επιμένουν και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν σε καρκίνο. Το ποσοστό των αλλοιώσεων που εξαλλάσσονται σε κακοήθειες νεοπλασίες είναι πολύ μικρό συγκριτικά με τη συχνότητα επίπτωσης της HPV λοίμωξης στο γενικό πληθυσμό. Στις γυναίκες που δεν καταφέρνουν να καταστείλουν την HPV λοίμωξη, οι βλάβες αυτές μπορεί να εξελιχθούν σε τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία καλής διαφοροποίησης (CIN I) ή ακόμη χειρότερα σε CIN II, CIN III και τελικά σε καρκίνο (Steenbergen και συν., 2005, Peto και συν., 2004). Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi και συν., 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως διάφορες γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise και συν., 2003).

Τα μοριακά γεγονότα που οδηγούν την εξέλιξη μιας παραγωγικής μόλυνσης σε νεοπλασία και τελικά σε καρκίνο δεν είναι πλήρως κατανοητά, ωστόσο το κομβικό σημείο στην εξέλιξη αυτή φαίνεται να είναι η απορρύθμιση της έκφρασης των ιικών γονιδίων E6 και E7 τα οποία προκαλούν μετασχηματισμό και

οδηγούν το κύτταρο σε έντονο πολλαπλασιασμό. Τέλος η ανάπτυξη διηθητικού τραχηλικού καρκίνου προϋποθέτει, εκτός από τη διατήρηση των ογκογονιδίων (E6, E7) και την ταυτόχρονη απώλεια των γονιδίων E2 και E4 τα οποία ασκούν κατασταλτική δράση στην κυτταρική αύξηση (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Κατά την εξέλιξη των αλλοιώσεων σε καρκίνο αλλάζει το πρότυπο έκφρασης των ιϊκών γονιδίων. Σε ιστολογικές αλλοιώσεις CIN I (LSIL) η σειρά των γεγονότων έκφρασης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην παραγωγική μόλυνση (απεικονίζεται διαγραμματικά αριστερά). Σε αλλοιώσεις CIN2 και CIN3 η έναρξη των γεγονότων της όψιμης φάσης καθυστερεί και παρόλο που η σειρά των γεγονότων παραμένει ίδια, η παραγωγή μολυσματικών ιϊκών σωματίων περιορίζεται σε όλο και μικρότερες περιοχές κοντά στην επιφάνεια του επιθηλίου. Η ενσωμάτωση των HPV αλληλουχιών στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή συνοδεύει τις αλλαγές αυτές και μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω απορρύθμιση της έκφρασης της E7 (και στην απώλεια των πρωτεϊνών αντιγραφής E1 και E2). Στον καρκίνο του τραχήλου (απεικονίζεται δεξιά) τα παραγωγικά στάδια του ιού εξαλείφονται σταδιακά και τα ιϊκά επισώματα συνήθως χάνονται (Doorbar, 2007).

5. Μέθοδοι ελέγχου HPV λοιμώξεων

5.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap)

Το τεστ Παπανικολάου, γνωστό σε όλους test Pap, αποτελεί μια διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιείται παγκοσμίως για την ανίχνευση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων στον τράχηλο της γυναίκας. Η συμβατική αυτή διαδικασία περιλαμβάνει την απομάκρυνση ενός δείγματος επιθηλιακών κυττάρων από την επιφάνεια του τραχήλου χρησιμοποιώντας ειδική σπάτουλα ή βουρτσάκι.

Το τεστ Pap επινοήθηκε και πήρε το όνομα του από τον Έλληνα γιατρό Γεώργιο Παπανικολάου οποίος ερευνούσε την επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στο επιθήλιο του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Το 1926 ανέφερε ότι καρκινικά κύτταρα μπορούσαν να παρατηρηθούν στις κολπικές εκκρίσεις από γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ενώ το 1943 δημοσίευσε το άρθρο «Διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από το κολπικό επίχρισμα».

Τελευταία, αντί για τη συμβατική μέθοδο, εφαρμόζεται η κυτταρολογία υγρής φάσης (LBC) για την προετοιμασία του επιχρίσματος. Η LBC έχει το πλεονέκτημα ότι είναι κατάλληλη για επιπρόσθετες εξετάσεις. Σύμφωνα με αυτήν, το δείγμα μεταφέρεται σε ένα φιαλίδιο με συντηρητικό υγρό, όπου τα κύτταρα διασκορπίζονται. Ένα υποπολλαπλάσιο του διαθέσιμου υλικού επιλέγεται για την επεξεργασία, κατά την οποία τα κύτταρα χωρίζονται με φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε γυάλινη επιφάνεια και στέλνονται στο κυτταρολογικό εργαστήριο, όπου προετοιμάζονται με ειδικές χρώσεις για την μικροσκοπική εξέταση.

Οι γυναίκες με προβληματικά επιχρίσματα παραπέμπονται σε περαιτέρω εξετάσεις και θεραπεία. Η ανίχνευση καρκίνου που βρίσκεται στο προδιηθητικό στάδιο έχει σώσει πολλές ζωές. Στην πλειοψηφία των επιχρισμάτων, η διάκριση μεταξύ των καλοηθών επιθηλιακών κυττάρων και των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να γίνει από έναν έμπειρο κυτταρολόγο και τα επιχρίσματα μπορούν να ταξινομηθούν ως «LGSIL» ή «HGSIL», σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα της Bethesda. Εντούτοις σε ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων μπορεί να υπάρξει αμφιβολία ως προς το εάν τα επιθηλιακά κύτταρα είναι καλοήθη νεοπλασματικά. Σύμφωνα με το σύστημα της Bethesda, τέτοια επιχρίσματα ταξινομούνται στην κατηγορία που περιέχει «άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας» (atypical squamous cells of undetermined significance ή ASCUS) (Wright., 2006).

5.2 Σύγχρονες Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

Τα τελευταία χρόνια επιδιώκεται όλο και περισσότερο η ανάπτυξη και χρήση μοριακών τεχνικών ως επιπρόσθετο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των HPV λοιμώξεων. Οι τεχνικές αυτές έχουν βελτιώσει κατά πολύ την ειδικότητα των κυτταρολογικών μεθόδων για την ανίχνευση υψηλού βαθμού δυσπλασιών και καρκινώματος καθώς επίσης έχουν μειώσει τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από τα κυτταρολογικά τεστ. Από την δεκαετία του 1970 έως σήμερα έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία μεθόδων ανίχνευσης και τυποποίησης του HPV, οι οποίες διαχωρίζονται στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες :

1. Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό
2. Τεχνικές βασισμένες στην PCR
3. Τεχνικές βασισμένες στον συνδυασμό τους
4. Τεχνικές για την ανίχνευση ιικών μεταγράφων

5.2.1 Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό

Hybrid Capture II test

Το Hybrid Capture II test αποτελεί την πιο γνωστή τεχνική Υβριδισμού η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV λοιμώξεων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην υβριδοποίηση DNA/RNA υγρής φάσης. Συγκεκριμένα το DNA του δείγματος αφού απομονωθεί, αποδιατάσσεται σε υψηλό pH και αναμιγνύεται με RNA ανιχνευτές συμπληρωματικούς με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες 12 τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπων HPV χαμηλής επικινδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44) (Lorincz, 1996). Ακολουθεί υβριδοποίηση κάτω από συνθήκες υψηλής ειδικότητας και τα παραγόμενα DNA/RNA υβρίδια ακινητοποιούνται με τη βοήθεια ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα. Η ανίχνευση γίνεται με χημειοφωταύγεια και βασίζεται στη χρήση ενός δεύτερου μονοκλωνικού αντισώματος (έναντι του DNA/RNA υβριδίου) με το οποίο είναι συνδεδεμένο το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Παρουσία ειδικού υποστρώματος (dioxetane), η αλκαλική φωσφατάση παράγει φως. Το φως που εκπέμπεται μετρίεται με τη βοήθεια ενός φωτόμετρου και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, ακριβής, γρήγορη και χρησιμοποιεί μη ραδιενεργό σήμανση. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι συχνά μπορεί να εμφανίζει ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Castle και συν., 2002).

5.2.2 Τεχνικές βασισμένες στην PCR

Polymerase chain reaction (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι η πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση των μολύνσεων από τους HPV. Υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί εκκινητών είτε τυποειδικοί είτε εκφυλισμένοι που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA των HPV. Οι τυποειδικοί εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση ενός μοναδικού HPV γενοτύπου. Τέτοιου είδους εκκινητές στοχεύουν στα E6 και E7 γονίδια των διαφόρων HPV τύπων. Αντίθετα οι εκφυλισμένοι εκκινητές επιτρέπουν την ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος HPV τύπων. Δεδομένου ότι η L1 είναι η πιο συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV, διάφοροι εκφυλισμένοι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί και στοχεύουν στην περιοχή αυτή (Hildesheim και συν., 1994). Τα πιο γνωστά ζεύγη εκκινητών για την L1 περιοχή είναι τα MY09/MY11 (Hildesheim και συν., 1994) και GP5+/ GP6+ (Jacobs και συν., 1997). Ο πρώτος συνδυασμός εκκινητών ενισχύει τμήμα της περιοχής L1 μεγέθους 450bp ενώ ο δεύτερος τμήμα της L1 μεγέθους 150 bp (Lizar και συν., 2001). Και τα δύο αυτά ζεύγη έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία, ωστόσο διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης κάποιων τύπων HPV (Qu και συν., 1997).

Real time PCR

Η Real time PCR είναι μια παραλλαγή της απλής PCR, το πρωτόκολλο της οποίας βασίζεται σε μια 5' εξωνουκλεάση και στην ανίχνευση της συσσώρευσης φθορισμού σε πραγματικό χρόνο (Tucker και συν., 2001). Η απελευθέρωση του φθορισμού σε κάθε κύκλο ενίσχυσης είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας των ενισχυμένων τμημάτων που παράγονται και γι αυτό θεωρείται ότι είναι μια ακριβής μέθοδος εκτίμησης του ιϊκού φορτίου. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου τόσο σε πρώιμα μετασχηματισμένα όσο και σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια της μεθόδου είναι σχεδιασμένα, έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των HPV υψηλής επικινδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους ογκογόνους τύπους των HPV και παραμένουν άθικτα και στην επισωματική μορφή και στην ενσωματωμένη τους μορφή στο γένωμα του ξενιστή. Εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου, η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

5.2.3 Τεχνικές βασισμένες στον συνδυασμό τους

PCR/APEX

Ένας επιπλέον τρόπος για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV με μεγάλη ακρίβεια είναι αυτός του συνδυασμού της απλής PCR με τη μέθοδο των Microarrays. Τα microarrays είναι μια νέα μέθοδος που περιλαμβάνει τον υβριδισμό ιχνηθετημένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια πλάκα, η οποία διαβάζεται από ένα scanner. Η μέθοδος αυτή που συνδυάζει την τεχνική της PCR και τα microarrays χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου μέσω ενίσχυσης του E7 γονιδίου του ιού. Το E7 είναι αρκετά συντηρημένο σε κάποια σημεία του γονιδίου, αλλά και αρκετά ποικιλόμορφο σε κάποια άλλα, ώστε να επιτρέπει την ταυτοποίηση (Gheit και συν., 2006).

