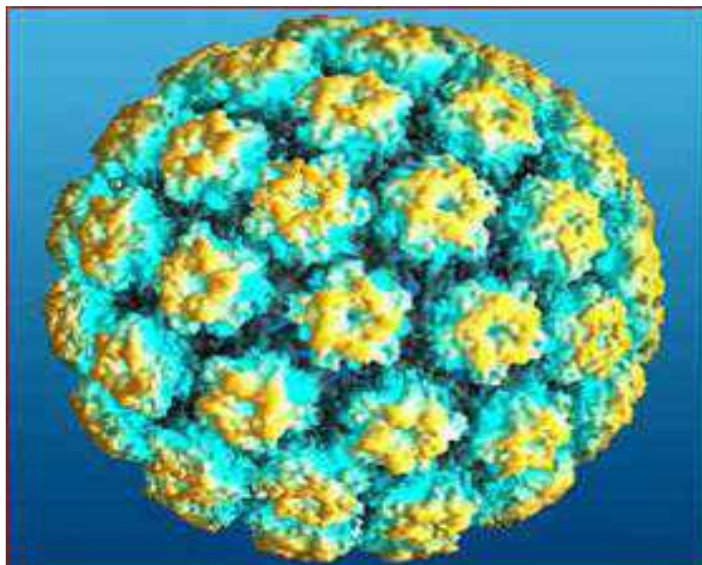


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ HPV 16 ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΙΣ  
ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ Ε6 ΚΑΙ Ε7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΙΣ ΑΝΩΤΕΡΩ  
ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΣΟΒΑΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ  
ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ; ΤΑ ΜΗ ΕΥΡΩΠΑΪΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ  
ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟ ΜΕ ΤΙΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ;**



**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

**Φυλογενετική ανάλυση HPV 16 κλινικών στελεχών στις  
γενωμικές περιοχές E6 και E7. Μεταλλάξεις στις ανωτέρω  
γενωμικές περιοχές συνδέονται με τη σοβαρότητα των  
αλλοιώσεων; Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη συνδέονται  
περισσότερο με τις νεοπλασίες;**

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Επιβλέπων Καθηγητής :** Μαρκουλάτος Παναγιώτης

### **Τριμελής Επιτροπή**

**Π. Μαρκουλάτος :** Καθηγητής Εφαρμοσμένης  
Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία  
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ζ. Μαμούρης :** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δ. Μόσιαλος :** Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων  
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κατάθεση Πτυχιακής εργασίας : 1-10-2010

*Στη μνήμη της  
μητέρας μου*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο για την ανάθεση της εργασίας αυτής, γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με τη διερεύνηση του ιού HPV-16, ο οποίος ευθύνεται για την ογκογόνο εξαλλαγή των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Τον ευχαριστώ επίσης για τη στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής, αλλά και για την επίβλεψη της συγγραφής της.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη και στον Λέκτορα κ. Μόσιαλο Δημήτριο, ως μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για τις παραινέσεις και τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δημήτριο Τσακογιάννη για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε στο εργαστηριακό τμήμα της εργασίας, αλλά και στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων της μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τη φίλη ιατρό-μικροβιολόγο κ. Καλή Μακέδου για την υποστήριξή της στην επιμέλεια του κειμένου και για το ενδιαφέρον και την συμπαράσταση που μου έδειξε κατά την συγγραφή της μελέτης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ PAPILLOMA ΙΩΝ HPV.....	7
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά .....	7
1.2. Παράγοντες κινδύνου για την HPV λοίμωξη.....	8
1.3. Μετάδοση του ιού HPV.....	9
1.4. Ταξινόμηση των ιών Papilloma .....	9
1.5. Δομή ανθρώπινων ιών Papilloma (HPV) .....	12
1.5.1. Καψίδιο .....	12
1.5.2. Γονιδίωμα.....	13
1.5.2.1. Πρωτεΐνη E1 .....	14
1.5.2.2. Πρωτεΐνη E2.....	15
1.5.2.3. Πρωτεΐνη E4.....	15
1.5.2.4 Πρωτεΐνη E5.....	16
1.5.2.5 Πρωτεΐνες E6 και E7.....	17
Δομή και δράση της ογκοπρωτεΐνης E6.....	18
Δομή και δράση της ογκοπρωτεΐνης E7 .....	19
1.5.2.6 LCR (Long Control Region) .....	21
1.6. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HPV.....	23
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	23
1.6.2. Ενσωμάτωση του ιού .....	24
1.6.3. Αντιγραφή του ιικού γενώματος .....	25
1.6.4. Μεταγραφή του ιικού γενώματος .....	26
1.6.5. Δημιουργία ιοσωματίου .....	26
2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ HPV .....	28
2.1. Test Παπανικολάου (test pap) .....	28
2.2. Μέθοδοι για τη διάγνωση του Ιού .....	28
2.2.1. Μέθοδοι ενίσχυσης του σήματος .....	28
α) Μέθοδος υγρής φάσης ( Hybrid Capture 2, HC2) .....	28
2.2.2. Μέθοδοι ενίσχυσης στόχου.....	29
2.2.2.1. Μικροσυστοιχίες .....	29
2.2.2.2. PCR με χρήση εκκινητών συναίνεσης ( conseusus primers).....	29
2.2.2.3. Τυπο-ειδική PCR .....	29
2.2.2.4. Real Time PCR .....	29
2.2.2.5. Ενίσχυση του mRNA του ιού .....	30

2.2.2.6. Nested PCR .....	30
3. ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ .....	31
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
4.1. Κλινικά δείγματα .....	32
4.2. Απομόνωση DNA από δείγματα σε ThinPrep .....	32
4.3. Απομόνωση DNA από κλινικά δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος σε πλακάκι .	33
4.4. Εκκινητές (primers).....	34
4.5. PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) .....	35
4.5.1. Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης .....	35
4.5.2. PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934 .....	36
4.5.3. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing).....	37
4.5.4. Μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας .....	37
4.5.5. PCR με τους εκκινητές 41-757.....	38
4.5.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR .....	38
4.6. Κλωνοποίηση .....	39
4.6.1. Autonested GoTaq Flexi PCR .....	39
4.6.2. Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων της Autonested GoTaq PCR .....	40
4.7. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing) .....	43
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
5.1. Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης .....	44
5.2. PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία.....	44
5.3. Αποτελέσματα από την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών .....	45
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	53

# 1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ PAPILLOMA ΙΩΝ HPV

## 1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των θηλωμάτων αποτελούν μια ομάδα DNA ιών, που προκαλούν θηλώματα στα ανώτερα θηλαστικά και στον άνθρωπο. Η ονομασία των Papilloma ιών προέρχεται από την λατινική λέξη papilla: θήλυ ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma που σημαίνει όγκος. Οι ιοί αυτοί συγκροτούν μια ετερογενή ομάδα, την Papillomaviridae όπου ανήκει και ο HPV (human Papilloma virus) (Zur Hausen. H., 1996).

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος (HPV), διακρίνονται σε αυτούς που προσβάλλουν το δέρμα και προκαλούν δερματικές βλάβες και σε αυτούς που προσβάλλουν τους βλεννογόνους και προκαλούν κονδυλώματα (Howley P.M., Lowy D.R., 2001). Η οικογένεια των HPV περιλαμβάνει πάνω από 100 τύπους, 35-40 από τους οποίους έχουν ιδιαίτερο τροπισμό στο επιθήλιο του γενετικού βλεννογόνου. Από αυτούς, οι HPV 6, 11 ευθύνονται για το 90% των γενετικών κονδυλωμάτων (Shew M.L., Fortenberg J.D., 2005). Η δράση του ιού ως αίτιο για τα κονδυλώματα, είναι γνωστή από το 1923, από τον ερευνητή Ullman ο οποίος έκανε ένεση του ιού στο αντιβραχίο του. Η ογκογόνος δράση του ιού HPV στον τράχηλο της μήτρας είναι γνωστή από τη δεκαετία του '70.

Μόλις το 1983, ανιχνεύθηκε ο ιός στα θηλώματα του λάρυγγα, ενώ τα επόμενα χρόνια έγινε ανίχνευση του ιού σε καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου. Στη δεκαετία του '90 άρχισε να διατυπώνεται η άποψη για την εμπλοκή των ογκογόνων τύπων 16 και 18 στην καρκινογένεση στην περιοχή κεφαλής και τραχήλου.

Τα ογκογόνα στελέχη HPV 16 και 18 ευθύνονται για το 71,5% του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Άλλοι ογκογόνοι τύποι, όπως οι HPV 31, 33, 35, 45, 52, 56 ενοχοποιούνται για το υπόλοιπο 28,5% του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Ανάμεσα στους HPV διακρίνονται οι δερματικοί και εκείνοι που προσβάλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες (Πίνακας 1). Επιδημιολογικές μελέτες, έχουν δείξει ότι μια



ομάδα ιών του βλεννογόνου, έχει ογκογενετικό δυναμικό και είναι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και για το λόγο αυτό ονομάζονται υψηλού κινδύνου (high-risk HPV, hrHPV). Στο φυλογενετικό δένδρο των διαφορετικών τύπων οι hr HPV's, βρίσκονται στις ομάδες A5, A6, A7, A9, A1. Το DNA των hrHPVs ανιχνεύεται σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου (>99,7%) (Doorbar J. 2006). Στη ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk, Mr HPV) ανήκουν τύποι HPV που βρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος, στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας, ή μη ογκογόνοι HPV's ανήκουν οι τύποι εκείνοι που προκαλούν τα κονδυλώματα (Moliju A, et al, 2005; Brink A.A., et al, 2007).

**Πίνακας 1:** Ομάδες επικινδυνότητας των HPV

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

## 1.2. Παράγοντες κινδύνου για την HPV λοίμωξη

Είναι γνωστό ότι πριν την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου, προηγείται μια μακρά περίοδος με κυτταρολογικές και ιστολογικές αλλοιώσεις. Από αυτές όμως, δεν μπορούν να διακριθούν οι περιπτώσεις που θα υποχωρήσουν αυτόματα ή θα εξελιχθούν σε διηθητική νόσο.

Δεν υπάρχουν μελέτες στις οποίες να διαχωρίζονται οι παράγοντες κινδύνου για εμμένουσα λοίμωξη από τον ιό από τους παράγοντες εκείνους που συμβάλλουν στην εξαλλαγή σε νεοπλασία. Πάντως φαίνεται ότι η

εμμένουσα λοίμωξη που προκαλεί ο ιός συνοδεύεται από εξαλλαγή σε νεοπλασία. (Horman AH, 2004)

### **1.3. Μετάδοση του ιού HPV**

Η μετάδοση του ιού στο δέρμα και τους βλεννογόνους, γίνεται μέσω σεξουαλικής επαφής, αυτοενοφλαλμισμού, μολυσμένων αντικειμένων ή απλής επαφής. Έχει επίσης περιγραφεί η κάθετη μετάδοση του ιού σε βρέφη από τη μητέρα τους κατά τον τοκετό.

Στους παράγοντες που σχετίζονται με τη μετάδοση του HPV στον τράχηλο της μήτρας, περιλαμβάνονται ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων, η παρουσία γεννητικών θηλωμάτων στους συντρόφους καθώς και το ιστορικό σεξουαλικής μεταδιδόμενης νόσου στο παρελθόν.

### **1.4. Ταξινόμηση των ιών Papilloma**

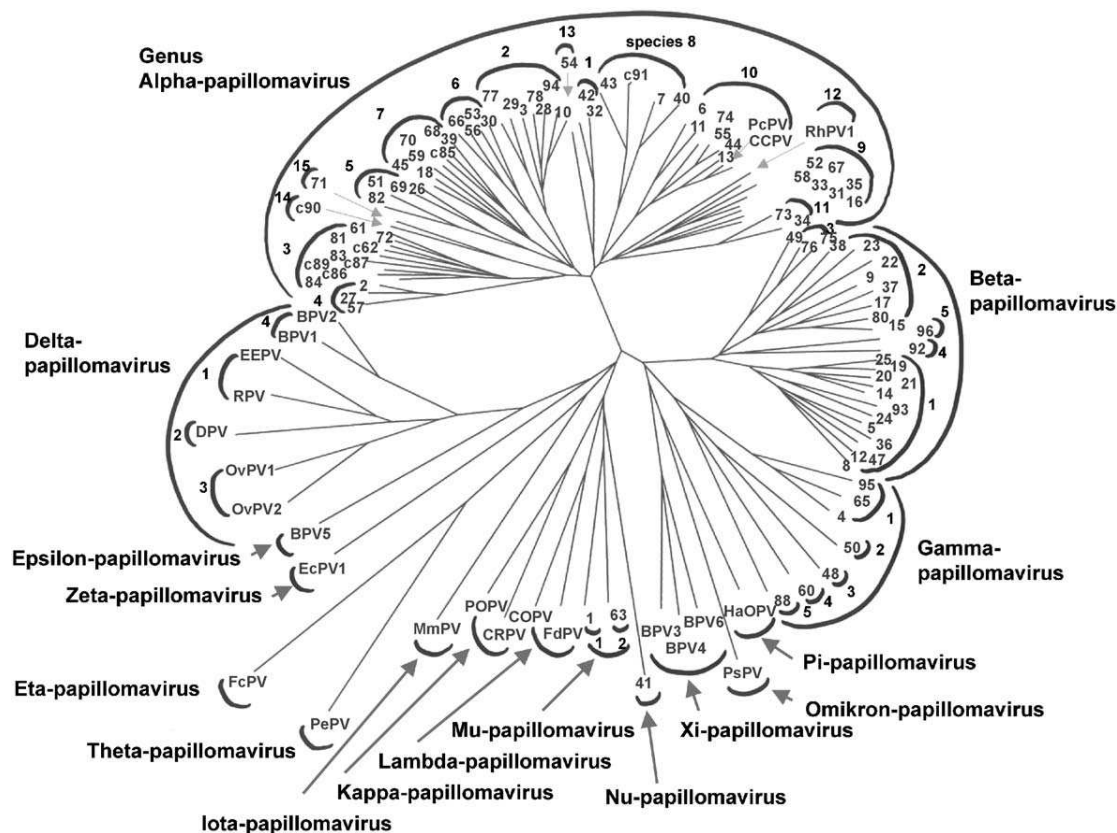
Οι ιοί των θηλωμάτων (Papillomaviruses) αρχικά είχαν ταξινομηθεί μαζί με τους polyoma ιούς και τον ιό SV40 στην οικογένεια των papovaviridae. Η ταξινόμηση βασίστηκε στις δομικές ομοιότητες του καψιδίου και του γενώματος (παρόμοιο δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA) των ιών.

Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι δυο αυτές ομάδες έχουν διαφορετικά μεγέθη και διαφορετική οργάνωση του γονιδιώματος και μικρές ομοιότητες στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων τους (Dertant and Self 1984). Με βάση τα ευρήματα αυτά, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (ICTV), ταξινόμησε τους παραπάνω ιούς σε διαφορετικές οικογένειες: στην οικογένεια των Papillomaviridae, η οποία περιλαμβάνει όλους τους ιούς των θηλωμάτων (papillomaviruses) και στην οικογένεια των polyomaviridae που περιλαμβάνει τους ιούς polyoma (polyomaviruses) (de Villiers E.M. et al., 2004).

Έτσι από την δεκαετία του 1990 έχουν γίνει προσπάθειες ταξινόμησης των ιών Papilloma (PV) με την βοήθεια αλγορίθμων που συγκρίνουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Από την σύγκριση ολόκληρων γενωμάτων, γονιδίων ή τμημάτων των PV, έγινε φανερό ότι προκύπτουν πολύ όμοια φυλογενετικά δέντρα (de Villiers 2004). Επειδή, όμως, αυτού του είδους φυλογενετικά δέντρα θεωρήθηκαν ασαφή, αφού δεν ομαδοποιούσαν τύπους

Papilloma με παρόμοιες βιολογικές και παθολογικές ιδιότητες, η ICTV όρισε να χρησιμοποιείται η λέξη "γένος" για την περιγραφή Papilloma με υψηλή συγγένεια καθώς και ελληνικά γράμματα για την ονομασία αυτών των γενών. Έτσι οι PVs κατηγοριοποιούνται σε 12 γένη. Η ταξινόμηση γίνεται βάσει του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της L1 καψιδιακής πρωτεΐνης, οπότε όλα τα μέλη έχουν 60% ομοιότητα στο L1. Τα δυο κύρια γένη HPV είναι τα Alpha και Beta PVs στα οποία ανήκουν περίπου το 90% των μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένων HPV (Πίνακας 2).

Από τα 12 γένη, τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu-Papilloma, είναι PVs του ανθρώπου, ενώ τα υπόλοιπα 7 γένη είναι PVs των ζώων (Σχήμα 1). Έτσι, ανάμεσα στο γένος διακρίνονται τύποι (types), υπότυποι (subtypes) και παραλλαγές (variants), ανάλογα με το ποσοστό ομοιότητας της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Εάν η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από άλλα τουλάχιστον 10%, έχουμε διαχωρισμό σε τύπους, εάν διαφέρει από 2-10% σε υπότυπους και εάν διαφέρει λιγότερο από 2% σε variants (de Villiers E. M. et al, 2004).



**Σχήμα 1:** Φυλογενετικό δένδρο με τους 118 ιούς Papilloma (de Villiers et al, 2004)

#### **1.4.1. Alpha Papillomavirus**

Το γένος Alpha-Papilloma, είναι το μεγαλύτερο αριθμητικά γένος και περιλαμβάνει τους Papilloma ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου και το επιθήλιο του δέρματος, όπως ο HPV2 ο οποίος προκαλεί μυρμηκίες, που σπάνια σχετίζονται με καρκίνο.

Περισσότεροι από 30 τύποι, προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και κάποιοι από αυτούς σχετίζονται με αλλοιώσεις που εξελίσσονται σε καρκίνο. Τέτοιοι τύποι, είναι αυτοί που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου με τον HPV16, να αποτελεί τον πιο συχνό HPV υψηλού κινδύνου στο γενικό πληθυσμό και αιτία του 50% περίπου, των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Οι υπόλοιποι τύποι Alpha-Papilloma viruses, κατηγοριοποιούνται ως ενδιάμεσου ή χαμηλού τύπου επικινδυνότητας, ανάλογα με τη συχνότητα που προκαλούν καρκινικές αλλοιώσεις.

Οι χαμηλής επικινδυνότητας HPV, όπως ο HPV11, σχετίζονται σπάνια με τον καρκίνο του τραχήλου. Όμως, μπορούν να προκαλέσουν θηλώματα του γεννητικού συστήματος, που αποτελούν ένα σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, το οποίο αφορά το 1-2% των νεαρών ενήλικων (Doorbar et al., 2006).

#### **1.4.2. Beta Papillomavirus**

Οι Beta-Papillomavirus, τυπικά προσβάλλουν το δέρμα, αλλά χωρίς να προκαλούν αλλοιώσεις. Ωστόσο σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς αλλά και σε άτομα που πάσχουν από μυρμηκιοειδή επιδερμοδυσπλασία (EB), μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Pfister 2003).

#### **1.4.3. Gamma, Mu, Nu-Papillomavirus**

Στα τρία αυτά γένη περιέχονται τα υπόλοιπα στελέχη HPV, που προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται σε καρκίνο (Doorbar et al., 2006).

**Πίνακας 2:** Γένη και στελέχη του HPV

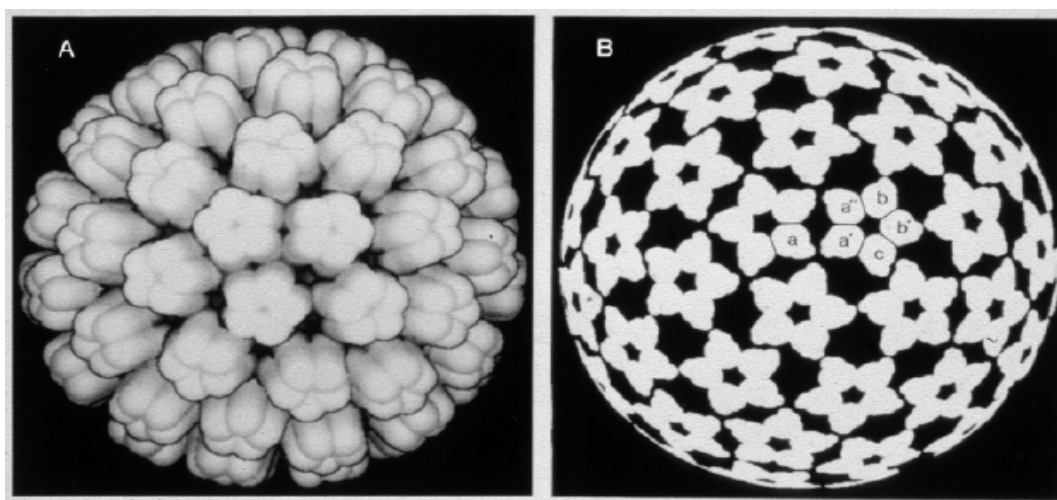
Γένος	Στέλεχος
Beta Papillomavirus	HPV- 2, 5, 8, 107
Gamma Papillomavirus	HPV- 101, 103
Mu Papillomavirus	HPV- 1, 63
Nu Papillomavirus	HPV- 41

### 1.5. Δομή ανθρώπινων ιών Papilloma (HPV)

#### 1.5.1. Καψίδιο

Οι ιοί Papilloma, είναι DNA ιοί με διάμετρο 55-60 nm, έχουν σφαιρικό σχήμα χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Η εξωτερική τους επιφάνειά αποτελείται από το καψίδιο, που συγκροτείται από πρωτεΐνες. Στις πρωτεΐνες του καψιδίου L (Late), ή όψιμες πρωτεΐνες, εντάσσονται οι δομικές πρωτεΐνες του ιού ( L1 και L2), οι οποίες συμμετέχουν στη δημιουργία του σωματιδίου του ιού (Garnett, P.J.,et al 2006 ).

Το καψίδιο αποτελείται από 72 πενταμερή, σχηματίζοντας ένα ιικό κοχύλι με συμμετρία  $T=7$  (όπου το T είναι ο αριθμός που εξηγεί την εικοσαεδρική συμμετρία των καψιδίων) (Kirnbauer et al., 1992) (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου του HPV 16.

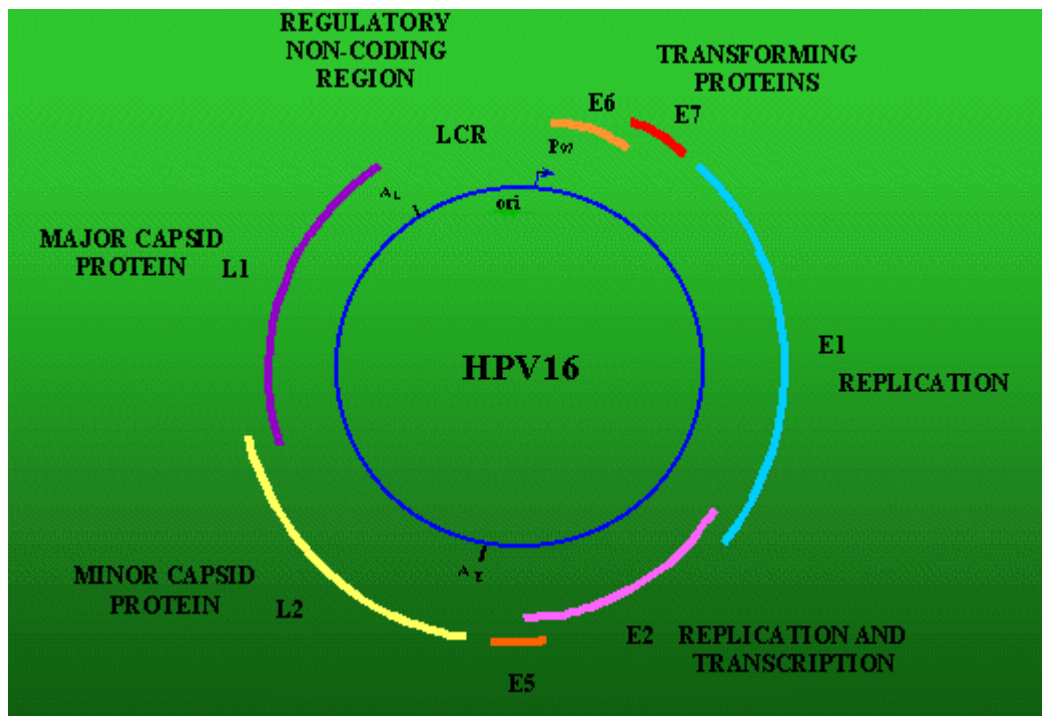
Η πρωτεΐνη L1 είναι η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου και βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στους περισσότερους τύπους του ιού, έχει M.B 55kD και συνιστά το 80% της συνολικής ιικής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει

στην αναγνώριση των ιικών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου. Εσωτερικά της L1, είναι τοποθετημένη η L2 πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει σε μικρότερο ποσοστό στη δημιουργία του καψιδίου και έχει M.B 70 KD (Εικόνα 2). Κύριος ρόλος της L2 είναι το «πακετάρισμα» του ιικού γενώματος στα νεοσυντεθέντα ιικά σωματίδια σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2. Οι δύο πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και, στη συνέχεια, μεταφέρονται στον πυρήνα όπου συμμετέχουν στη συγκρότηση του ιικού σωματιδίου.

### **1.5.2. Γονιδίωμα**

Το γονιδίωμα των HPV αποτελείται από δίκλωνο DNA μεγέθους 8000 bp το οποίο αντιγράφεται ως ένα εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων του ξενιστή (William Harvey, 1976).