5.2.4 Τεχνικές για την ανίχνευση ιικών μεταγράφων

NASBA πραγματικού χρόνου

Σήμερα, επίσης, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με τον πλέον αξιόπιστο τρόπο η διερεύνηση των ενσωματωμένων τύπων HPV με τη βοήθεια της τεχνολογίας NASBA σε πραγματικό χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA των E6 και E7 γονιδίων των τύπων HPV υψηλού κινδύνου σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας σημασμένους ανιχνευτές. Η μελέτη αυτή είναι πολύ χρήσιμη στην κλινική πράξη επειδή τα E6 και E7 γονίδια σχετίζονται άμεσα με την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Πιο συγκεκριμένα, η σημαντικότητα του mRNA test φαίνεται από το γεγονός ότι η περαιτέρω μεταγραφή και μετάφραση των ογκογονιδίων των HPV οδηγεί με μεγαλύτερη πιθανότητα σε αυξημένη ογκογονική δραστηριότητα και κατ' επέκταση στην εξέλιξη της τραχηλικής νεοπλασίας (CIN). (Molden και συν., 2005, Trope και συν., 2009).

5.2 Εν δυνάμει Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

Multiplex PCR

Μέχρι πρόσφατα, έρευνες που σχετίζονταν με το ρόλο των πολλαπλών μολύνσεων στην ανάπτυξη δυσπλασιών και καρκίνο στον τράχηλο, δεν μπορούσαν να ολοκληρωθούν λόγω της απουσίας test και ειδικών τεχνικών που να μπορούν να εντοπίσουν πολλαπλές λοιμώξεις από HPV (Gravitt και συν., 1998, Kleter και συν., 1999). Η Multiplex PCR είναι ένα διαφορετικό πρωτόκολλο της απλής PCR η οποία επιτρέπει ταυτόχρονα την ενίσχυση πολλαπλών στόχων σε μια μόνο αντίδραση χρησιμοποιώντας περισσότερα από ένα ζεύγος εκκινητών.

Η Nested Multiplex PCR, μια παραλλαγή της Multiplex PCR, χρησιμοποιείται σε εργαστηριακό επίπεδο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση όλων των HPV που συνυπάρχουν στο δείγμα προς εξέταση. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιον τρόπο, ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού. Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές, συνήθως, χρησιμοποιούνται σε μείγματα και οργανώνονται σε αυτά ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού τους να είναι κατά το δυνατόν παραπλήσια (Sotlar και συν., 2004).

Στην παρούσα εργασία, όπως αναφέρεται εκτενώς παρακάτω, σχεδιάσαμε και χρησιμοποιήσαμε τυποειδικούς εκκινητές που στοχεύουν σε τμήματα του γονιδίου L1 για τους εννέα HPV τύπους υψηλής επικινδυνότητας (HPV 16, 18, 45, 66, 33, 35, 51, 58, 31). Η ανάπτυξη μιας Multiplex PCR που να ενισχύει την L1 περιοχή, την πιο συντηρημένη περιοχή του ιικού γενώματος, θα αποτελέσει ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV λοιμώξεων σε μοριακό επίπεδο πριν από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων.

5.3 Εμβόλιο του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)

Σήμερα υπάρχουν δύο εμβόλια ενάντια στους πιο κοινούς καρκινογόνους τύπους HPV. Και τα δυο εμβόλια είναι βασισμένα στην έκφραση της σημαντικότερης καψιδιακής πρωτεΐνης, της L1, μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA των μορίων virus-like particles (VLPs), που μοιάζουν με το εξωτερικό καψίδιο ολόκληρου του ιού. Ένα από τα εμβόλια, το Gardasil, προστατεύει από τους τύπους HPV 6, 11, 16 και 18 (τετρασθενές), και το άλλο το Cervarix προστατεύει από τους τύπους 16 και 18 (δισθενές). Και τα δυο εμβόλια στοχεύουν στους HPV 16 και 18 οι οποίοι ευθύνονται για το 71% του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το Gardasil στοχεύει επίσης στους τύπους HPV 6 και 11 οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία κονδυλωμάτων σε ποσοστό 90%.

Τον Ιούνιο του 2006, το τετρασθενές εμβόλιο Gardasil εγκρίθηκε από την Αρχή τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενώ δυο χρόνια αργότερα εγκρίθηκε και το δισθενές εμβόλιο Cervarix. Τα στοιχεία των κλινικών δοκιμών έχουν καταδείξει ότι και τα δυο εμβόλια είναι ασφαλή και ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση των προκαρκινικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV 16 και 18. Αυτά τα εμβόλια θα μπορούσαν να προλάβουν όχι μόνο τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό 70% αλλά και άλλες μορφές καρκίνου όπως ο καρκίνος του αιδοίου, του κόλπου, του

πρωκτού-ορθού, οι οποίοι είναι λιγότερο κοινοί αλλά επίσης με μεγάλη θνησιμότητα. Το εμβόλιο HPV 6, 11, 16, 18 θα μπορούσε επίσης να αποτρέψει πάνω από το 90% των κονδυλωμάτων της γεννητικής και αναπνευστικής οδού οι οποίοι προκαλούνται αποκλειστικά από τους τύπους HPV 6 και 11. Μετά την έγκριση των εμβολίων από τον FDA, η Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) και η American Cancer Society (ACS) «Οδηγίες για την πρόωρη ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου-Guideline for the Early Detection of Cervical Cancer» σύστησαν τον καθολικό εμβολιασμό στην ηλικία των 11-12 ετών των κοριτσιών καθώς και την ανοσοποίηση κοριτσιών ή γυναικών ηλικίας 13-26 ετών και οι οποίες δεν είχαν εμβολιασθεί (Saslow και συν., 2007).

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής η οποία θα μπορούσε να ανιχνεύει και ταυτόχρονα να ταυτοποιεί τους εννιά πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους HPV υψηλού κινδύνου οι οποίοι εμπλέκονται σε καρκινικές αλλοιώσεις.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 90 κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα σε Thinprep, τα οποία συλλέχθηκαν στο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Άγιος Σάββας (δείγματα με τετρανήφια αριθμητική κωδικοποίηση), στο Αττικό Νοσοκομείο (δείγματα με κωδικοποίηση «ΑΤΤ») και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (δείγματα με κωδικοποίηση «ΠΝΛ»). Τα δείγματα που προέρχονταν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας με την μέθοδο της Nested Multiplex PCR σύμφωνα με την δημοσίευση του K.Sotlar και των συνεργατών του, το 2004. Τα υπόλοιπα δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί στα εργαστήρια των ιδρυμάτων από τα οποία προήλθαν με τις μεθόδους NASBA και HPV assays. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων καθώς και οι τύποι HPV που ήταν παρόντες σε κάθε δείγμα, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2. Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων, τύποι HPV που ήταν παρόντες, καθώς και κλινική εικόνα του ασθενούς από τον οποίο προήρχετο το δείγμα.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Τύποι HPV	Κλινική εικόνα
ΠΝΛ1	16, 52, 51, 18	Cin 3
ΠΝΛ2	16, 66	Δυσπλασία Τραχήλου
ΠΝΛ3	16, 58, 18	Δυσπλασία Τραχήλου
ΠΝΛ4	16, 66	Cin 3
ΠΝΛ5	16, 66	Cin 3
ΠΝΛ6	16, 66	Cin 2/ 3
ΠΝΛ7	16, 66, 35	Ca in situ
ΠΝΛ8	16, 66, 35, 18	Hshil, Cin 2
ΠΝΛ9	16, 35	Cin 2
ΠΝΛ10	16, 66	Cin 3
ΠΝΛ11	16, 66, 18	Cin 3
ΠΝΛ12	16, 51	Cin 2/ 3, Hgsil
ΠΝΛ13	16	Cin 3
ΠΝΛ14	16	Test Pap : Cin 1
ΠΝΛ15	16, 66	Test Pap : Cin 1 Βιοψία : Cin 3
ΠΝΛ16	16, 66	Ca Τραχήλου Διηθητικό
ΠΝΛ22	31, 51	HPV, Cin 1

ΠΝΛ24	68, 35, 31	Test Pap: Hgsil
ΠΝΛ25	68, 6, 11, 18	Test Pap: Hgsil
ΠΝΛ26	31, 45	Test Pap: Hgsil
ΠΝΛ27	68, 31	Test Pap: HPV
ΠΝΛ28	31	Ca Τραχήλου
ΠΝΛ39	18, 35, 45	Cin 3
ΠΝΛ42	18, 45	Cin 2/3
ATT1	16	LG
ATT2	16, 51	LG
ATT3	16, 18	Ascus
ATT4	16	HG
ATT5	16, 66	HG
ATT6	16, 31, 58	HG
ATT8	16	LG
ATT9	16	LG
ATT10	16	LG
ATT11	16, 18, 31	WNL
ATT12	16	LG
ATT13	16, 31	LG
ATT14	16	LG
ATT15	16	LG
ATT16	16, 33	HG
ATT17	16	WNL
ATT19	16, 31	Ascus
ATT25	16, 18	ΣΚΔΠ
ATT27	16	ΣΚΔΠ, φλεγμονή
ATT28	16	ΣΚΔΠ
ATT42	51	ΣΚΔΠ
ATT45	16	LG
ATT47	31, 51, 66	ASCUS
ATT48	51	ΣΚΔΠ υπερ
ATT49	51, 16	ΣΚΔΠ υπερ
ATT58	58	HPV
ATT59	66	ΣΚΠΔ υπερ
ATT63	16, 51	ΣΚΠΔ υπερ
ATT64	18, 45	HPV

ATT66	18	HPV
ATT70	18	ΣΚΠΑ ατροφ
ATT71	16, 18, 58	ΣΚΠΑ υπερ
ATT72	58	Ανεπαρκές
ATT73	51	ΣΚΠΑ
ATT74	66	ΣΚΠΑ ειδ φλεγμ
ATT75	66	ΣΚΠΑ
ATT78	16, 51	HPV
ATT79	16	HPV
ATT80	16	HG
ATT83	33, 54	LG/HG
ATT84	45 , 18	HPV
ATT85	66	—
ATT86	51	Δευτερογενής HPV
ATT88	51	LG
ATT93	51	—
ATT94	66	HPV
ATT95	51, 58	Δευτερογενής HPV
ATT96	51	LG
ATT97	45	LG
ATT99	18	-
ATT100	66	ΣΚΔΠ
ATT101	51	LG,φλεγμονή
ATT103	51	Δευτερογενής HPV
ATT104	58	HPV
ATT105	16, 66, 51	LG
3034	35	HPV
3063	35	-
3113	16, 18	Cin 1
3150	16, 31	Cin 1
3197	31	Ascus
3246	33	Cin 2/3
3252	16, 18	Cin 1
3293	16, 31, 58	Cin 2/3
3297	16, 18, 33	Cin 1
3298	16, 45	Cin 1