Τα ιικά γενώματα έχουν 8 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία εκφράζονται από πολυκυστρονικά mRNA, που μεταγράφονται από την ίδια αλυσίδα DNA. Τα ORFs, διακρίνονται σε πρώιμες E (early), όψιμες περιοχές (late) καθώς και στη ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region). Οι πρώιμες περιοχές κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E3, E4, E5, E6 και E7. Οι όψιμες περιοχές κωδικοποιούν τις L1 και L2 πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο. Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR του γενώματος, η οποία ονομάζεται και URR (upstream regulatory region), έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει ORFs στην αλληλουχία της. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και της αρχής του γονιδίου E6 (Demeret et al., 1995) (Σχήμα 3).

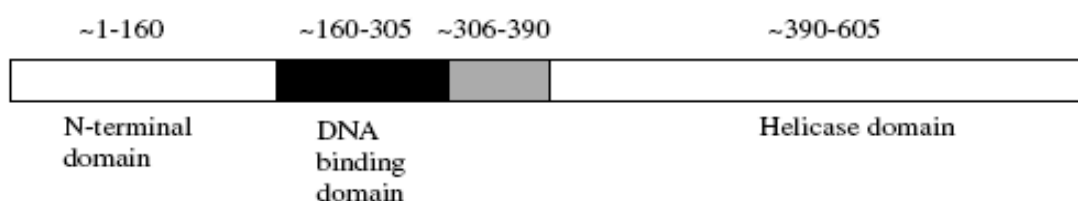


**Σχήμα 3:** Ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) του HPV-16

#### 1.5.2.1. Πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 (Σχήμα 4) είναι μια ελικάση (πρωτεΐνη που συμβάλλει στο άνοιγμα της έλικας του DNA), μεγέθους περίπου 70-80kD, η οποία προσδένεται ειδικά στην περιοχή έναρξης αντιγραφής του ιικού DNA (origin of replication) (Ustav and Stelund, 1991), και «προσελκύει» κυτταρικά ένζυμα και παράγοντες αντιγραφής DNA για να πραγματοποιηθεί ο αναδιπλασιασμός του ιικού DNA.

Η E1 έχει μικρή συγγένεια με την περιοχή έναρξης αντιγραφής του ιικού DNA και η πρόσβασή της στην περιοχή αυτή, υποβοηθείται από την E2 με την οποία σχηματίζει σύμπλοκο E1-E2 και έτσι προσδένεται με υψηλή συγγένεια στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής.

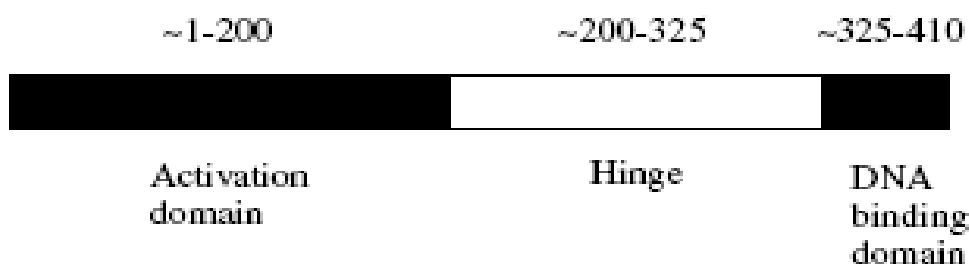


**Σχήμα 4:** Σχηματική απεικόνιση της περιοχής της πρωτεΐνης E1.

### 1.5.2.2. Πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 (Σχήμα 5) έχει μέγεθος περίπου 50 kDa και είναι διμερής. Έχει ως στόχο την αναγνώριση από το μεταγραφικό σύστημα του ξενιστή της θέσης έναρξης των E πρωτεϊνών του ιού, δηλαδή την αναγνώριση του σημείου ori (αφετηρία αντιγραφής) που συνορεύει με τα γονίδια του πρωτεϊνικού διδύμου E6 και E7 που είναι κυρίως υπεύθυνα για την ογκογόνο δράση του ιού (Deug W, et al, 2004). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η E2 συνδέεται σε απομακρυσμένες από τον εκκινητή του E6 γονιδίου περιοχές, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων (Sp1, TFIIID) και την έκφραση των E6 και E7 γονιδίων. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις η E2 δρα ως καταστολέας της μεταγραφής καθώς προσδένεται σε E2BSs, οι οποίες επικαλύπτουν τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1 και του TFIIID (Demeret C. et al., 1997, Dostathi N. et al., 1991). Έτσι, παρεμποδίζεται η σύνδεση των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων και, συνεπώς, καταστέλλεται η μεταγραφή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σχετίζεται με την απενεργοποίηση του γονιδίου E2 κατά την ενσωμάτωση του ιϊκού γενώματος στο κυτταρικό.



**Σχήμα 5:** Σχηματική απεικόνιση της περιοχής της πρωτεΐνης E2

### 1.5.2.3. Πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 συντίθενται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του HPV και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ORF της E4 εκφράζεται μαζί με τα πέντε πρώτα αμινοξέα της E1, αφού από την E4 απουσιάζει το κωδικόνιο AUG, σχηματίζοντας την σύνθετη πρωτεΐνη



E1<sup>+</sup>E4 (Howley P.M. et al., 1996). Η πρωτεΐνη E1<sup>+</sup>E4 του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: ένα αμινοτελικό άκρο πλούσιο σε λευκίνη, μια κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και μια καρβοξυτελική περιοχή. Η σύνθετη αυτή πρωτεΐνη εκφράζεται σε όλους τους ιούς Papilloma στην όψιμη φάση του κύκλου της ζωής τους και φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων, επάγοντας την καταστροφή του δικτύου. Έτσι, συμβάλλει στην απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματίων. Στους HPV-16 και 11 η κοινή έκφραση της E4 με την E1 έχει ως στόχο το σταμάτημα του κύκλου στη φάση G2 πριν τη μίτωση με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ογκοπρωτεϊνών E6/E7 (Wilson R, et al, 2007; Kim S.W. and Yang J.S., 2006)

Συνεπώς, η E4 φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιικού γενώματος, επηρεάζοντας τη διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια από τις δράσεις της E4 είναι η αναστολή της ανάπτυξης μέσω της δέσμευσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53 (Massimi P. et al, 1999).

#### **1.5.2.4 Πρωτεΐνη E5**

Είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη, που αποτελείται από 83 αμινοξέα και εντοπίζεται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στα συστήματα Golgi και περιστασιακά σε κυτταρικές μεμβράνες.

Η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται τόσο στο όψιμο όσο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του HPV. Κύριος ρόλος της είναι η αποσταθεροποίηση της λειτουργίας πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών του μολυσμένου κυττάρου. Πιθανολογείται ότι η E5 δρα μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF receptor), αφού όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al., 1993). Τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης δείχνουν ότι η E5 πιθανόν να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al, 2005).

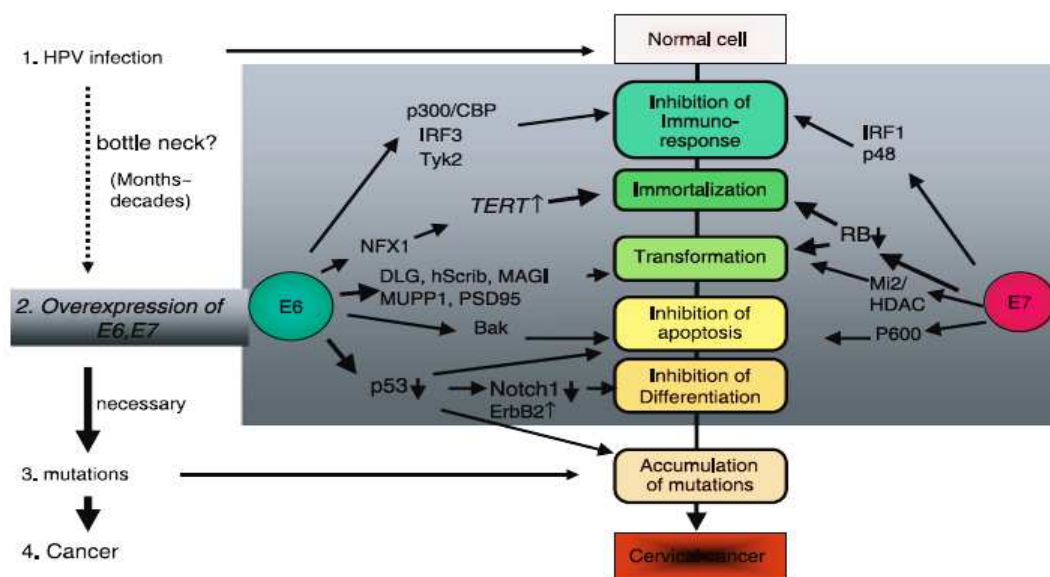
Τέλος, εικάζεται ότι η E5 συμμετέχει στην αρχή της διαδικασίας καρκινογένεσης και όχι στην πρόοδο της νόσου ( Kim SW, Yang JS, 2006).

### 1.5.2.5 Πρωτεΐνες E6 και E7

Είναι οι κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού. Εκφράζονται ως ένα ενιαίο μεταγραφικό προϊόν και προκαλούν πολλαπλές διαταραχές στο βιολογικό κύκλο του ξενιστή (Σχήμα 6). Τα γονίδια των ογκοπρωτεϊνών, βρίσκονται σε συνεχόμενες θέσεις στο γονιδίωμα. Στοιχεία συνηγορούν στο ότι οι δύο πρωτεΐνες δρουν με συμπληρωματικό τρόπο. Ωστόσο, το κυριότερο τους κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι φέρουν περιοχές που τις καθιστούν ικανές να συνδέονται με το DNA αλλά και να σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες του ξενιστή που συνδέονται με το DNA (μεταγραφικοί παράγοντες).

Η δομή η οποία επιτρέπει στις πρωτεΐνες αυτές, να συνδέονται με το DNA, είναι οι περιοχές, γνωστές και ως δάκτυλοι ψευδαργύρου (zinc finger) (Garnett, PJ Duerksen-Hughes 2006, Mclutyr MG, 1993 )

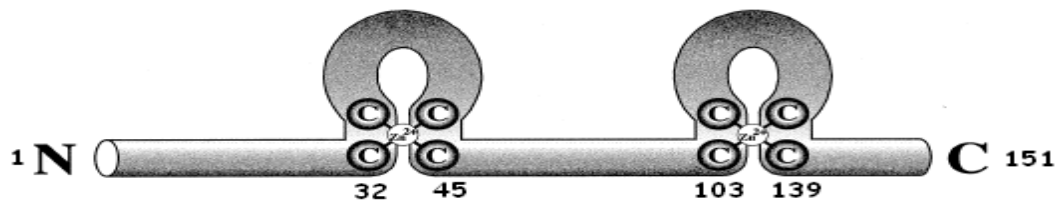
Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου, μπορούν να αναγνωρίσουν περιοχές του DNA που συχνά προηγούνται της θέσης έναρξης μεταγραφής, όπου συνδέεται η RNA πολυμεράση. Με την ιδιότητά τους αυτή, οι πρωτεΐνες με δακτύλους ψευδαργύρου, μπορούν να επηρεάσουν τη δημιουργία “μεταγραφικού συμπλόκου” τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης και συνεπώς την έκφραση γονιδίων.



**Σχήμα 6:** Συμβολή πρωτεϊνών E6 και E7 στην πρόκληση καρκίνου τραχήλου της μήτρας.

### Δομή και δράση της ογκοπρωτεΐνης E6

Η E6 είναι μια μικρή πρωτεΐνη 150 αμινοξέων με μοριακό βάρος 19kD που διαθέτει 2 περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου και έτσι μπορεί να αναγνωρίσει περιοχές του DNA (Σχήμα 7) (Ishiji T., 2000 και Garnett TJ and Duerksen-Hughes PJ 2006). Εντοπίζεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του ιού με το κύτταρο ξενιστή. Είναι πρωτεΐνη πολύ σημαντική για τον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού και έχει ενοχοποιηθεί ότι συμβάλλει στην σταθερή διατήρηση του DNA του ιού στα κερατινοκύτταρα.

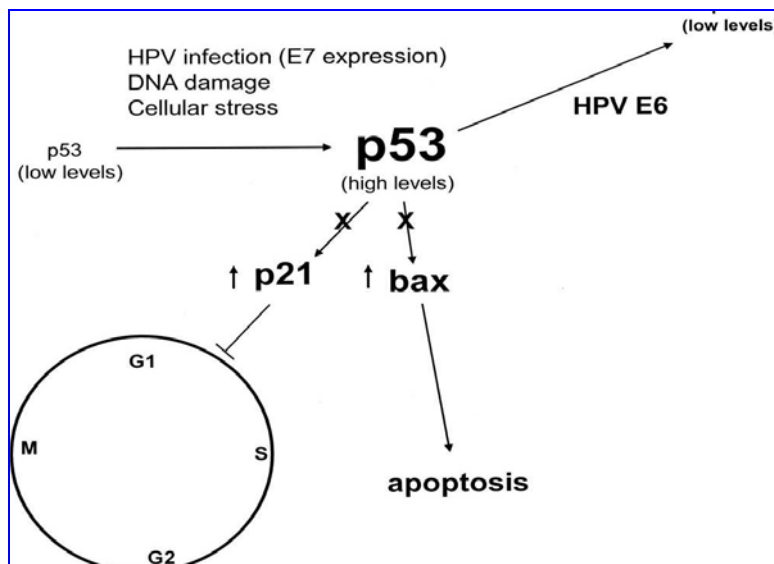


**Σχήμα 7:** Η πρωτεΐνη E6 του HPV 16

Ο μηχανισμός με τον οποίο η E6 επιδρά στο κύτταρο και συμβάλλει στην ογκογένεση, είναι η δημιουργία συμπλόκου με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, με αποτέλεσμα να προσδίδεται αθανασία σε μερικά είδη επιθηλιακών κυττάρων (Fau X, Chen JI, 2004 και Fau X, et al, 2005). Το σύμπλοκο E6-p53 “σημαίνεται” με ένα μόριο ουβικιτίνης, με αποτέλεσμα να οδηγείται στο πρωτεάσωμα και να αποδομεύεται, δηλαδή να διασπάται σε πεπτίδια. Η καταστροφή της p53, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των μηχανισμών στους οποίους συμμετέχει η p53, με πολλά ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Σχήμα 8) (Fau X et al, 2005) όπως:

α. Απώλεια ελέγχου πριν την έναρξη της φάσης S (διπλασιασμός DNA). Συγκεκριμένα, η “καθυστέρηση” πριν την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου επιτρέπει την διόρθωση τυχών λαθών που προκύπτουν από μεταλλαξιγόνους παράγοντες (Fau X et al, 2005)

β. Απώλεια ελέγχου του μηχανισμού απόπτωσης με αποτέλεσμα να επιβιώνουν κύτταρα με ατυπίες (Veldman T et al, 2001) .



**Σχήμα 8:** Αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης p53 από την πρωτεΐνη E6

Υπάρχουν ωστόσο και άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων η ογκοπρωτεΐνη E6 των HPV υψηλού κινδύνου, καθιστά τα κύτταρα αθάνατα.

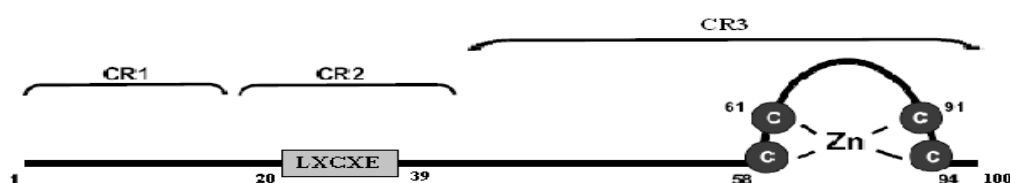
Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης. Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεϊκό-πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το οποίο αποτελείται τουλάχιστον από την ανάστροφη καταλυτική τρανσκριπτάση (hTERT) και από ένα RNA συστατικό (hTR). Η πρωτεΐνη E6 προάγει την υπερέκφραση της υπομονάδας hTERT της τελομεράσης με αποτέλεσμα το ένζυμο να δρα ασταμάτητα και να αποτρέπει τη γήρανση των προσβεβλημένων από τον HPV-16 κυττάρων (Nguyen ML, Kraft RM, 2007 και Veldman T et al, 2001)

Τέλος, η πρωτεΐνη E6 των hrHPV συμβάλλει στην ογκογένεση και μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή PDZ, όπως οι DLG, MAGI, MUPPI, PSD95 και hScribb. Η προκαλούμενη από την E6 αποδόμηση αυτών των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συνοχής μεταξύ των κυττάρων και τη διαταραχή της δράσης των G-πρωτεϊνών (Narisawa – Saito M, 2007).

### **Δομή και δράση της ογκοπρωτεΐνης E7**

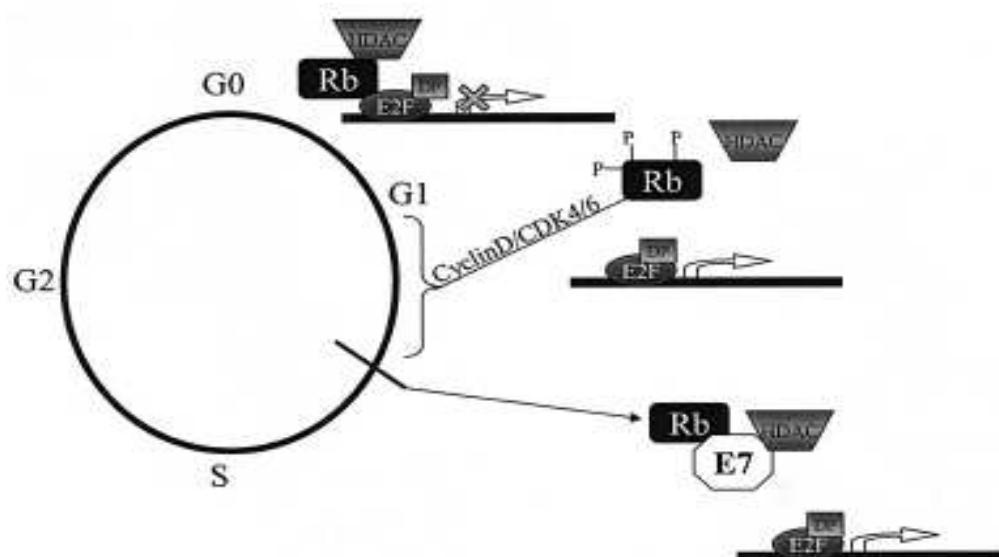
Η πρωτεΐνη E7 των HPV είναι μια μικρή πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη (Σχήμα 9). Η κύρια δράση της E7 των ιών υψηλού κινδύνου (hr HPV) ασκείται μέσω της πρωτεΐνης Rb (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος, pRb). Η E7 χωρίζεται

σε τρεις περιοχές: την CR1, η οποία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και περιέχει τα κατάλοιπα 1-20, την CR2 που περιέχει ένα μοτίβο LXCXE στο οποίο προσδένεται η Rb πρωτεΐνη (Dyson N. et al., 1989). Η pRb παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αφού αναστέλλει την είσοδο του κυττάρου στη φάση G1 και την μετάβαση στη φάση αναδιπλασιασμού του DNA δεσμεύοντας και αναστέλλοντας τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων E2F.



**Σχήμα 9:** Δομή της πρωτεΐνης E7 του HPV

Ο παράγων E2F μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας μόνο εφόσον απελευθερωθεί, μετά από φωσφορυλίωση, από την pRb η οποία τον κρατάει δεσμευμένο και ανενεργό. (Xin L et al, 2006) Επειδή η E7 έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στη μη φωσφορυλιωμένη pRb, έχει την ικανότητα να διασπά το σύμπλοκο E2F-pRb απελευθερώνοντας τον παράγοντα E2F, ώστε να ανοίξει ο δρόμος προς τους απεριόριστους κυτταρικούς κύκλους. Για την αναγνώριση του συμπλόκου pRb-E2F, παίζει ρόλο η δομή της πρωτεΐνης E7 και συγκεκριμένα η παρουσία δακτύλων ψευδαργύρου (Σχήμα 10).



**Σχήμα 10.** Δράση της πρωτεΐνης E7 του HPV

Από όσα αναφέρθηκαν, οι HPV και ιδιαίτερα οι HPV16, επιτυγχάνουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό την διαταραχή μηχανισμών που εξασφαλίζουν τον έλεγχο της μεταγραφής των γονιδίων, της επιδιόρθωσης των χρωμοσωμάτων και των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου.

Η ταχεία είσοδος σε συνεχόμενες κυτταρικές διαιρέσεις, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ελέγχου της δράσης της pRb από τον E7 και, κατά συνέπεια, την ανεπαρκή επιδιόρθωση του DNA, τη συσσώρευση μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ατυπιών.

Τέλος, τόσο η πρωτεΐνη E7, όσο και η E6, έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν τον παράγοντα που ρυθμίζει την ιντερφερόνη (IRF) και με τον τρόπο αυτό οι HPV προκαλούν εμμένουσες, ασυμπτωματικές λοιμώξεις (Narisawa-Saito M, 2007).

#### **1.5.2.6 LCR (Long Control Region)**

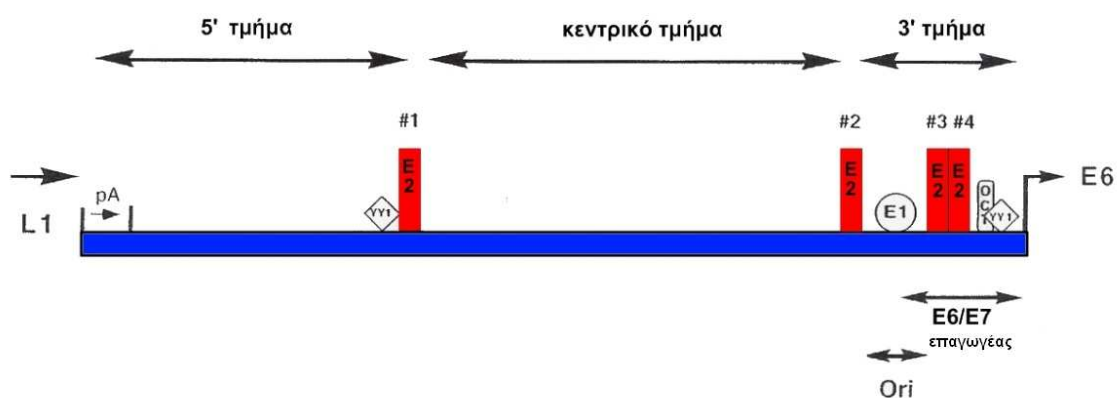
Η ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region), έχει μέγεθος μέχρι και 1000bp και είναι γνωστή και ως URR (Upstream Regulatory Region). Περιέχει θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και την θέση έναρξης της αντιγραφής του γενετικού υλικού του ιού, αλλά δεν φέρει ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Εντοπίζεται μεταξύ του γονιδίου L1 και του γονιδίου E6 (Demeret et al. 1995).

Η LCR περιοχή χωρίζεται σε τρία λειτουργικά τμήματα (Σχήμα 11):

α) το 5' τμήμα, με μέγεθος 300bp, που είναι πλούσιο σε A-T και απαντά σε HPV που ευθύνονται για μολύνσεις του ουρογεννητικού συστήματος. Περιέχει παράγοντες τερματισμού της μεταγραφής και περιοχές πολυαδενυλίωσης (pA) για τα όψιμα μετάγραφα.

β) το κεντρικό τμήμα, με μέγεθος 400bp, που λειτουργεί ως ενισχυτής της μεταγραφής ειδικός για συγκεκριμένους τύπους επιθηλίου (epithelial specific transcription enhancer). Σε αυτό το τμήμα προσδένονται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι NF1, AP1, CEBP, NF-IL, YY1 (Chong T, et. al 1991, Garcia-Carrauca A et al, 1988). Το τμήμα αυτό, απαντά επίσης σε HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα.

γ) το 3' τμήμα της LCR των HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα, έχει μέγεθος 140bp και φέρει το σημείο πρόσδεσης της E1, ένα τμήμα περίπου 45bp που περιλαμβάνει το σημείο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SP1, τα δυο σημεία πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης και ένα TATA Box του επαγωγέα (promoter) του E6 γονιδίου που ακολουθεί. Αυτές οι τέσσερις αλληλουχίες αποτελούν το σύστημα ελέγχου του E6/E7 προαγωγέα (Dostathin et al. 1991, Gloss B et al. 1990, Bouvard N et al. 1994).

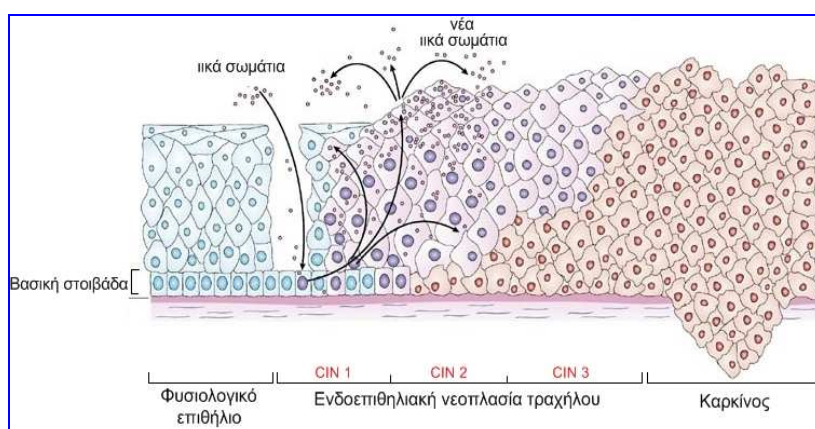


**Σχήμα 11:** Η LCR του HPV-16

## 1.6. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HPV

### 1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο ιός εισέρχεται στο επιθήλιο του γεννητικού βλεννογόνου μετά από μικροτραυματισμούς και εγκαθίσταται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου (Stanley M.A, 2003) (Σχήμα 12).