2. Απομόνωση του DNA

2.1 Απομόνωση DNA από δείγματα που φυλάσσονται σε thinprep

Η απομόνωση του DNA από τα κλινικά δείγματα που φυλάσσονταν σε thinprep πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Casas et al., 1996. Από κάθε τραχηλικό επίχρισμα μετά από καλή ανάδευση πήραμε 100μl, τα οποία αναμείξαμε στη συνέχεια με 10μl/tube γλυκογόνο και 600 μl Lysis Buffer αποτελούμενο από: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol, 25 mM sodium citrate και τα αφήσαμε για επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε tube 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης διατηρημένη στους -20°C . Μετά από καλή ανάδευση τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 20 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση αυτών στις 14.000 rcf στους $+4^{\circ}\text{C}$. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500 μl κρύας αιθανόλης 70%. Αφού έγινε καλό vortex, ακολούθησε και πάλι φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους $+4^{\circ}\text{C}$. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα το οποίο περιέχει το κυτταρικό και ιϊκό DNA επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

3. Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου L1

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου L1 9 διαφορετικών τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας, (HPV-16,-18,-45,-35,-66,-33,-51,-58,-31). Το L1 γονίδιο κωδικοποιεί την αντίστοιχη ιϊκή καψιδιακή πρωτεΐνη και αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη περιοχή μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Για το λόγο αυτό έγινε και η επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής για τον σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων. Συνολικά δημιουργήθηκαν 9 ζευγάρια εκκινητών με τη χρήση του προγράμματος *primer 3* ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

Αρχικά ανακτήθηκαν όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες για την περιοχή L1 από τη βάση δεδομένων Genbank. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε τύπο HPV ξεχωριστά. Στη συνέχεια έγινε ομοπαράθεση των αλληλουχιών του L1 γονιδίου όλων των στελεχών του ίδιου τύπου με τη βοήθεια του προγράμματος *MEGA*, με τελικό σκοπό να επιλεγούν οι συντηρημένες L1 περιοχές για κάθε τύπο ιού. Έπειτα ακολούθησε ο σχεδιασμός εκκινητών επάνω στις συντηρημένες περιοχές με την χρήση του προγράμματος *primer 3*, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για κάθε HPV τύπο που αναφέρεται στην παρούσα εργασία.

Αφού πλέον ήταν διαθέσιμες οι αλληλουχίες των εκκινητών υποβλήθηκαν σε ομοπαράθεση χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων του **BLAST**. Από την ομοπαράθεση που περιγράφηκε παραπάνω, απομονώθηκαν οι τύποι HPV που

εμφάνιζαν μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομοιότητα στην L1 γενωμική περιοχή και με βάση την πληροφορία που προέκυψε από τη βάση δεδομένων σχεδιάστηκαν και επιλέχθηκαν τυποειδικοί εκκινητές που μπορούν να υβριδίζονται μόνο στους αντίστοιχους τύπους HPV. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν και τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν.

Πίνακας 3. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου L1 με τη μέθοδο της PCR

Όνομα	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
HPV-16 L1F	Sense	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291
HPV-16 L1R	Antisense	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV-18 L1F	Sense	GCCCCTGCCTCTACACAGTA	292
HPV-18 L1R	Antisense	ATCCTGCTTATTGCCACCAC	
HPV-31 L1F	Sense	CAACGTGCTCAGGGACAC	291
HPV-31 L1R	Antisense	GGGAGGTGTGGTCAATCC	
HPV-33L1 F	Sense	TAACACCTCCTCCATCTGCT	202
HPV-33L1 R	Antisense	CCTGCCTGTAATAAAAACCTTGC	
HPV-35 L1F	Sense	GTAGGTCGTGGTCAGCCATT	227
HPV-35L1 R	Antisense	TGGTTAGCATTACAAGGTGTGC	
HPV-45 L1F	Sense	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233
HPV-45 L1R	Antisense	CCACGACCAATTTCCATACC	
HPV-51L1 F	Sense	TCCAATACCTAAAACCTCAACG	155
HPV-51L1 R	Antisense	CACAACCCACACCAACCTA	
HPV-58 L1F	Sense	GATTTGTACCTCCCAGGCTATT	233
HPV-58 L1R	Antisense	CTTTTTCGCTTTGGTGGATG	
HPV-66L1 F	Sense	CGCCGTAAACGTATTCCCTA	168
HPV-66L1 R	Antisense	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

4. Multiplex PCR

Στη συνέχεια όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε Multiplex PCR για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου και των 9 τύπων HPV(HPV 16,18,31,33,35,45,51,58,66) με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν (**Πίνακας 3**). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση αυτή είναι τυποειδικοί και στοχεύουν στην L1 περιοχή, την πιο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των διαφόρων HPV τύπων. Επιπλέον για τον έλεγχο της ποιότητας του κυτταρικού DNA καθώς και για τη διαπίστωση ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς της PCR ενισχύθηκε ταυτόχρονα και το γονίδιο της β-ακτίνης, ένα housekeeping γονίδιο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης.

Πίνακας 4. Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση της β-ακτίνης

Γονίδιο β-ακτίνης	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
b-actin F	Sense	AGCCATGTACGTTGCTATCC	500
b-actin R	Antisense	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	

Επειδή δεν είναι εφικτή η ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση και των 9 τύπων HPV σε μια μόνο αντίδραση, αρχικά οργανώσαμε τα εκκινητικά μόρια σε ομάδες. Δημιουργήσαμε 3 ομάδες, κάθε μια από τις οποίες περιείχε 4 ζεύγη εκκινητών, 3 ζεύγη για την ανίχνευση 3 τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας και 1 ζεύγος εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης. (Πίνακας 5). Σε όλες τις περιπτώσεις η επιλογή των εκκινητικών μορίων είχε ως στόχο:

- Τη μοναδικότητα των περιοχών των γονιδίων που θα ενισχυθούν στους προ ενίσχυση ιούς
- Οι αντίστοιχες αντιδράσεις να πραγματοποιούνται σε όσο το δυνατόν πλησιέστερη θερμοκρασία υβριδισμού (Tm)
- Οι εκκινητές κάθε μείγματος να μην υβριδίζονται μεταξύ τους
- Τα τελικά προϊόντα να διαφέρουν σε μέγεθος ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ως αποτέλεσμα Multiplex PCR

Πίνακας 5. Μείγματα εκκινητικών μορίων της Multiplex PCR και αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων

Μείγματα	Εκκινητικά μόρια	Μεγέθη προϊόντων (bp)
I	HPV 16 R/F	291
	HPV 45 R/F	233
	HPV 66 R/F	168
	b-actin R/F	500
II	HPV 18 R/F	292
	HPV 33 R/F	202
	HPV 35 R/F	227
	b-actin R/F	500
III	HPV 31 R/F	291
	HPV 51 R/F	155
	HPV 58 R/F	233
	b-actin R/F	500

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 25μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 4 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (KAPA2G Buffer A), 3 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 0,5 μl MgCl₂ 2 mM, 0,1 μl DNA πολυμεράσης 0.5U (KAPA2G Fast) και απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 25μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Robocycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 50sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 10sec. Τέλος η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα στάδιο επώασης στους 72 °C για 30sec.

5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων όλων των αντιδράσεων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Από κάθε προϊόν της PCR, 10μl αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης, σε 40% w/v σουκρόζης, σε TBE) και μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 120 Volts, 50 mA για 1 h περίπου. Στη συνέχεια, η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

6. Παρασκευή πλασμιδίων για έλεγχο της ευαισθησίας με τη βοήθεια της Real Time PCR

Με την ολοκλήρωση της Multiplex PCR ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και οι 9 τύποι HPV στα υπό εξέταση δείγματα. Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας εργασίας ήταν και ο προσδιορισμός της ευαισθησίας της μεθόδου με την πραγματοποίηση πειραμάτων ανταγωνισμού και για τα 3 μείγματα εκκινητών, χρησιμοποιώντας διαλύματα πλασμιδίων τα οποία περιείχαν γνωστή ποσότητα ιικών αντιγράφων. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν 9 διαφορετικά πλασμίδια στο εσωτερικό των οποίων εισήχθησαν τα 9 διαφορετικά προϊόντα της PCR όπως αυτά προέκυψαν από τις αντιδράσεις της Multiplex PCR για κάθε ένα τύπο ξεχωριστά. Στην συνέχεια ακολούθησε η κατασκευή πρότυπων καμπυλών με την χρήση ποσοτικής Real time PCR έτσι ώστε να προσδιοριστεί το ένα αντίγραφο του ιού χρησιμοποιώντας υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις

πλασμιδίων. Από την πληροφορία που προέκυψε από την Real time PCR πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας 10, 100 και 1000 αντίγραφα για κάθε τύπο του μείγματος ξεχωριστά με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς.

6.1 Απομόνωση PCR προϊόντων από πηκτή αγαρόζης

Προκειμένου να απομονώσουμε και να καθαρίσουμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης, ηλεκτροφορήσαμε όλη την ποσότητα από κάθε προϊόν. Στη συνέχεια, κόψαμε τις επιθυμητές ζώνες από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και τα τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένα σωληνάρια των 2 ml. Η απομάκρυνση της αγαρόζης και ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey-Nagel, Germany).

6.2 Αντίδραση λιγάσης (Ligation)

Οι αλληλουχίες προετοιμάστηκαν με την προσθήκη poly (A) άκρων, καθαρίστηκαν και ακολούθησε η αντίδραση της λιγάσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM® - T Easy Vector System (Promega, USA). Κατά την αντίδραση αυτή, οι poly (A) ουρές στα 3' και 5' άκρα των αλληλουχιών συνδέονται με τα αντίστοιχα poly (T) άκρα του φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA Ligase. Το μείγμα της αντίδρασης ήταν τελικού όγκου 10 μl για κάθε αλληλουχία και περιείχε: 1 μl πλασμιδιακού φορέα pGEM® - T Easy Vector 50 ng, 3 μl προϊόντος PCR, 1 μl ενζύμου T4 DNA Ligase (3 units/μl) και 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Rapid Ligation Buffer 2x. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C overnight.

6.3 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Επόμενο βήμα ήταν ο μετασηματισμός δεκτικών σε πλασμίδια βακτηριακών κυττάρων *E.coli* (JM109) με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Σε 200 μl από το απόθεμα των δεκτικών κυττάρων που διαθέτουμε, μεταφέραμε 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και αμέσως μετά, τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για δύο λεπτά (heat shock). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από τις οποίες ήταν δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Εν συνεχεία, μεταφέραμε όλη την ποσότητα των

μετασηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα σωληνάρια σε αντίστοιχα falcons που περιείχαν 800 μl θρεπτικού υλικού LB Broth. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα (επαναφορά κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων –«επούλωση»).

6.4 Κλωνοποίηση σε στερεή και υγρή καλλιέργεια

Από κάθε falcon ελήφθησαν 200 μl υγρής καλλιέργειας και επιστρώθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν, επίσης, 12 μl X-gal (50 mg/ml, Promega, USA) και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία X-gal, η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος που χρωματίζει τις αποικίες. Ωστόσο, όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι λευκές, διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαρρηγνύεται. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατός ο οπτικός έλεγχος της επιτυχίας ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στα πλασμίδια κάθε αποικίας. Από κάθε τρυβλίο συλλέχθηκαν δυο λευκές αποικίες, δηλαδή δυο κλώνοι από κάθε αλληλουχία. Στη συνέχεια, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB Broth (20 g/L) το οποίο περιείχε αμπικιλίνη σε ποσότητα 1 μl ανά ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

6.5 Απομόνωση των φορέων από τα βακτήρια

Η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin® Plasmid Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany).

6.6 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη μικρής ποσότητας των φορέων με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, η αλληλουχία που αποκόπτεται από τον φορέα με το ένζυμο αφορά μόνο το ένθεμα. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από κάθε εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x H Buffer, 1 μl ενζύμου Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15 μl ddH₂O (SIGMA, USA), ώστε

ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl. Ακλούθησε επώαση στους 37°C για 2 ώρες και μετά το πέρας της επώασης προστέθηκε 3 μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Κατόπιν, η ποσότητα αυτή ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα για να πραγματοποιηθεί οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Ακολούθησε αλληλούχηση των προϊόντων της κλωνοποίησης, έτσι ώστε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του τμήματος του L1 γονιδίου κάθε τύπου ξεχωριστά.

7. Real Time PCR

Η Real-time PCR όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5.2.2 αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR, η οποία επιτρέπει τόσο τον εντοπισμό όσο και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων σε πραγματικό χρόνο και μάλιστα ακόμη και στα αρχικά στάδια της αντίδρασης. Η αρχή της βασίζεται στην ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά φθοριοχρώματα καθώς και στο γεγονός ότι η αρχική αύξηση της ποσότητας του PCR προϊόντος (C_T -threshold cycle) συσχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος που υπάρχει στο δείγμα μας. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται από ιχνηθέτες που αλληλεπιδρούν με το παραγόμενο προϊόν της αντίδρασης. Ο φθορισμός που παράγεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο.

Από την εκχύλιση του πλασμιδιακού φορέα απομονώθηκε ένας συγκεκριμένος όγκος πλασμιδίων και πραγματοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις με στόχο τη κατασκευή των πρότυπων καμπυλών (Standard curves) της real time PCR και για τους 9 τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 58, HPV 66). Έτσι προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη αραιώση για τον κάθε τύπο HPV που έδωσε σήμα ενίσχυσης κατά τη Real Time PCR και ορίστηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου/test.

Για την αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit το οποίο περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, τη χρωστική αναφοράς ROX, dNTPs, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), MgCl₂ και DNA πολυμεράση της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA.

Η χρωστική αναφοράς ROX συμβάλλει στην αυτόματη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων σε περίπτωση ανισομερούς προσθήκης του Master mix στα εκάστοτε δείγματα. Η φθορίζουσα χρωστική έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA και επομένως όσο περισσότερα δίκλιωνα αντίγραφα παράγονται, τόσο εντονότερο θα είναι και το σήμα του φθορισμού.

Η αντίδραση της real time PCR έγινε σε τελικό όγκο 25μl. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl από την εκάστοτε αραιώση κάθε δείγματος, 10μl από το Master mix, 2μl μίγματος εκκινητών (10 pmol/μl), 0,4 μl ROX High

και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 25μl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**.

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR έλαβε χώρα στο θερμικό κυκλοποιητή STRATAGENE MX3005P QPCR system. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 1 λεπτό και στην συνέχεια 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 3sec, υβριδοποίησης/επιμήκυνσης στους 60°C για 30sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο melting curve ανάλυσης από τους 55 - 95°C. Το τελευταίο αυτό στάδιο μας δείχνει αν το προϊόν που πήραμε είναι ειδικό, συγκρίνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης για όλα τα δείγματα.

8. Πειράματα ανταγωνισμού

Αφού ολοκληρώθηκε η ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου στις πλασμιδιακές αραιώσεις, στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ελέγχθηκε ο ανταγωνισμός των διαφόρων τύπων HPV. Αρχικά δημιουργήθηκαν διαλύματα πλασμιδίων και για τα τρία μείγματα εκκινητικών μορίων (**πίνακας 5**) ώστε να προσδιοριστεί ο ελάχιστος αριθμός αντιγράφων που μπορεί να ανιχνεύσει η μέθοδος σε συνθήκες ανταγωνισμού. Για το κάθε μείγμα εκκινητικών μορίων, το οποίο ανιχνεύει 3 συγκεκριμένους τύπους HPV, δημιουργήθηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί διαλυμάτων πλασμιδίων ξεκινώντας από τα 10 αντίγραφα **πίνακας 6**.

Η αντίδραση ανταγωνισμού πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 25μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 4 μl από κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων του εκάστοτε μείγματος συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (KAPA2G Buffer A), 3 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 0,5 μl MgCl₂ 2mM, 0,1 μl DNA πολυμεράσης 0.5U (KAPA2G Fast) και απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Robocycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 50 sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 10 sec. Τέλος η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα στάδιο επώασης στους 72 °C για 30 sec.

Πίνακας 6. Διαλύματα πλασμιδίων για το κάθε μείγμα εκκινητικών μορίων

Μείγματα	Διαλύματα πλασμιδίων
Μείγμα I	10copies HPV16,100copies HPV66,1000 copies HPV45
	10copies HPV16,100copies HPV45,1000 copies HPV66
	10copies HPV66,100copies HPV16,1000 copies HPV45
	10copies HPV66,100copies HPV45,1000 copies HPV16
	10copies HPV45,100copies HPV66,1000 copies HPV16
	10copies HPV45,100copies HPV16,1000 copies HPV66
	1000copies HPV16,1000copies HPV45,1000 copies HPV66
Μείγμα II	10copies HPV18,100copies HPV33,1000 copies HPV35
	10copies HPV18,100copies HPV35,1000 copies HPV33
	10copies HPV33,100copies HPV18,1000 copies HPV35
	10copies HPV33,100copies HPV35,1000 copies HPV18
	10copies HPV35,100copies HPV33,1000 copies HPV18
	10copies HPV35,100copies HPV18,1000 copies HPV33
	1000copies HPV18,1000copies HPV33,1000 copies HPV35
Μείγμα III	10copies HPV31,100copies HPV58,1000 copies HPV51
	10copies HPV31,100copies HPV51,1000 copies HPV58
	10copies HPV58,100copies HPV31,1000 copies HPV51
	10copies HPV58,100copies HPV51,1000 copies HPV31
	10copies HPV51,100copies HPV58,1000 copies HPV31
	10copies HPV51,100copies HPV31,1000 copies HPV58
	1000copies HPV51,1000copies HPV58,1000 copies HPV31

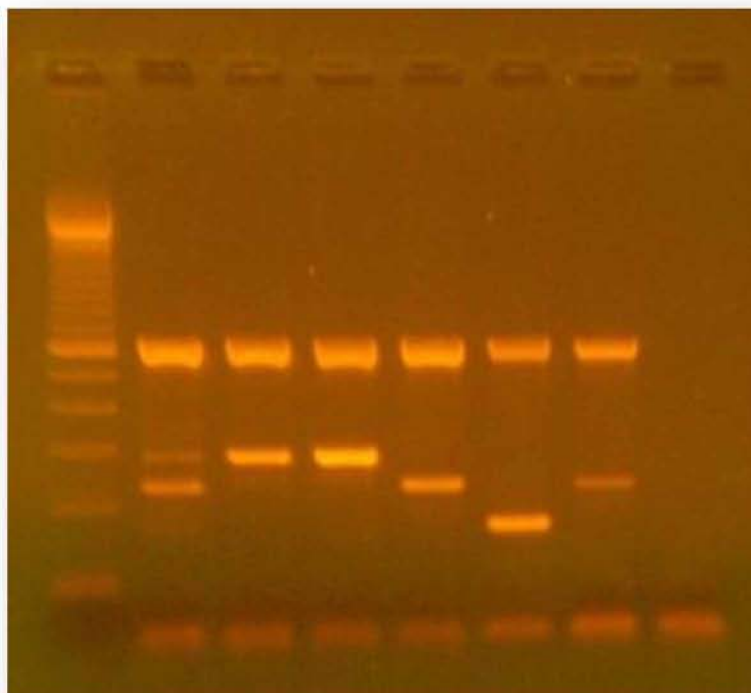
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αποτελέσματα της Multiplex PCR με τυποειδικούς εκκινητές για την ενίσχυση του L1 γονιδίου

1.1 Multiplex PCR για το μείγμα I

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 4, προκειμένου να γίνει η ανίχνευση και η ταυτοποίηση και των 9 τύπων HPV, οργανώσαμε τα εκκινητικά μόρια σε 3 ομάδες (μείγμα I, II, III). Όλα τα μείγματα περιλαμβάνουν 4 ζεύγη εκκινητικών μορίων, 3 ζεύγη για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου των HPV και ένα ζεύγος για την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενός γονιδίου το οποίο θα λειτουργήσει ως θετικός μάρτυρας της αντίδρασης. Στην **εικόνα 15** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Multiplex PCR που πραγματοποιήθηκε για το μείγμα I. Το μείγμα I περιλαμβάνει τα ζευγάρια των εκκινητικών μορίων HPV 16R/F, HPV 45R/F, HPV 66R/F για την ανίχνευση των HPV 16, 45 και 66 αντίστοιχα και το ζεύγος των εκκινητών b-actin R/F. Με την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης ελέγχθηκε η ποιότητα του DNA καθώς επίσης και η ύπαρξη ή απουσία αναστολέων της PCR. Τα αναμενόμενα προϊόντα του μείγματος I είναι για τον HPV 16 στα 291 bp, για τον HPV 45 στα 233 bp, για τον HPV 66 στα 168 bp και για το b-actin στα 500 bp.

M 1 2 3 4 5 6 7

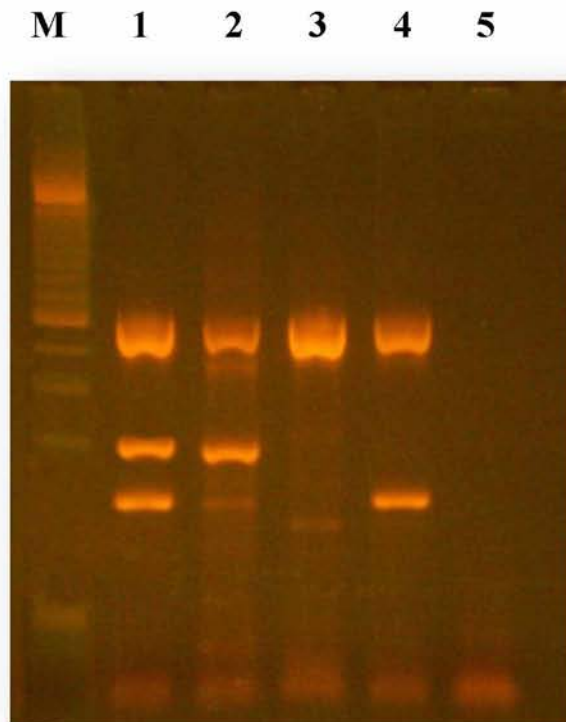


Εικόνα 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της Multiplex PCR για το μείγμα I.