**Σχήμα 12:** Τα στάδια της μόλυνσης του επιθηλιακού ιστού από τον HPV

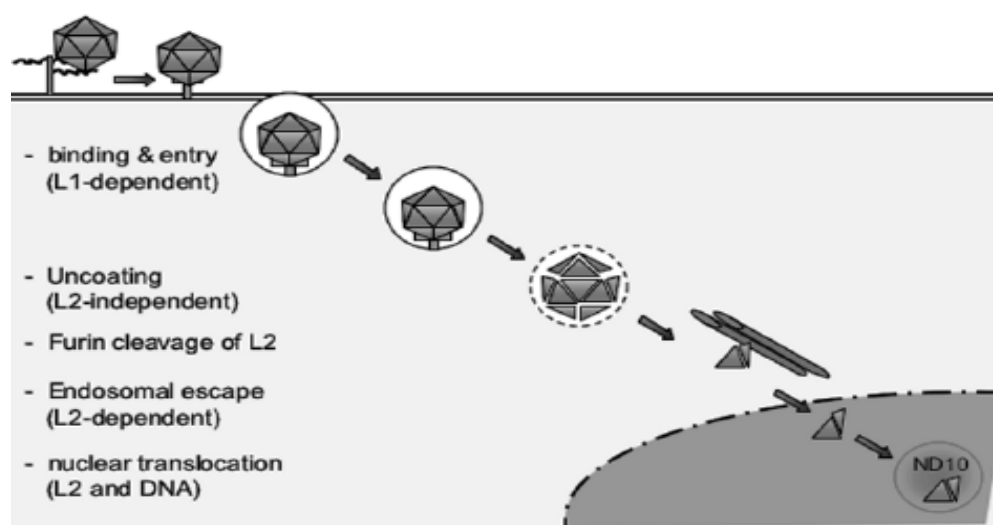
Ως ειδικοί υποδοχείς σύνδεσης του HPV στην κυτταρική μεμβράνη αναγνωρίζονται οι πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας (HSPGs) (Giroglou T et al, 2001; Joyce JC et al, 1999) μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικές η CD44 και η γλυτικάνη. Οι συγκεκριμένες πρωτεογλυκάνες, παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη α6- ιντεγκρίνη, η οποία εκφράζεται με ειδικότητα στα μιτωτικά ενεργά κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας αποτελεί ένα δεύτερο υποδοχέα, που βοηθά την είσοδο του HPV στο κύτταρο ξενιστή (Culp et al, 2006).

Η ενδοκυττάρωση των ιοσωμάτων του HPV, πραγματοποιείται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Day P et al, 2003) με αργούς ρυθμούς. Κατά αυτόν τον τρόπο, ένας αριθμός ιοσωμάτων ενδοκυττάρωνεται απευθείας στα κερατινοκύτταρα. Ένα ποσοστό ιοσωμάτων αποδεσμεύεται από τους υποδοχείς HSPGs των κερατινοκυττάρων και δεσμεύεται στο εξωκυτταρικό στρωματικό παράγοντα Λανίνη-5 (LN5). Ο LN5, παρουσιάζει υψηλό δυναμικό δέσμευσης των ιοσωμάτων του HPV και διαχέεται στο επιθήλιο του τραχήλου



(Aumailley M, et al 2003). Η α6- ιντεγκρίνη, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον παράγοντα LN5. Έτσι, μέσω του παράγοντα LN5 και της α6- ιντεγκρίνης και του συστήματος κλαθρίνης, τα HPV ιοσωμάτια αποκτούν πρόσβαση στα κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας.

Μετά την είσοδό τους στα κύτταρα, τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (Σχήμα 13).



**Σχήμα 13:** Είσοδος του HPV στο κύτταρο-ξενιστή

### 1.6.2. Ενσωμάτωση του ιού

Το ιικό DNA στα πλαίσια της καλοήθους εξεργασίας διατηρείται στον πυρήνα των κυττάρων, συνήθως σε επισωματική μορφή. Αντίθετα, στα καρκινικά κύτταρα ο HPV ανευρίσκεται τόσο ως επίσωμα όσο και ως ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του κυττάρου ( Doorbar J, 2006).

Στην περίπτωση που ο HPV παραμένει ως επίσωμα, έχουμε τη δράση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Οι συγκεκριμένες ογκοπρωτεΐνες παίζουν κύριο ρόλο στην αθανοτοποίηση των προσβεβλημένων κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα, μπορεί να επηρεάσει τις βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, εξαιτίας της μεταβολής του πλαισίου ανάγνωσης (ORI) ( Yu T et al, 2005)

Η ενσωμάτωση δηλαδή, μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, γέννηση του πρώτου καρκινικού κυττάρου. Σύγχρονα δεδομένα, συνηγορούν στο ότι υπάρχει αυξημένη συχνότητα ενσωμάτωσης σε γονιδιακές θέσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη γενετική αστάθεια, τα επονομαζόμενα “κοινά εύθραστα σημεία” (common fragile sites, common IRAs) (Thorland EG, 2003).

Η τυχαία ενσωμάτωση είναι δυνατόν να επηρεάσει το ανθρώπινο γονιδίωμα από ελάχιστα έως καταλυτικά. Η τελική έκβαση δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που στην HPV λοίμωξη, η έκβαση κυμαίνεται από υποκλινική λοίμωξη ως δυσπλασία και καρκίνο.

### **1.6.3. Αντιγραφή του ιικού γένωματος**

Ο HPV πολλαπλασιάζεται σε πολύστιβα επιθήλια, αφού αποκτήσει πρόσβαση στα βλαστικά κύτταρα της βασικής στιβάδας. Ο ιός διατηρείται και αναδιπλασιάζεται κατά την φάση της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων του επιθηλίου. Το ιικό γένωμα αντιγράφεται κατά μέσο όρο μια φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, ταυτόχρονα με το γένωμα του ξενιστή.

Το γένωμα του HPV κωδικοποιεί ένα μικρό αριθμό πρωτεϊνών, γεγονός που τον καθιστά εξαρτώμενο για την αναπαραγωγή του από τον αναδιπλασιασμό του DNA του ξενιστή (Collins Y. et al, 2006)

Το ιικό γένωμα, κωδικοποιεί έξι πυρηνικές πρωτεΐνες από τις οποίες η E1 και E2 είναι υπεύθυνες για τον αναδιπλασιασμό του ιικού DNA που λαμβάνει χώρα κατά φάση (S) του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια ελικάση η οποία προσδένεται στην περιοχή έναρξης αντιγραφής του ιικού DNA (ORI) και προσελκύει κυτταρικά ένζυμα και παράγοντες αντιγραφής του DNA για να πραγματοποιηθεί ο αναδιπλασιασμός του DNA. Η E1 έχει μικρή συγγένεια με την περιοχή έναρξης αντιγραφής του ιικού DNA και η πρόσβαση της υποβοηθάται από την E2.

Η E1 και η E2 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που προσδένεται με υψηλή συγγένεια κοντά στην περιοχή έναρξης αντιγραφής του ιικού DNA. Η πρωτεΐνη E2 δρα και ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας την μεταγραφή σε χαμηλές συγκεντρώσεις και καταστέλλοντάς την σε υψηλές

συγκεντρώσεις. (Frazer J, 2004). Μετά την αντιγραφή του ιικού γενώματος και τη διαίρεση του κυττάρου, τα θυγατρικά κύτταρα, μεταναστεύουν από τη βασική στοιβάδα και έτσι ξεκινά η διαφοροποίηση (Stubenrauch and Laimins, 1999).

#### **1.6.4. Μεταγραφή του ιικού γενώματος**

Η ομάδα των πρώιμων γονιδίων εκφράζεται με την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και εξαρτώνται από τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα P97 (Grassman K. et al, 1996). Δυο από τις μη δομικές πρωτεΐνες ( E1 και E2) έχουν ως αποστολή την αντιγραφή και την DNA μεταγραφή (Stanley M, 2005).

Ειδικά η E2 έχει ως στόχο την αναγνώριση από το μεταγραφικό σύστημα του ξενιστή, της θέσης έναρξης αντιγραφής των E πρωτεϊνών του ιού, δηλαδή την αναγνώριση του σημείου ORI.

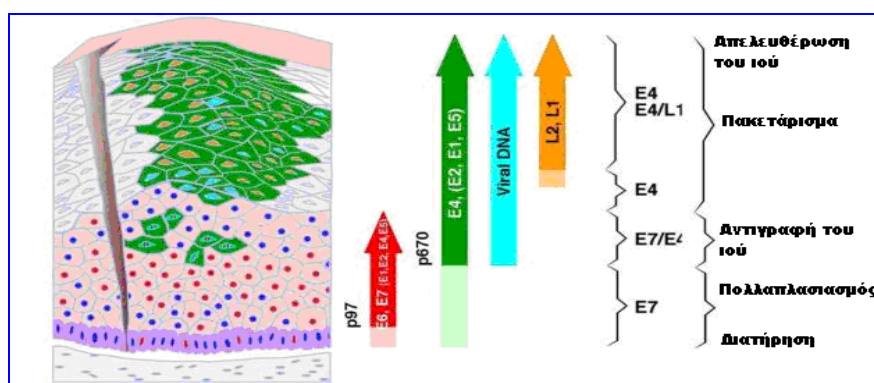
Οι E6 και E7, έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με το DNA και να σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες (μεταγραφικούς παράγοντες) του ξενιστή, οι οποίες έχουν ογκοκατασταλτική δράση ή σχετίζονται με την πορεία του κυττάρου προς την απόπτωση ή δρουν καθοριστικά στη μεταγραφή (Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ, 2006).

Στην όψιμη φάση του ιού, εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1 και L2, που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του καψιδίου. Η έκφραση των γονιδίων αυτών, επηρεάζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα P670. Τα γονίδια E1, E2, E4, E5 κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού, βρίσκονται υπό τον έλεγχο του P670 (Grassman K et al, 1996).

#### **1.6.5. Δημιουργία ιοσωματίου**

Το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής, ολοκληρώνεται με την τοποθέτηση των ιικών αντιγράφων μέσα στα καψίδια. Οι δομικές πρωτεΐνες L1 και L2, συμμετέχουν στη δημιουργία του ιοσωματίου ( Garnett TO, PJ Duerksen-Hyghes, 2006). Και οι δυο πρωτεΐνες, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα όπου συμμετέχουν στο σχηματισμό ιοσωματίου (Σχήμα 14).

Από τις πρώιμες πρωτεΐνες, εκτός από τις E1 και E2, οι υπόλοιπες αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές πρωτεΐνες του κυτταρικού γενώματος, με σκοπό την ενίσχυση του και τον σχηματισμό του καψιδίου. Η E4 σταματά στο στρώμα κερατίνης, η E5 εγκαθίσταται σε ορισμένα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ οι E6 και E7 μαζί με τις L1 και L2, εκφράζονται στην επιφανειακή στοιβάδα. Μετά την ολοκλήρωση της δημιουργίας του, ο ιός απελευθερώνεται από την επιφάνεια του κερατινοκυττάρου. Στη διαδικασία αυτή, συμμετέχει και η πρωτεΐνη E4 η οποία αποδιοργανώνει το πλέγμα κερατίνης του κυττάρου (Doorbar J et al,1991; Waug et al, 2004).



**Σχήμα 14:** Κύκλος ζωής του HPV

## **2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ HPV**

### **2.1. Test Παπανικολάου (test pap)**

Το τεστ Παπανικολάου από το 1950 αποτελεί την πιο επιτυχημένη μέθοδο δευτερογενούς πρόληψης οποιασδήποτε μορφής καρκίνου. Αποτελεί μια κυτταρολογική εξέταση που βασίζεται στην μικροσκοπική ανίχνευση εξαλλαγμένων τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων. Με το test pap, μπορούν να διαγνωστούν βλάβες μετά την έναρξη ή μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας καρκινογένεσης.

Η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων, ποικίλλει για κάθε εργαστήριο, ανάλογα με την εμπειρία του κυτταρολόγου και τον ποιοτικό έλεγχο που διεξάγει.

### **2.2. Μέθοδοι για τη διάγνωση του Ιού**

#### **2.2.1. Μέθοδοι ενίσχυσης του σήματος**

##### **α) Μέθοδος υγρής φάσης ( Hybrid Capture 2, HC2)**

Αυτή η μέθοδος, χρησιμοποιεί μίγμα από ανιχνευτές RNA, που αντιστοιχούν στους τύπους hrHPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Πριν από την ανάλυση τα δείγματα μετουσιώνονται και ο υβριδισμός του ανιχνευτή του HPV DNA που υπάρχει στα δείγματα, ανιχνεύεται με αντισώματα επισημασμένα με υπεροξειδάση, τα οποία αναγνωρίζουν το υβρίδιο RNA/DNA και απεικονίζονται με χημειοφωταύγεια.

Η ευαισθησία της μεθόδου αντιστοιχεί σε περίπου 105 αντίγραφα του γονιδιώματος του ιού HPV16 και είναι χαμηλότερη από αρκετές μεθόδους ενίσχυσης του στόχου. Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις ψευδώς θετικών για άλλα στελέχη του ιού (Brink AA et al, 2007).