Στην παραπάνω εικόνα διακρίνουμε τα προϊόντα 6 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων. Η θέση «M» αντιστοιχεί στον μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp της Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από τη γειτονική της 100 bp. Το δείγμα 1 αποτέλεσε το θετικό μάρτυρα της αντίδρασης το οποίο δημιουργήθηκε από την ανάμιξη κλινικών δειγμάτων θετικών για τους τύπους HPV 16, 45 και 66. Στις θέσεις 2-6 έχουν ηλεκτροφορηθεί κλινικά δείγματα επιβεβαιωμένα για τους τύπους HPV 16, 45 και 66. Τα δείγματα 2 και 3 είχαν διαγνωστεί θετικά για τον HPV16, το δείγμα 4 θετικό στον HPV 45, το 5 στον HPV 66 και το 6 θετικό στον HPV 45. Η διάγνωση των θετικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα της Multiplex PCR όπως φαίνεται στην εικόνα. Τέλος στη θέση 7 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας.

1.2 Multiplex PCR για το μείγμα II

Στην **εικόνα 16** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Multiplex PCR για το μείγμα II μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε gel αγαρόζης 2%. Το μείγμα II περιλαμβάνει 4 ζεύγη εκκινητικών μορίων, τα HPV 18 R/F, HPV33 R/F, HPV 35 R/F για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των αντίστοιχων τύπων HPV και ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της β-ακτίνης. Τα αναμενόμενα προϊόντα είναι για τον HPV 18 στα 292 bp, για τον HPV 33 στα 202 bp, για τον HPV 35 στα 227 bp και για τη β-ακτίνη στα 500 bp.



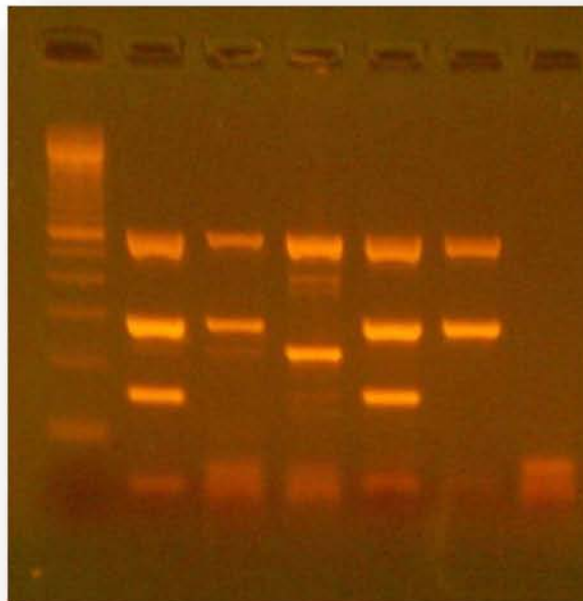
Εικόνα 16. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της Multiplex PCR για το μείγμα II.

Στις θέσεις 1-4 έχουν ηλεκτροφορηθεί κλινικά δείγματα επιβεβαιωμένα για τους τύπους HPV 18, 33 και 35. Μάλιστα σε μερικά από αυτά παρατηρείται διπλή επιμόλυνση. Συγκεκριμένα με βάση το μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp, τα κλινικά δείγματα 1 και 2 είναι θετικά σε HPV 18 και 35. Στο δείγμα 3 ανιχνεύθηκε ο HPV 33 (202 bp) ενώ το δείγμα 4 ήταν θετικό για HPV 35 (227 bp). Τέλος στη θέση 5 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας.

1.3 Multiplex PCR για το μείγμα III

Στην **εικόνα 17** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Multiplex PCR που πραγματοποιήθηκε για το μείγμα III με τα ζευγάρια των εκκινητικών μορίων HPV 31R/F, HPV 51R/F, HPV 58R/F και b-actin R/F. Τα ζεύγη των εκκινητών HPV 31R/F, HPV51R/F και HPV 58R/F χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 των αντίστοιχων HPV τύπων και ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της β-ακτίνης. Τα αναμενόμενα προϊόντα είναι για τον HPV 31 στα 291 bp, για τον HPV 51 στα 155 bp, για τον HPV 58 στα 233 bp και για τη β-ακτίνη στα 500 bp.

M 1 2 3 4 5 6



Εικόνα 17. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της Multiplex PCR για το μείγμα III.

Στην παραπάνω εικόνα του πηκτώματος αγαρόζης παρατηρούμε τα προϊόντα 5 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων. Το δείγμα 1 αποτέλεσε το θετικό μάρτυρα της αντίδρασης το οποίο δημιουργήθηκε από την ανάμιξη κλινικών δειγμάτων θετικών για τους τύπους HPV 31, HPV 51 και HPV 58. Συγκεκριμένα το δείγμα 1 προέκυψε από την ανάμιξη ίσων ποσοτήτων των δειγμάτων 2 και 4. Στις θέσεις 2-5 έχουν ηλεκτροφορηθεί κλινικά δείγματα επιβεβαιωμένα για τους παραπάνω τύπους. Συγκεκριμένα το δείγμα 2 είχε διαγνωστεί θετικό για τους HPV58 και 31, το δείγμα 3 θετικό στους HPV58 και 51, το 4 στους HPV 31 και 51 ενώ τέλος το 5 είχε διαγνωστεί θετικό στον HPV 31. Η διάγνωση των θετικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα της Multiplex PCR όπως φαίνεται στην εικόνα. Τέλος στη θέση 6 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, το οποίο όπως φαίνεται στην εικόνα δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης.

1.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της Multiplex PCR και για τα 3 μείγματα

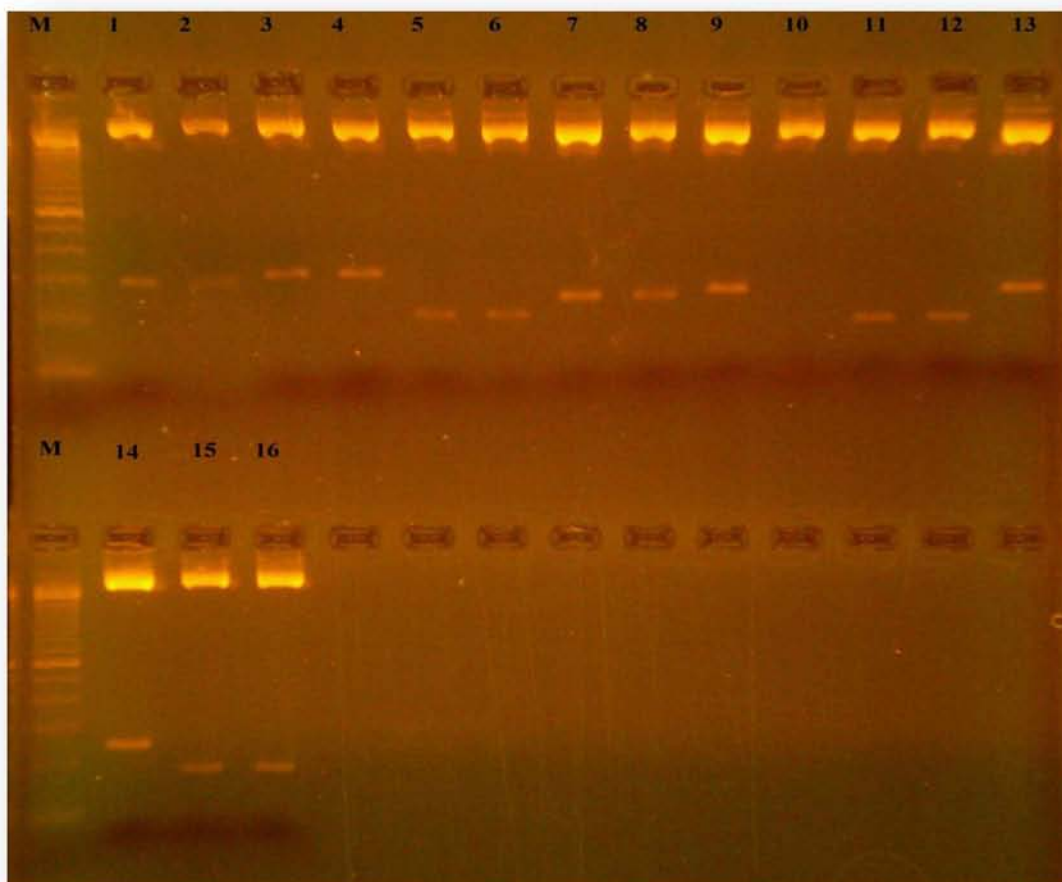
Συνοψίζοντας λοιπόν στην παρούσα εργασία υποβλήθηκαν σε Multiplex PCR συνολικά 90 κλινικά δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν στο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Άγιος Σάββας, στο Αττικό Νοσοκομείο και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα αυτά ήταν ήδη ταυτοποιημένα για HPV τύπους με τεχνικές οι οποίες στοχεύουν στα E6/E7 ιικά ογκογονίδια (Πίνακας 2). Με βάση τα αποτελέσματα της Multiplex PCR με τη χρήση των τυποειδικών εκκινητών για την ενίσχυση του L1 γονιδίου, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των εκάστοτε τύπων HPV και στα 90 δείγματα. Ωστόσο σε μερικά από τα υπό εξέταση δείγματα ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επιπλέον τύποι HPV. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν επιπλέον τύποι HPV με τη βοήθεια της Multiplex PCR.

Πίνακας 7. Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων, αποτελέσματα ταυτοποίησης των δειγμάτων όπως δόθηκαν από τη πηγή προέλευσης καθώς και τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των δειγμάτων με τη Multiplex PCR

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Τύποι HPV που ανιχνεύθηκαν με παλαιότερες μεθόδους	Τύποι HPV που ανιχνεύθηκαν με τη παρούσα Multiplex PCR
ΠΝΛ12	16, 51	16, 51, 58
ΠΝΛ22	31	31, 51
ΠΝΛ28	31	31, 58
ΑΤΤ6	16, 31, 58	16, 31, 51, 58
ΑΤΤ16	16, 33	16, 18, 33
3113	18, 35	18, 35

2. Αποτελέσματα πέψης προϊόντων κλωνοποίησης

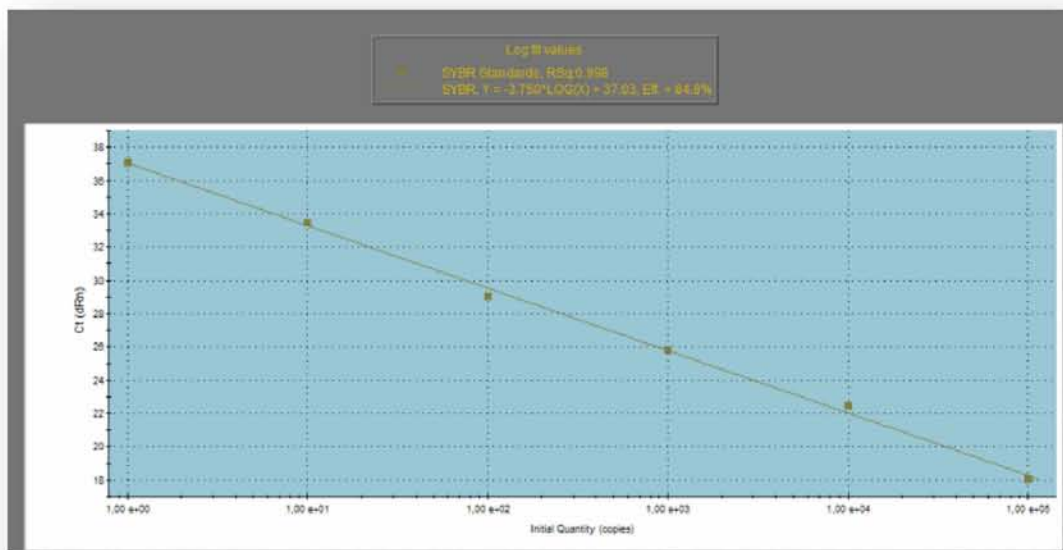
Για να επιβεβαιωθεί ότι η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και ότι έγινε η ένθεση της επιθυμητής αλληλουχίας στην θέση ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη μικρής ποσότητας των φορέων με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Κατόπιν ακολούθησε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και τα αποτελέσματα παρατίθενται στην **εικόνα 18**. Σε κάθε δείγμα που ηλεκτροφορήθηκε παρατηρείται μια ζώνη περίπου στις 2072 bp η οποία αντιστοιχεί στο πλασμιδιακό DNA και άλλη μια ζώνη ύψους 155-293 bp, δηλαδή το τμήμα του L1 γονιδίου του εκάστοτε HPV που κλωνοποιήθηκε επιτυχώς. Για κάθε αλληλουχία που κλωνοποιήθηκε συλλέχθηκαν δυο κλώνοι για κάθε τύπο HPV (C1,C2). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κλωνοποίησης των 8 από τους 9 τύπους HPV. Συγκεκριμένα οι θέσεις 1-2 αντιστοιχούν στον HPV 18 C1/C2 (292bp), οι 3-4 στον HPV 31 C1/C2 (291bp), οι 5-6 στον HPV 33 C1/C2 (202bp), οι 7-8 HPV 35 C1/C2 (227bp), οι 9-10 στον HPV 45 C1/C2 (233bp), οι 11-12 στον HPV 51 C1/C2 (155bp), οι 13-14 στον HPV 58 C1/C2 (233bp) και τέλος οι 15-16 στον HPV 66 C1/C2 (168bp).



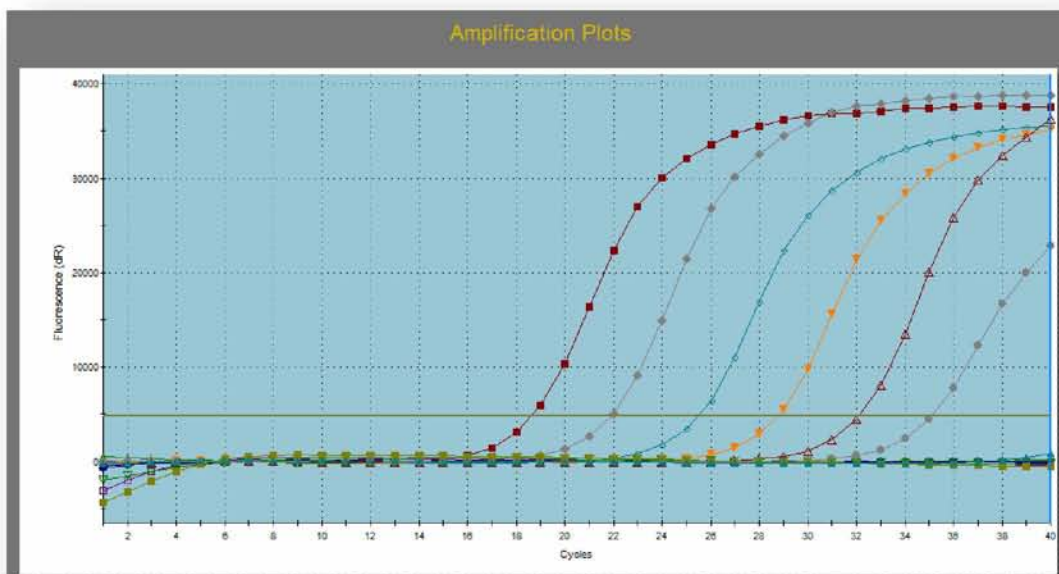
Εικόνα 18. Αποτελέσματα πέψης των προϊόντων κλωνοποίησης με το ένζυμο περιορισμού EcoRI.

3. Αποτελέσματα της Real Time PCR

Με τη διαδικασία των διαδοχικών 10X αραιώσεων που περιγράφηκε παραπάνω προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης κατά την real time PCR και ορίστηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου/τεστ. Με βάση την πληροφορία αυτή οι αραιώσεις των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της real time PCR για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών και των 9 τύπων HPV (HPV16,18,45,58,51,66,35,33,31). Ενδεικτικά η πρότυπη καμπύλη για τον HPV 16 παρουσιάζεται στην **εικόνα 19**. Στην παρακάτω εικόνα (**εικόνα 20**) παρουσιάζεται η γραφική παράσταση (amplification plot) όπως προέκυψε από την ενίσχυση των διαδοχικών 10X αραιώσεων των πλασμιδίων του HPV 16. Στον άξονα χ έχουν τοποθετηθεί τα αντίγραφα των γονιδίων και στον άξονα ψ τοποθετήθηκε ο κύκλος που δίνει σήμα υβριδισμού η Real Time PCR. Από την γραφική παράσταση είδαμε ότι η τελευταία αραιώση $X10^{-10}$ είναι αυτή που δίνει το τελευταίο σήμα ενίσχυσης (ct=37κύκλο). Έτσι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αραιώση $X10^{-10}$ περιέχει 1 αντίγραφο γονιδίου L1/test του HPV 16.

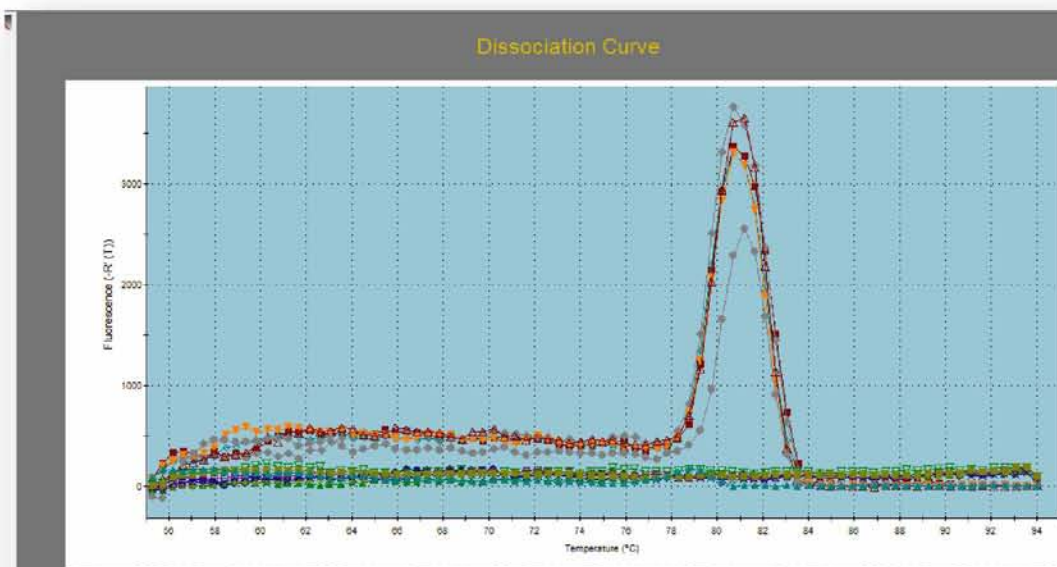


Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη γονιδίου L1 του HPV 16.



Εικόνα 20. Καμπύλες ενίσχυσης του προϊόντος (amplification plots).

Τέλος, στην καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve) στο κατώτερο σχήμα της **εικόνας 21** διαπιστώνουμε την ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης. Όταν μία αντίδραση PCR μας δίνει μόνο τα ειδικά προϊόντα που αναζητούμε τότε όλα τα τελευταία αποδιάσσονται, σύμφωνα με τις συνθήκες της αντίδρασης, σε μία προκαθορισμένη θερμοκρασία. Κατά συνέπεια όλες οι καμπύλες αποδιάταξης τοποθετούνται γύρω από την ίδια θερμοκρασία, όπως φαίνεται και στο σχήμα της **εικόνας 21**.



Εικόνα 21. Καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων (dissociation curve).

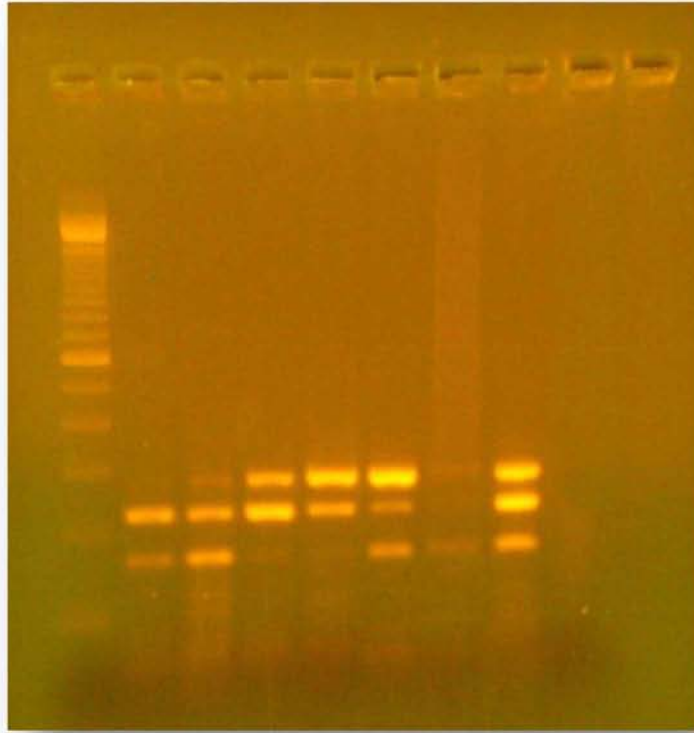
4. Αποτελέσματα πειραμάτων ανταγωνισμού

Στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν και για τα 3 μείγματα όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί διαλυμάτων πλασμιδίων ώστε να προσδιοριστεί ο ελάχιστος αριθμός αντιγράφων που μπορεί να ανιχνεύσει η μέθοδος σε συνθήκες ανταγωνισμού. Αρχικά δημιουργήθηκαν συνδυασμοί πλασμιδίων ξεκινώντας από το 1 αντίγραφο. Ωστόσο δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του 1 αντιγράφου σε συνθήκες ανταγωνισμού και γι αυτό δημιουργήθηκαν εκ νέου διαλύματα με ελάχιστο αριθμό πλασμιδίων τα 10 αντίγραφα. Στην **εικόνα 22** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα ανταγωνισμού για το μείγμα Ι. Στα διαλύματα πλασμιδίων 1-7 περιέχονται τα εξής αντίγραφα:

- 1) 10copies HPV16,100copies HPV66,1000 copies HPV45
- 2) 10copies HPV16,100copies HPV45,1000 copies HPV66
- 3) 10copies HPV66,100copies HPV16,1000 copies HPV45
- 4) 10copies HPV66,100copies HPV45,1000 copies HPV16
- 5) 10copies HPV45,100copies HPV66,1000 copies HPV16
- 6) 10copies HPV45,100copies HPV16,1000 copies HPV66
- 7) 1000copies HPV16,1000copies HPV45,1000 copies HPV66

Η θέση «Μ» αντιστοιχεί στον μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp ενώ τη θέση 8 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 22. Αποτελέσματα ανταγωνισμού για το μείγμα Ι.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του μαστού. Ο βασικότερος παράγοντας ο οποίος ευθύνεται για το 99,9% των περιπτώσεων καρκινικής αλλοίωσης του τραχήλου της μήτρας είναι ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV). Η μόλυνση από HPV είναι μια σεξουαλικά μεταδιδόμενη διαδικασία και ευθύνεται για το θάνατο περισσότερων από 250.000 γυναικών ετησίως σε όλο τον κόσμο. Ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV) έχει παγκόσμια κατανομή και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα από καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις στο ουρογεννητικό σύστημα τόσο των αντρών όσο και των γυναικών. Μάλιστα προβλέπεται ότι στον γενικό πληθυσμό το 75% των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχουν ήδη μολυνθεί με HPV που προσβάλλουν το γενετικό σύστημα. Συνεχής μόλυνση με HPV τύπους υψηλού κινδύνου - και πιο συγκεκριμένα τους τύπους 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, και 68 - μπορεί να προκαλέσουν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου (CIN), του αιδοίου, του πέους (PIN) και του πρωκτού (AIN), αποτελώντας προ-καρκινικές δυσπλασίες που μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο. Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ' επέκταση καρκίνο είναι οι HPV-16 και HPV-18 σε ποσοστό 50% και 23% αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%. Λόγω της ισχυρής συσχέτισης των HPV τύπων με αλλοιώσεις του ουρογεννητικού συστήματος οι οποίες μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο, έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών εντοπισμού και ταυτοποίησης των πιο συχνά εμφανιζόμενων τύπων HPV. Οι πιο ευαίσθητες τεχνικές για το σκοπό αυτό είναι εκείνες οι οποίες βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Έως σήμερα στην PCR χρησιμοποιούνται είτε τυποειδικοί εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν γενωμικές περιοχές όπως τα E6-E7 ιϊκά ογκογονίδια είτε εκφυλισμένοι εκκινητές που στοχεύουν περιοχές συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών HPV τύπων.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής η οποία είναι σε θέση να ανιχνεύει και ταυτόχρονα να ταυτοποιεί τους εννιά πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους HPV υψηλού κινδύνου οι οποίοι εμπλέκονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Σχεδιάστηκαν λοιπόν τυποειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος της L1 γενωμικής περιοχής, της πιο συντηρημένης περιοχής του ιϊκού γενώματος με τα χαμηλότερα επίπεδα μεταλλαξιγένεσης. Στη συνέχεια με τη μέθοδο της Multiplex PCR ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι ογκογόνοι τύποι οι : HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 και 66. Με βάση τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από επιδημιολογικές μελέτες οι τύποι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγκεκριμένη τεχνική έχουν επιλεγεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να καλύπτουν πάνω από το 90% των περιπτώσεων ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που οφείλεται σε HPV λοίμωξη.

Η ανάπτυξη της παραπάνω μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτόχρονα την ταυτοποίηση των πιο συχνά εμφανιζόμενων ογκογόνων τύπων HPV πλεονεκτεί έναντι των ήδη υπάρχουσων τεχνικών. Για παράδειγμα η χρήση εκφυλισμένων εκκινητών για την L1 γενωμική περιοχή επιτρέπει μόνο την ανίχνευση των ιών. Ωστόσο για την ακριβή ταυτοποίηση απαιτούνται περαιτέρω διαδικασίες όπως ο υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων, επεξεργασία με ενδονουκλεάσες περιορισμού ή άμεση αλληλούχιση μετά την αρχική ενίσχυση με PCR της L1 περιοχής. Από την άλλη, η χρήση μοριακών τεχνικών οι οποίες στοχεύουν στις ιϊκές πρωτεΐνες E6-E7 επιτρέπουν την ανίχνευση των ιών σε περιπτώσεις καρκίνου. Είναι γνωστό όμως ότι οι HPV προκαλούν σε αρχικό στάδιο ασυμπτωτική μόλυνση στον ασθενή. Με τη χρήση τεχνικών οι οποίες στοχεύουν στις E6-E7 πρωτεΐνες, η λοίμωξη στα αρχικά στάδια δεν διαπιστώνεται και κατ' επέκταση δεν αντιμετωπίζεται, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να μεταδίδεται στον πληθυσμό. Στις περισσότερες μελέτες η συνηθέστερη ηλικία HPV μόλυνσης είναι μικρότερη των 25 ετών ενώ η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται γύρω από την ηλικία των 50 ετών. Επομένως χρήζει απαραίτητης σημασίας η ανάπτυξη μιας μεθόδου η οποία μπορεί να προβλέπει σε πρώιμα στάδια της μόλυνσης, την πιθανότητα εξέλιξης του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και την μεταβολή της αλλοίωσης σε καρκίνο. Επιπλέον δείγματα με καρκινικές αλλοιώσεις και ταυτοποιημένα για HPV τύπους με τη χρήση εκκινητών για την E6, ελέγχθηκαν με απλή PCR και με τους τυποειδικούς εκκινητές για την L1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δυο τεχνικές είχαν την ίδια ευαισθησία σε προκαρκινικές αλλοιώσεις δηλαδή στο στάδιο που ο ιός δεν έχει ακόμα ενσωματωθεί. Υπενθυμίζεται ότι κατά την ενσωμάτωση γίνεται διάρρηξη του ιϊκού γενώματος και ένα τμήμα, συνήθως από την E1/E2 αλλά πιθανόν και από την L1, χάνεται. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, 90 κλινικά δείγματα επιβεβαιωμένα για HPV τύπους με τεχνικές οι οποίες στοχεύουν στα E6/E7 ιϊκά ογκογονίδια, υποβλήθηκαν σε Multiplex PCR με τη χρήση τυποειδικών εκκινητών για την ενίσχυση του L1 γονιδίου των HPV τύπων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας Multiplex PCR επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των εκάστοτε τύπων HPV και στα 90 δείγματα. Ωστόσο σε 6 από τα 90 δείγματα ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και κάποιοι επιπλέον τύποι HPV.

Συνοψίζοντας λοιπόν, στην εργασία αυτή: α) αναπτύχθηκε μια Multiplex PCR για την ανίχνευση και ταυτόχρονα την ταυτοποίηση των 9 πιο συχνά εμφανιζόμενων τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16,-18,-45,-66,-31,-33,-35,-51,-58) στοχεύοντας με τυποειδικούς εκκινητές στην L1 γενωμική περιοχή του ιού β) αποδείχθηκε ότι η παραπάνω τεχνική είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV τύπων έναντι τεχνικών που στοχεύουν στην E6/E7 περιοχή καθώς σε ποσοστό 6,7% των δειγμάτων που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε με τη χρήση της παρούσας Multiplex PCR η ύπαρξη επιπλέον τύπων HPV γ) πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου για τον κάθε τύπο HPV με τη χρήση ποσοτικής Real time PCR αφού πρώτα σχεδιάστηκαν πρότυπες καμπύλες με τα προϊόντα που προέκυψαν από τη Multiplex PCR και δ) αποδείχθηκε ότι η ελάχιστη δυνατή ανίχνευση ιϊκών αντιγράφων σε συνθήκες

ανταγωνισμού είναι τα 10 αντίγραφα/ τεστ και σε συνθήκες μη ανταγωνισμού 1 αντίγραφο/test.

Η μέθοδος της Multiplex PCR με τη χρήση L1- τυποειδικών εκκινητών έχει ως στόχο σε σύντομο χρονικό διάστημα να ανιχνεύει με ακρίβεια και ειδικότητα τους εννέα πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους HPV οι οποίοι εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή και συμβάλουν στην ανάπτυξη αλλοιώσεων που στην συνέχεια μετατρέπονται σε καρκίνο. Η παρούσα τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί μελλοντικά παράλληλα με το τεστ Pap τόσο για την ανίχνευση της παρουσίας των εννέα πιο συχνά εντοπιζόμενων υψηλού κινδύνου HPV σε κλινικές περιπτώσεις όσο και για την ταυτοποίηση αυτών των τύπων HPV, πληροφορία εξαιρετικής σημασίας για τη εξέλιξη και πρόληψη της ασθένειας. Αν και κάποια διαγνωστικά κέντρα πραγματοποιούν τεστ ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού, εντούτοις αυτό γίνεται με μια πληθώρα αντιδράσεων, διαδικασία χρονοβόρα και ακριβή. Η τεχνική η οποία αναπτύχθηκε λόγω του χαμηλού κόστους θα μπορέσει να ανταγωνιστεί ήδη υπάρχουσες μεθόδους οι οποίες εφαρμόζονται τόσο στην Ελλάδα όσο και στο εξωτερικό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Αριστείδης Γ. Διαμαντής Ν (2008).** Κονδυλώματα και Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον Ιπποκράτη στο εμβόλιο, 15-63
- **Alison A. McBride (2008).** Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. Volume 72:155–205
- **Antson A, Burns E, Moroz V, Scott J, Sanders M, Bronstein B, Dodson G, Wilson S, and Maitland J (2000).** Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature*, 403: 805-809
- **Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM., (2006) .** Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer *J Clin Microbiol*, (5):1755-62
- **Artandi SE, Attardi LD (2005).** Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, (3):881-90
- **Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS. (2006).** Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res*, (1-2):208-211
- **Baker TS, Newcomb WW, Olson NH., Cowser LM, Olson C, Brown JC. (1991).** Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J*, 60: 1445–1456
- **Bank L, Edmond C, Vousden H (1990).** Ability of the HPV 16 E7 protein to bind Rb and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cell. *Oncogene*, 9: 1383-9
- **Barbosa, MS, Vass, WC, Lowy, DR and Schiller, JT (1991).** In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *Journal of Virology*, 1:292-8
- **Bechtold V, Beard P, Raj K (2003).** Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.*, (3):2021-8
- **Bernard HU (2002).** Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir. Ther*, 7: 219–237