##### **β) Μορφολογική**

Σε αυτή την τεχνική γίνεται υβριδισμός in situ σε κυτταρολογικά ή ιστολογικά παρασκευάσματα (Hesselink AT et al, 2004). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με φθορισμό ή εναπόθεση έγχρωμου υποστρώματος και μικροσκοπία φωτεινού πεδίου. Η μέθοδος του υβριδισμού αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία, αλλά είναι αρκετά επίπονη για να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας δοκιμές για τον HPV.

### **2.2.2. Μέθοδοι ενίσχυσης στόχου**

Πρόκειται για μεθόδους με κοινό χαρακτηριστικό την ενίσχυση διαφορετικών περιοχών του ιικού γονιδιώματος μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

#### **2.2.2.1. Μικροσυστοιχίες**

Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα 24 διαφορετικούς τύπους του ιού. Βασίζεται στην τεχνική της PCR μετά από ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού και υβριδισμό με τυπο-ειδικά ολιγονουκεοτίδια, τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε στερεή φάση.

#### **2.2.2.2. PCR με χρήση εκκινητών συναίνεσης ( consensus primers)**

Με τη μέθοδο αυτή, οι τυπο-ειδικοί εκκινητές μπορεί να είναι εκφυλισμένοι, όπως στα συστήματα MYO9/11 και CPI/II ( Gravitt Pe et al, 1998 και Tieben LM et al, 1993). Εναλλακτικά μπορεί να περιέχουν μη-ομόλογες περιοχές αποδεκτές κάτω από συνθήκες PCR χαμηλής αυστηρότητας, όπως τα συστήματα GP5+/6+, IU/IWDO, SPF και Amplicor (van den Brule AI, 2002; Gregoire L, 1981 και Monsonego J, 2005) .

#### **2.2.2.3. Τυπο-ειδική PCR**

Για την ανίχνευση συγκεκριμένου τύπου του HPV μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τυπο-ειδική PCR, στην οποία επιλέγονται μεταβλητές περιοχές νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του συγκεκριμένου τύπου, ώστε να αποκλειστεί ο υβριδισμός με ομόλογες περιοχές άλλου τύπου ( Snijders PI 2003).

#### **2.2.2.4. Real Time PCR**

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της PCR πραγματικού χρόνου, είναι η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του HPV στα δείγματα. Επίσης η Real Time PCR, είναι ενδεικτική για παρουσία ή την απουσία κακοηθειών του τραχήλου (Snijders PJ, 2003).

#### **2.2.2.5. Ενίσχυση του mRNA του ιού**

Η ανάλυση των hrHPV μπορεί να γίνει και μέσω της ανίχνευσης του ιικού mRNA και ιδιαίτερα των περιοχών εκείνων που κωδικοποιούν για τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Πιστεύεται ότι η παρουσία του ιικού E6 και E7 στο τραχηλικό επίχρισμα, έχει καλύτερη προγνωστική αξία για τις κακοήθειες υψηλού βαθμού, επειδή η παρουσία αυτού του mRNA δηλώνει ενεργή μόλυνση ενώ το ιικό DNA μπορεί να είναι παρόν και σε περιπτώσεις που δεν παρουσιάζουν απαραίτητα κλινικό ενδιαφέρον.

#### **2.2.2.6. Nested PCR**

Στη Nested PCR, χρησιμοποιούνται δυο ζεύγη εκκινήτων. Το πρώτο ζεύγος, χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός μεγαλύτερου τμήματος του γενώματος, ενώ το δεύτερο ζεύγος εκκινήτων ενισχύει ένα εσωτερικό τμήμα του. Με τη Nested PCR, μειώνεται η πιθανότητα να ενισχυθεί ξανά ένα λάθος τμήμα.

### 3. ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Τα τελευταία χρόνια η ερευνητική προσπάθεια, οδήγησε στην παραγωγή εμβολίων, τα οποία περιέχουν φυσικές ή ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες της κάψας του HPV. Τα εμβόλια αυτά, έχουν προφυλακτικό ρόλο, βελτιώνοντας το χημικό σκέλος της ανοσίας του κυττάρου του ξενιστή και η εφαρμογή τους, στην κλινική πράξη, αναμένεται να περιορίσει τις λοιμώξεις από τους HPV, με αποτέλεσμα τη μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες.

Στη χώρα μας κυκλοφορούν δυο εμβόλια, ένα τετραδύναμο (Gardasil) που περιέχει τους ορότυπους 6,11,16 και 18 του HPV και ένα διδύναμο (Cervanix) που περιέχει τους ορότυπους 16 και 18. Οι ορότυποι 16 και 18, ευθύνονται για το 70% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η αποτελεσματικότητά των εμβολίων αγγίζει το 100%. Το τετραδύναμο προστατεύει και από τους ορότυπους 6 και 11 των οξυτενών κονδυλωμάτων.

Ο εμβολιασμός ενάντια στον HPV, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Με το συνδυασμό εμβολιασμού και προληπτικού ελέγχου, ο κίνδυνος για καρκίνο, μειώνεται σημαντικά και ανοίγονται νέοι ορίζοντες για την προαγωγή της δημόσιας υγείας.



## 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. Κλινικά δείγματα

Τα έξι δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, ήταν από τραχηλικά επιχρίσματα του αντικαρκινικού νοσοκομείου Άγιος Σάββας. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν σε υγρό μέσο ThinPrep και διατηρήθηκαν στους -20°C. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν επτά δείγματα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, με τη μορφή τραχηλικών επιχρισμάτων σε πλακάκια. Τα δείγματα του Πίνακα 3 και 4 είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV 16 στο εργαστήριο σε προηγούμενη μελέτη με τη μέθοδο NMPCR.

**Πίνακας 3:** Κωδικοποίηση δειγμάτων από το Νοσοκομείο Άγιος Σάββας

Δείγματα από το Νοσοκομείο Άγιος Σάββας	
Δείγματα	Κλινική Εικόνα
793	LG (CIN I)
796	HG (CIN III)
858	HG (CIN III)
868	LG (CIN I)
1143	Normal
1620	Normal

### 4.2. Απομόνωση DNA από δείγματα σε ThinPrep

Η απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas I. et al, 1996). Από κάθε κολπικό επίχρισμα χρησιμοποιήθηκαν 100 µl, τα οποία αναμίχθηκαν καλά με γλυκογόνο 10µg/tube και lysis Buffer 300µl (GuSCN 4M, N-lauroyl sacrosine 0,5%, Dithiotreitol 1mM, sodium citrate 25 mM) και επωάστηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 µl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), έγινε ανάδευση των δειγμάτων και ακολούθησε επώαση για 20 min στους +4°C. Φυγοκεντρήθηκαν 10min στις 14.000 *g* στους +4°C, ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του

ιζήματος με 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης. Έπειτα έγινε καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση για 10min στις 14.000 rcf στους +4oC. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA, επαναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH<sub>2</sub>O (RNase, DNase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20oC μέχρι την χρησιμοποίησή του.

**Πίνακας 4:** Κωδικοποίηση των δειγμάτων από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

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

#### 4.3. Απομόνωση DNA από κλινικά δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος σε πλακάκι

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Απομάκρυνση των κυτάρων από την καλυπτρίδα με ένα αποστειρωμένο tip μέσα σε ένα σωληνάριο Eppendorf.
- 2) Προσθήκη 0,5-1,5 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και δυνατή ανάδευση (vortex).
- 3) Φυγοκέντρωση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 4) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με ένα 1 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και vortex.
- 5) Επώαση στους 4oC για 1 ώρα.

- 6) Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 min.
- 7) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με 50 µl buffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Tween 20).
- 8) Προσθήκη 1µL proteinase K (20µg/µl).
- 9) Επώση στους 55°C για 60 min και βρασμός για 10 min για την απενεργοποίηση της proteinase K.
- 10) Φυγοκέντρωση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 5 min.
- 11) Συλλογή του υπερκείμενου.

#### **4.4. Εκκινητές (primers)**

Για την συγκεκριμένη εργασία αρχικά σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών οι HPV-16 24 / HPV-16 1071 και HPV-16 21 / HPV-16 934, με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV16 που είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων Gene Bank. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3, έτσι ώστε να ενισχύουν τα γονίδια, E6 και E7 του HPV-16. Τα ζεύγη αυτά δούλεψαν μόνο σε τρία δείγματα προερχόμενα από ThinPrep, τα 747, 793 και 796. Οι αλληλουχίες των γονιδίων E6 και E7 που προέκυψαν από τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό καινούριων εκκινητικών μορίων (HPV-16 41 / HPV-16 757). Οι εκκινητές και η αλληλουχία τους αναγράφονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR με κατεύθυνση 5'-3', η αλληλουχία τους και το μέγεθος του τελικού προϊόντος.

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

#### 4.5. PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

##### 4.5.1. Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης

Για την επιβεβαίωση ότι η διαδικασία της εκχύλισης έχει πραγματοποιηθεί σωστά και ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς της PCR πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης ενός 'housekeeping' γονιδίου. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') και PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3').

Ο τελικός όγκος της PCR ήταν 50 μl. Το μείγμα περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητές (PC04/GH20) συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95oC για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον Πίνακα 6:

**Πίνακας 6:** Συνθήκες αντίδρασης PCR γλοβουλίνης.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
PCO4 και GH20	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 50sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Η PCR που πραγματοποιήθηκε περιείχε ως θετικό μάρτυρα DNA κυττάρων απομονωμένο από κυτταροκαλλιέργειες MRC5 και Rd. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNases και RNases.

#### **4.5.2. PCR με εκκινητικά μόρια 24-1071 και 21-934**

Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 24-1071 και 21-934, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση την πρότυπη αλληλουχία του στελέχους HPV-16 για την πραγματοποίηση της PCR. Τα εκκινητικά αυτά μόρια ενισχύουν δίνουν ένα προϊόν μεγέθους 1047bp και 913bp, αντίστοιχα. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης PCR**

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
24-1071 και 21-934	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 50sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNases και RNases.

#### **4.5.3. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing)**

Από τα προϊόντα της Autonested PCR των δειγμάτων 747, 793, 796 και με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 24-1071 και 21-934, 40μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι PCR ζώνες που προέκυψαν από την πηκτή αгарόζης κόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 1,5ml. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR από την πηκτή αгарόζης χρησιμοποιώντας το προϊόν QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR από την Macrogen Inc (Seoul, Korea).

#### **4.5.4. Μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας**

Η επεξεργασία των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR με τα εκκινητικά μόρια 24-1071 έγινε με προγράμματα βιοπληροφορικής. Αρχικά, υποβλήθηκαν οι αλληλουχίες σε ομοπαράθεση με αλληλουχίες στη βάση δεδομένων για την ταυτοποίησή τους ως HPV-16 με τη βοήθεια του προγράμματος Blast. Στη συνέχεια, για την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων E6 και E7 χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα GeneRuner, Chromas και Mega.

#### 4.5.5. PCR με εκκινητές 41-757

Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 41-757 για την ενίσχυση με PCR. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50 μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητών τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95oC για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Συνθήκες αντίδρασης PCR

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
41-757	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 50sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72oC για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNases και RNases.

#### 4.5.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Autonested PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στην πηκτή και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου εφαρμόστηκε τάση 140V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στην

πηκτή αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Η ανίχνευση της ύπαρξης της ζώνης ενίσχυσης των 716bp έγινε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

## **4.6. Κλωνοποίηση**

### **4.6.1. Autonested GoTaq Flexi PCR**

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

Η Autonested GoTaq Flexi PCR είναι απαραίτητη για την μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων των PCR αντιδράσεων (θετικών δειγμάτων), η οποία ακολούθησε. Έτσι, η Autonested GoTaq Flexi PCR πραγματοποιήθηκε για την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων, καθώς επίσης για την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης poly(A) μονόκλωνων άκρων, μια ιδιότητα του ενζύμου πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την αντίδραση. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 μl προϊόντος της autonested PCR το οποίο έχει καθαριστεί από πηκτή αγαρόζης (όπως περιγράφεται παρακάτω), 2μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών τελικής συγκέντρωσης 50 pmol, 10μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος (Colorless Go Taq Flexi Buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM), 0,25μl GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (1,25u/tube, 5u/μl, Promega, USA), 4μl MgCl<sub>2</sub> solution 25mM και ddH<sub>2</sub>O ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA), μέχρι τελικό όγκο 50μl. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95oC για 2 λεπτά και, στην συνέχεια, ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών για κάθε μείγμα εκκινητών ξεχωριστά, όπως αναγράφονται στον Πίνακα 9.



**Πίνακας 9:** Συνθήκες GoTag PCR

Εκκινητές	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	
41-757	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec	
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 30sec (41-757) ή	30 κύκλοι
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72oC για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNases και RNases. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της Autonested PCR από την πηκτική αγαρόζης, που πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο Go Taq, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.5.3.

#### **4.6.2. Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων της Autonested GoTaq PCR**

Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής:

A) Αντίδραση λιγάσης: χρησιμοποιείται ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA) για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων, έτσι ώστε να ενσωματωθεί σε αυτόν, το ενισχυμένο γενωμικό τμήμα από τις αντιδράσεις PCR (Σχήμα 15). Τα προϊόντα της Autonested GoTaq PCR διαθέτουν πολύ-(A) άκρα, τα οποία ενώνονται συμπληρωματικά με τα πολύ-(T) άκρα που διαθέτει ο φορέας. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25oC για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl pGEM®-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTaq PCR 3μl, 1μl T4 DNA Ligase (3u/μl) και 2x Rapid Ligation Buffer 5μl.

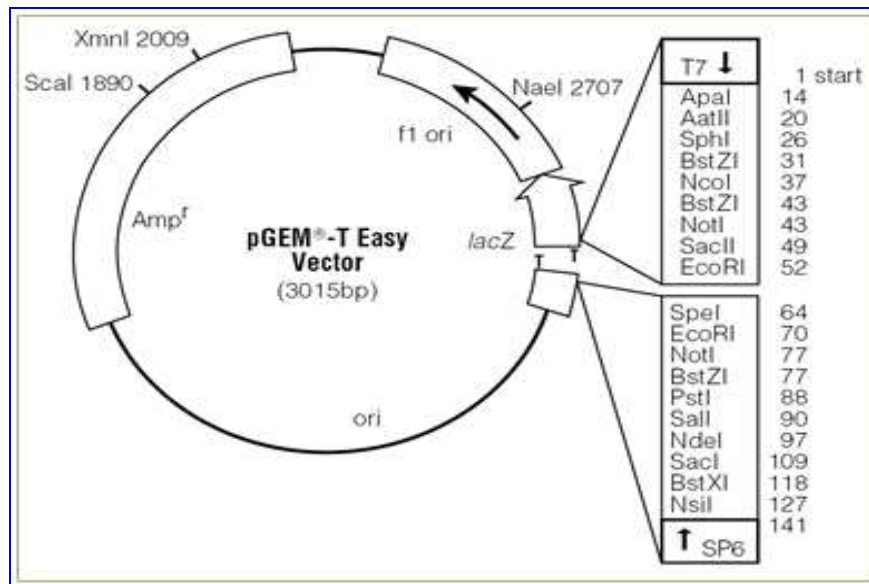
B) Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl<sub>2</sub>): Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α. Από απόθεμα γλυκερόλης στους -80oC συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) ακολουθώντας επώαση για 16h (overnight) στους 37oC στις 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, 1ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37oC

στις 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD600 και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4oC και, στο τέλος της φυγοκέντρησης, αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10ml παγωμένου CaCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4oC, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2ml παγωμένου CaCl<sub>2</sub> 0,1M (0,55g CaCl<sub>2</sub>, Sigma, USA, διαλύονται σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 50ml).

Γ) Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων: Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200μl από τα δεκτικά κύτταρα σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes). Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο και, ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν τα μικροσωληνάρια στον πάγο για 30min. Έπειτα τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42oC για 90sec ακριβώς και, ακολούθως, μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2min (heat shock). Στη συνέχεια, 200μl των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκαν σε falcon με 800μl LB Broth και επωάστηκαν στους 37oC στις 180 στροφές/λεπτό για 1h (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων – «επούλωση»). Εν συνεχεία, 300μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τρυβλίο που περιείχε LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Agar (6,6mg/ml) και προστέθηκαν 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA), ενώ ακολούθησε επώαση για 16h στους 37oC. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και, έτσι, όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Ωστόσο, όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι

αποικίες είναι άσπρες διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται. Έτσι έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα τριών από κάθε τρυβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37oC σε 210 στροφές/λεπτό. Τέλος, ακολούθησε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.

Δ) Πέψη με EcoRI: Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl 10x H Buffer, 1μl Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15μl ddH<sub>2</sub>O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 37oC για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23μl που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων στην πηκτή αгарόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων έγινε μέσω της ύπαρξης της χαρακτηριστικής μπάντας των bp με τη βοήθεια μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).



**Σχήμα 15 :** Ο φορέας κλωνοποίησης της pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης, καθώς και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. (Από [www.promega.com](http://www.promega.com)).

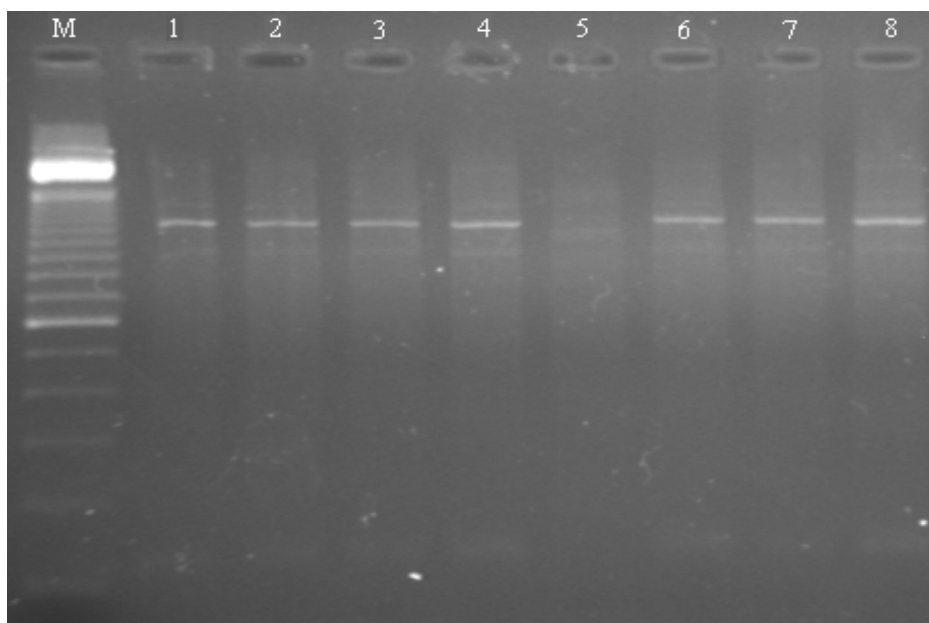
#### 4.7. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (Sequencing)

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων έγινε με την χρησιμοποίηση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Πιο συγκεκριμένα, για την εύρεση γνωστών αλληλουχιών, οι οποίες είναι καταχωρημένες στις παγκόσμιες γονιδιακές τράπεζες δεδομένων (GenBank), χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα BLAST. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το GeneRunner και τέλος, η πολλαπλή στοίχιση, η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η δημιουργία φυλογενετικών δέντρων έγιναν με το πρόγραμμα MEGA.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1. Ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης

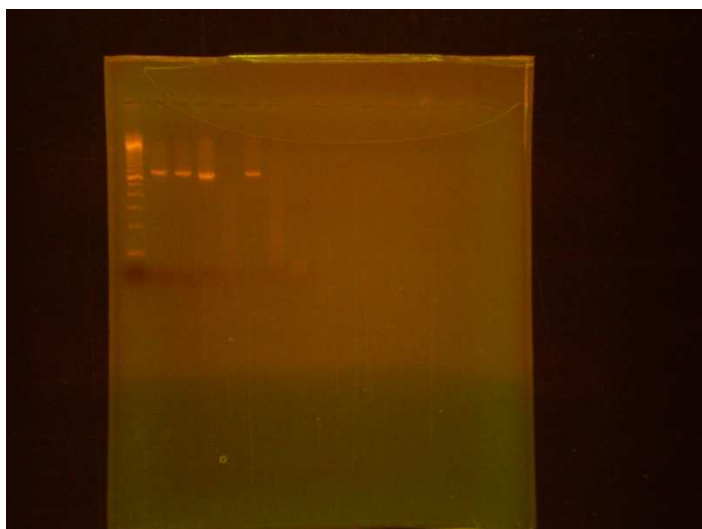
Σε όλα τα δείγματα έγινε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης. Στην Εικόνα 1 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης κάποιων από τα δείγματα, που ακολούθησε την PCR, όπου φαίνεται ότι η διαδικασία της εκχύλισης έχει πραγματοποιηθεί σωστά και ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς.



**Εικόνα 1:** Αποτέλεσμα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.

### 5.2. PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία

Τα αποτελέσματα των PCR που πραγματοποιήθηκαν με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν για την παρούσα ερευνητική εργασία (41-747) παρουσιάζονται στην Εικόνα 2. Από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται τα δείγματα 796, 858, 868 και 1620.



**Εικόνα 2:** Αποτέλεσμα PCR με τη χρήση των νέων εκκινήτων

### 5.3. Αποτελέσματα από την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Στους Πίνακες 10 και 11 φαίνονται συνοπτικά οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλλαγές που εντοπίστηκαν στα γονίδια E6 και E7.

**Πίνακας 10:** Μεταλλάξεις του HPV για το ογκογονίδιο E6 και οι αντίστοιχες αμινοξικές αλλαγές στα δείγματα που μελετήθηκαν

- Asian American  
- European  
- African type1

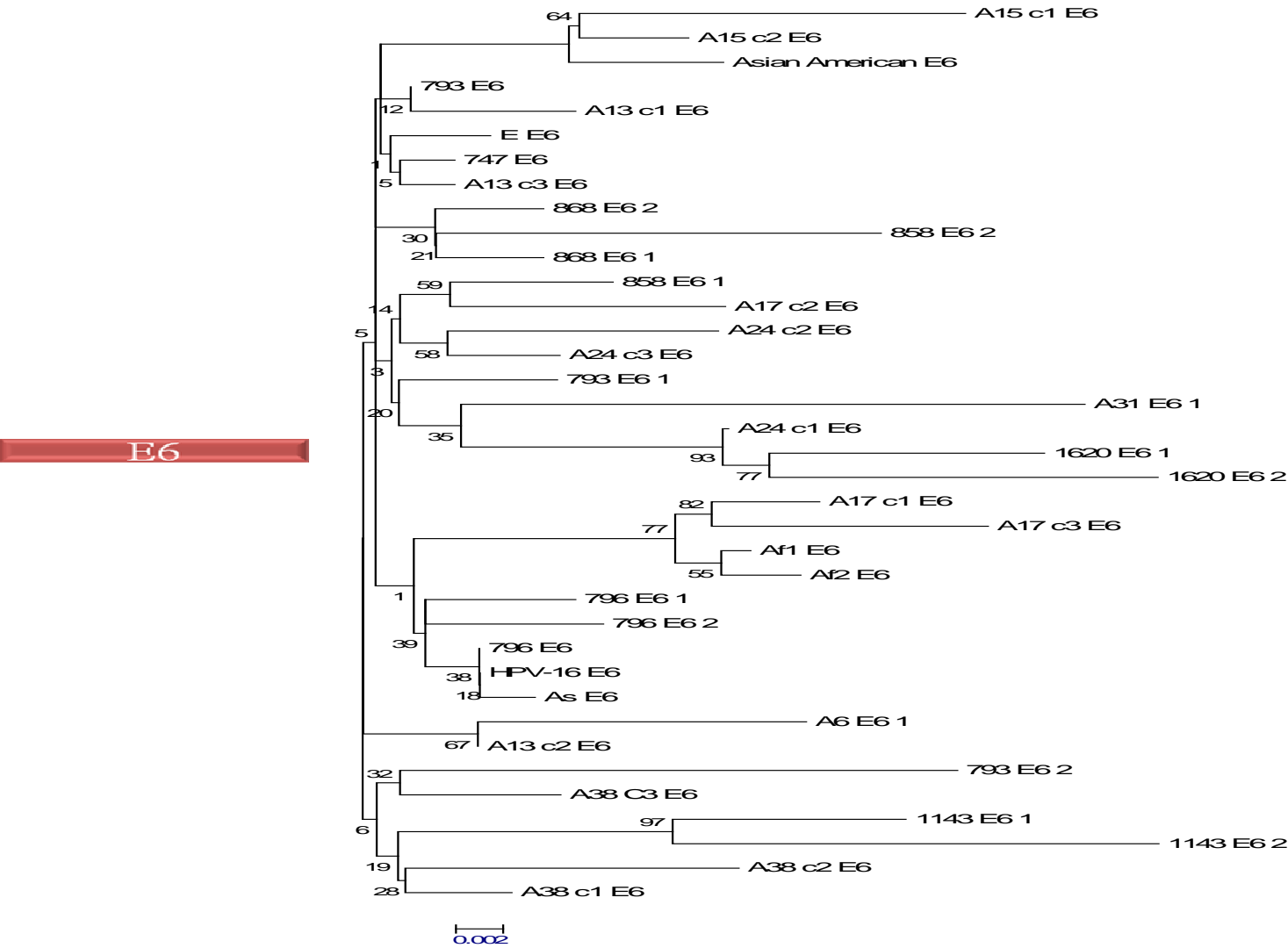
Περιοχή E6			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
ΟΛΟΙΟΙ ΚΛΩΝΟΙ	G126C	R15P	Όλοι HG και LG
A17C1*, A24C1*, A38C1, A38C2, A38C3	C143G	Q21D	LG (A17, A24) και HG (A38)
A15C1, A15C2, A17C1*	G145T	Q21H	LG (A17) και HG (A15)
A24C2*, A24C3*	A184T	I34I	LG
A15C1, A24C2*	G201A	C40Y	LG (A24) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1*	T286A	A68A	LG (A17) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1*	A289G	V69V	LG (A17) HG (A15)
A15C1, A15C2, A17C1*	C335T	H85V	LG (A17) HG (A15)
ΟΛΟΙΟΙ ΚΛΩΝΟΙ (E, AA <sub>1</sub> ) εκτός LG A17C1, A17C3, A38C3	T350G	L90V	HG και LG