- **Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002)**. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55(4): 244-65
- **Brehm ASJ, Nielsen EA Miska DJ, McCance, JL, Reid AJ, Bannister T, Kouzarides T (1999)**. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*, 18:2449-2458
- **Brentjens MH, Yeung-Yue KA, Lee PC, Tyring SK (2002)**. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin*, 20(2):315-31
- **Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004)**. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. (2):751-7
- **Burd EM (2003)**. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Micro*, 16:1-17
- **Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz A (2002)**. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11:1394-9
- **Chakrabarti O, Krishna S (2003)**. Molecular interaction of “high risk” human papillomaviruses E6 and E7 oncoprotein: implication for tumor progression. *J Biosci*, 28(3):337-348
- **Chang YE and Laimins LA (2000)**. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as a major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol*. 74:4174-4182
- **Chen G and Stenlund A (2000)**. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol*. 74:1506-1512
- **Coggin JR and zur Hausen H (1979)**. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res*, 39:545- 546
- **Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib , Orth G (1991)**. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J. Virol*, 65: 4534-4538
- **Craven SE and Brecht DS (1998)**. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell*, 15(4):495-8
- **Cripe TP, T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid III, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek. (1987)**. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*, 6:3745-3753

- **Culp, TD and Christensen, ND (2004)**. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*, 319:152-61
- **Danos O, Katinka M, Yaniv M (1982)**. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*, 1:231–236
- **Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (1998)**. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*, (1):142-50
- **Day, PM, Lowy, DR and Schiller, JT (2003)**. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 307:1-11
- **De Geest, K, Turyk, ME, Hosken, MI, Hudson, JB, Laimins, LA and Wilbanks, GD (1993)**. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecological Oncology*, 49:303-10
- **Desaintes, C., and Demeret, C (1996)**. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* 7:339–347
- **de Villiers, EM, Fauquet C, Broker, TR, Bernard, HU, zur Hausen., et al (2007)**. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *CA Cancer J Clin*, 57:7-28
- **Dostatni N, Lambert R, Ham PM, Howley M and Yaniv M (1991)**. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev*, 5:1657-1671
- **Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C and Crawford L (1991)**. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-827
- **Dyson N, Guida P, Münger K and Harlow E (1992)**. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of Virology*, 66:6893- 902
- **Fang L, Budgeon L.R, Doorbar J, Briggs E.R, Howett M.K (2006)**. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology*, 2:271-279
- **Fay A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J (2004)**. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol*, (24):13447-54

- **Flores E, Allen-Hoffman B. L, Lee D. and Lambert PF (2000).** The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol*, 74:6622-6631
- **Finnen R. L, Erickson K. D, Chen X. S, Garcea R. L (2003).** Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol*, 8:4818-4826
- **Finzer P, Angular – Lemorroy A, Rosl F (2002).** The role of human papillomavirus oncoprotein E6 and E7 in apoptosis: *Cancer Letter*, 188:15-22
- **Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. (2002).** Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*, (19):10009-14
- **Foster S. A, Demers G. W, Etscheid B. G. and 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. Virol*, 68:5698-5705
- **Frattini MG, Lim HB, Laimins LA (1996).** In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiationdependent late gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, 93:3062–7
- **Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway (1997).** Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11:2090-2100
- **Gewin L, Galloway DA (2001).** E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol*, 122:1235-1244
- **Gheit T, Land iS, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F and Tommasino M (2006).** ‘Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types’, *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2025-31
- **Giroglou, T, Florin, L, Schafer, F, Streeck, RE and Sapp, M (2001).** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 75:1565-70
- **Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ , Wheeler CM (1998).** Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3020±3027
- **Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, Galloway DA (1994).** Three-Dimensional Structure of Vaccinia Virus-Produced Human Papillomavirus Type 1 Capsids. *J. Virol.* 4503-4505

- **Ham J, Steger G, Yaniv M., (1994).** Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J*, (1):147-57
- **Harwood CA, Proby CM (2002).** Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis*, 15(2):101-14
- **Hatama S (2011).** Cutaneous Papillomatosis in Cattle. *Journal of DisasterResearch*, 7:319-320
- **Hwang ES, Nottoli T, Dimaio, D (1995).** The HPV16 E5 Protein: Expression, Detection, and Stable Complex Formation with Transmembrane Proteins in COS Cells. *Virology*, 211:227-233
- **Heck Dv, Yee CL, Howley PM, Munger K (1992).** Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papilloma viruw. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 15(10):4442-6
- **Hegde RS, Grossman SR, Laimins LA. and Sigler PB (1992).** Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature*, 359:505-512
- **Heise A (2003).** The clinical significance of HPV. *Nurse Pract*,(10):8-19
- **Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang Hoenil Jo, Jae Weon Kim (2005).** Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. Department of Obstetrics and Gynecology, Cancer Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea. *Cancer Therapy* 3:419-434
- **Hoffmann, R, Hirt, B, Bechtold, V, Beard, P and Raj, K (2006).** Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *Journal of Virology*, 9: 4431-9
- **Howley M, Knipe M, Field N (1996).** Papillomaviridae: The virus and their replication. *Fundamental Virology*, 2045-2076
- **Ian H. Frazer (2004).** Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology* 4, 46-55
- **Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM (1997).** A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCRenzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*, 35:791–5
- **Joyce, JG, Tung, JS, Przysiecki, CT, Cook, JC, Lehman, ED, Sands, JA. (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', *Journal of Biological Chemistry*, 274:5810-22

- **Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K. and Kanda T. (2001).** Human papillomavirus type 16 minor capsid protein 12 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J. Virol*, 75: 2331-2336
- **Kesis TD, Slebos R. J, Nelson W.G, Kastan M. B, Plunkett B. S, Han S. M, Lorincz A. T, Hedrick L. and Cho K. R. (1993).** Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3988-3992
- **Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL. (1994).** Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193):2011-5
- **Klaes R, Woerner SM, Ridder R., et al (1999).** Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*, 99:59
- **Kleter B, van Doorn LJ and Schrauwen L (1999).** Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2508±2517
- **Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996).** Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569):79-82
- **Klumpp DJ, Laimins LA (1999).** Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*, 257:239 246
- **Laimins L. A. (1998).** Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. In D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology, 201-223
- **Lehn H, Villa L., Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G (1998).** Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J. Gen. Virol*, 69: 187-196
- **Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D (2004).** Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol*, (3):478-83
- **Li X, Coffino P (1996).** High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*, 70(7):4509-16

- **Li, X, Beard, P, Estes, PA, Lyon, MK and Garcea, RL (1998).** Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of Virology*, 72:2160-7
- **Liu, JS, Kuo, SR, Broker, TR and Chow, LT (1995).** The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 45: 27283-91
- **Lizard G, Ashfag M. J, Birdsong G. G, Corkill M. E, McIntosh K. M. and Inhorn S. L (1997).** Comparison of single-copy human papillomavirus on isolated cells using a catalyzed signal amplification system. *Gen Point. Diagn. Cytopathol*, 24:112-116
- **Longworth, M. S., and L. A. Laimins (2004).** The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol*, 78:3533-3541
- **Lorincz A (1996).** Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Pap Report*, 7: 1±5
- **Mahdavi A, Monk BJ (2005).** Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538
- **Massimi P, Shai A, Lambert P, Banks L (2008).** HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene*, 27(12):1800-4
- **Middleton K, Peh W, Southern S. A, Griffin H. M, Sotlar K, Nakahara T., et al (2003).** Organization of the human papillomavirus productive life cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol*, 77:10186-10201
- **Middleton K, Peh W, Southern SA, Griffin HM, Sotlar K, Nakahara T, Molden, T, Kraus, I, Karsen, F, Skomedal, H, Nygard, JF and Hagmar, B. (2005).** Comparison of human Papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4136 women, 30 years of age with a 2- year follow up of High grade Squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14:367-372
- **Munger, K, Werness,B, Dyson, N, Phelps, W, Harlow E, Howley P (1989).** Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO Journal*, 8:4099-4105
- **Nguyen M, Kraft R, Aubert M, Goodwin E, DiMaio D, Blaho J (1989).** p53 and non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer*, 43:672–6
- **Nguyen M, Kraft R, Aubert M, Goodwin E, DiMaio D, Blaho J (2007).** p53 and hTERT determine sensitivity to viral apoptosis. *J Virol*, 81(23):12985-95

- **Oren M (2003)**. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 10(4):431-42
- **Parkin M, Bray I and Devesa S (2001)**. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer*, 37: S4–S66
- **Patrick F, Lemarroy A, Rösl F (2002)**. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Science*, 188:15–24
- **Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE (2004)**. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*, 364(9430):249-56
- **Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang C, Ho, Klein R and Burk R (1997)**. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:1304-1310
- **Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. (2004)**. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol*, 13:7199-207
- **Rebrikov D, Bogdanova E, Bulina M and Lukyanov A (2002)**. A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtractive hybridization. *Molecular Biology*, 36: 813-820
- **Romanczuk H, Thierry F, Howley PM, (1990)**. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol.*, 64(6):2849-59
- **Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. (1994)**. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.*, (10):6432-45
- **Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein F (1996)**. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells', *Journal of Virology*, 70:1912-22
- **Sedman J. and Stenlund A. (1998)**. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72:6893-6897
- **Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stoppler MC, Koval D, Schlegel R (1997)**. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology*, 237:296–306
- **Smotkin D and F O Wettstein, (1986)**. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(13): 4680–4684

- **Sotlar, K, Diemer, D, Dethleffs, A, Hack, Y, Stubner, A, Vollmer, N, Menton,S, Menton, M, Dietz, K, Wallwiene,r D, Kandolf, R and Bültmann, B (2004).** Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:3176-84
- **Stanley, MA, Browne, HM, Appleby, M and Minson, AC (1989).** Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *International Journal of Cancer*, 43: 672-6
- **Steenbergen RD, de WJ, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ(2005).** HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*, 1:S25-S33
- **Steger, G., and S. Corbach (1997).** Dose-dependent regulation often early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol*, 71:50-58
- **Titolo, S, Welchner, E, White, PW and Archambault, J (2003).** Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy. *Journal of Virology*, 9:5512-5518
- **Tucker RA, Unger ER, Holloway BP, Swan DC (2001).** Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Mol Diagn*, 6:39–47
- **Ustav M, Stenlund A (1991).** Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames *EMBO J.*(2):449-57.UV activation. *Virology*, 263:388–94
- **Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R (2001).** Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 75(9):4467-72
- **Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P. and Bagchi S.(2001).** Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV –containing cervical tumor cells. *Oncogene*, 20:4740-4749
- **Wang YW, Chang HS, Lin CH, Yu WC (2007).** HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(2):402-12
- **Weintraub S. J, Chow K. N, Luo R. X, Zhang S. H, He S. and Dean D. C (1995).** Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature*, 375:812-815
- **Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004).** Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*, 4:64
- **Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990).** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248(4951):76-9

- **Wilson R, West M, Woytek K and Rangasamy D (2002).** Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*, 24:275-90
- **Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA (2005).** Role of the E1--E4 protein in the protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*, 79(11):6732-6740
- **Wright, TC (2006).** Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system', *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 94: 22-31
- **You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K and Howley PM (2004).** Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 117:349-60
- **Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM (1999).** Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*, 263:388-94
- **Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker (2006).** Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci*, 11: 2286–2302
- **Zur Hausen, H (1996).** Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288(2):F55-78