**Πίνακας 11:** Μεταλλάξεις του HPV για το ογκογονίδιο E7 και οι αντίστοιχες αμινοξικές αλλαγές στα δείγματα που μελετήθηκαν

- Asian American
- European
- African type1

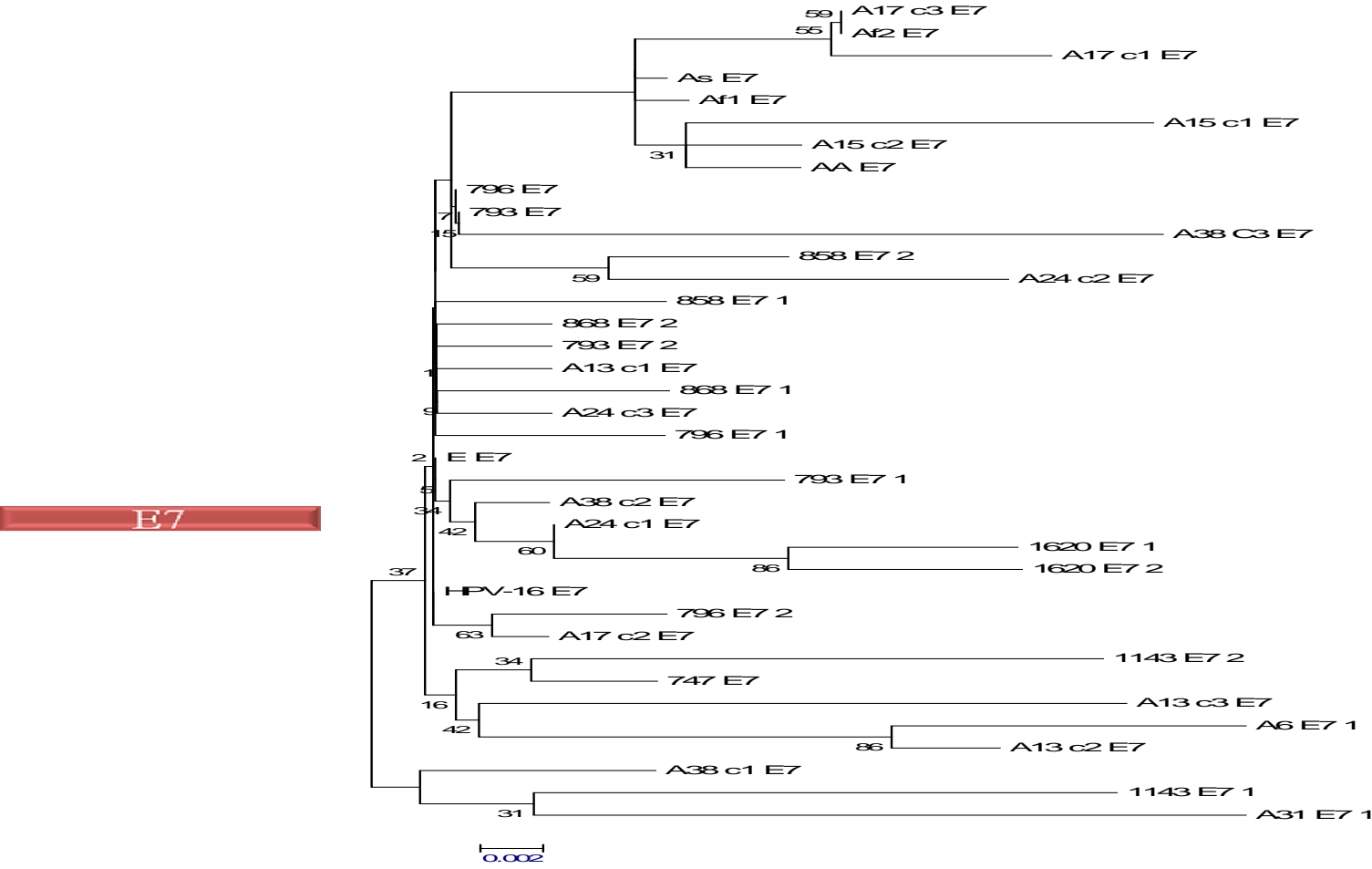
Περιοχή E7			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
A15C1, A15C2, A17C1*, A24C2*	T789C	I76I	Όλοι LG εκτός A15 C1 HG
A15C1, A15C2, A17C1*	T795G	T78T	A17LG, A15 HG
A17C1*, A38C1	G814A	G85S	A17 LG, A38 HG
A13C2, A13C3	G815A	G85D	HG

Μετά από τη σύγκριση και τη νουκλεοτιδική στοίχιση των κλινικών δειγμάτων με τις αλληλουχίες άλλων στελεχών HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (Af-1), African type-2 (Af-2)] από το GenBank σχεδιάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 17 και 18. Από τα σχήματα αυτά παρατηρούμε ότι τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήσαμε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ανήκουν τόσο στο ευρωπαϊκό στέλεχος (E), όσο και στα AA και Af-1 στελέχη.



Σχήμα 17: Φυλογενετικό δένδρο για τα γονίδια που ελέγχουν την περιοχή E6





Σχήμα 18: Φυλογενετικό δένδρο για τα γονίδια που ελέγχουν την περιοχή E7

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει αναμφισβήτητα συνδεθεί αιτιολογικά με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) που προσβάλλει τους βλεννογόνους. Από αυτούς άλλοι έχουν υψηλό ογκογενετικό δυναμικό και αποκαλούνται υψηλού κινδύνου (high risk), άλλοι είναι ενδιάμεσης επικινδυνότητας (middle risk) και ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και άλλοι είναι μη ογκογόνοι και προκαλούν τα κανδυλώματα (Molijun A, et al, 2005). Ο επικρατέστερος τύπος HPV που προκαλεί αυτόν τον τύπο καρκίνου είναι ο HPV-16, και ακολουθούν οι τύποι 18, 45, 31 οι οποίοι ανήκουν στους HPV υψηλού κινδύνου (Moliju A, et al, 2005; Brink A.A., et al, 2007).

Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία χωρίζονται στις εξής περιοχές: επτά πρώιμες (E1-E7), δύο όψιμες (L1 και L2) και μια περιοχή LCR (Demeret et al., 1995). Από τις περιοχές αυτές, οι E6 και E7 είναι υπεύθυνες για την ογκογόνο δράση του ιού (Deug W, et al, 2004) και φαίνεται ότι ρυθμίζονται από την έκφραση της περιοχής E2.

Οι HPVs κατηγοριοποιούνται σε 12 γένη βάσει του LCR, βάσει του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της L1 καψιδιακής πρωτεΐνης, οπότε όλα τα μέλη έχουν 60% ομοιότητα στο L1. Τα δυο κύρια γένη HPV είναι τα Alpha και Beta PVs στα οποία ανήκουν περίπου το 90% των μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένων HPV. Από τα 12 γένη, τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu-Papilloma, είναι PVs του ανθρώπου. Ανάμεσα στο γένος διακρίνονται τύποι (types), υπότυποι (subtypes) και παραλλαγές (variants), ανάλογα με το ποσοστό ομοιότητας της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Εάν η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από άλλα τουλάχιστον 10%, έχουμε διαχωρισμό σε τύπους, εάν διαφέρει από 2-10% σε υπότυπους και εάν διαφέρει λιγότερο από 2% σε variants (de Villiers E. M. et al, 2004).

Στην παρούσα μελέτη έγινε PCR σε δείγματα από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών Άγιος Σάββας, τα οποία ήταν σε υγρό μέσο ThinPrep και από το Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, με τη μορφή τραχηλικών επιχρισμάτων σε πλακάκι. Οι περιοχές E6 και E7, που θεωρούνται ότι είναι υπεύθυνες για την ογκογόνο δράση του ιού, ενισχύθηκαν με εκκινητές που σχεδιάστηκαν,

χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer3, με βάση την κατατεθειμένη αλληλουχία στο GenBank του πρότυπου HPV-16. Η PCR έδειξε ότι τα δείγματά μας περιείχαν τον HPV-16.

Μετά την ενίσχυση των περιοχών E6 και E7 ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχιση για να διαπιστωθεί αν υπήρχε στα δείγματα ταυτόχρονη μόλυνση από διαφορετικά HPV-16 variants. Για την υλοποίηση της κλωνοποίησης αρχικά πραγματοποιήθηκε η Autonested GoTaq Flexi PCR για την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων και, εν συνεχεία, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων και επεξεργασία με πρόγραμμα βιοπληροφορικής. Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ότι τα κλινικά δείγματα που φέρουν τα γονίδια E6 και E7 φέρουν μεταλλάξεις σε σχέση με την αντίστοιχη πρότυπη αλληλουχία.

Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που διαπιστώθηκαν στην περιοχή E6 ήταν οι ακόλουθες: η G126C, που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή R15P και διαπιστώθηκε σε όλους τους κλώνους και η T350G, που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή L90V και υπάρχει σε όλους σχεδόν τους κλώνους εκτός από τους A17C1, A17C3 και A38C3. Η ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης έχει συνδεθεί με την μετάβαση από ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τύπου CIN3 σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ICC.

Αναφορικά με την περιοχή E7 διαπιστώθηκαν 4 διαφορετικές μεταλλάξεις: η T789C, που προκαλεί την αμινοξική αλλαγή I76I, η T795G, που προκαλεί την T78T, η G814A, που προκαλεί την αλλαγή G85S, και η G815A, που ευθύνεται για την αλλαγή G85D. Οι τρεις από αυτές τις μεταλλάξεις (T789C, T795G και G814A) βρέθηκαν στον κλώνο A17C1 και οι δύο από αυτές (T789C, T795G) βρέθηκαν και στους κλώνους A15C1 και A15C2. Η μετάλλαξη T789C υπήρχε και στον κλώνο A24C2, η G814A βρέθηκε και στον κλώνο A38C1, ενώ η τέταρτη μετάλλαξη, η G815A υπήρχε μόνο στους κλώνους A13C2 και A13C3.

Επιπλέον, έγινε σύγκριση με αλληλουχίες του E6 και E7 γονιδίου άλλων στελεχών HPV-16 [European (E), Asian (As), American-Asian (AA), African type-1 (Af-1), African type-2 (Af-2)] και σχεδιάστηκαν τα φυλογενετικά δένδρα για τις περιοχές E6 και E7. Από τα φυλογενετικά δένδρα για το E6 προέκυψε ότι τα A24C1, A24C2 και A24C3, όπως και τα A38C1, A38C2 και A38C3 ομαδοποιούνται με το Ευρωπαϊκό (E) στέλεχος, τα A15C1 και A15C2 στην

Asian American (AA) και οι κλώνοι A17C1 με τα Αφρικανικού τύπου-1 (Af-1) στελέχη.

Αναφορικά με την κλινική εικόνα και τη σχέση της με τις μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν στην περιοχή του E6, προέκυψαν οι εξής παρατηρήσεις: α) το E στέλεχος A24 σχετίστηκε με low-grade (LG) καρκίνο τραχήλου και με τις μεταλλάξεις A184T και G201A, ενώ το E στέλεχος A38 σχετίστηκε με high-grade (HG) και με τη μετάλλαξη C143G, β) το AA στέλεχος A15 σχετίστηκε με HG στην κλινική εικόνα και με τις μεταλλάξεις G145T, G201A, T286A, A289G και C335T, γ) το Af-1 στέλεχος A17 συνδέθηκε με τις μεταλλάξεις G145T, T286A, A289G και C335T και με κλινική εικόνα LG.

Στην περιοχή E7, το E στέλεχος A24, που προκαλεί LG κλινική εικόνα, είχε τη μετάλλαξη T789C και τα E στελέχη A38 και A13, με κλινική εικόνα HG, είχαν τις μεταλλάξεις G814A και G815A, αντίστοιχα. Τα AA στελέχη A15 σχετίστηκαν τόσο με LG όσο και με HG κλινική εικόνα και με τις μεταλλάξεις T789C και T795G. Τέλος, το Af-1 στέλεχος A17 σχετίστηκε μόνο με LG κλινική εικόνα και με τις μεταλλάξεις T789C, T795G και G814A.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης, προκύπτουν αξιολογα συμπεράσματα που δίνουν απαντήσεις στα ερωτήματα που έχουν τεθεί. Συγκεκριμένα, στην περιοχή E6 οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σχετίζονται τόσο με LG όσο και με HG κλινική εικόνα, με εξαίρεση τη μετάλλαξη A184T, η οποία συνδέεται μόνο με LG κλινική εικόνα. Αντίθετα, στην περιοχή E7 μόνο μια από τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σχετίζεται μόνο με HG καρκίνο, ενώ οι τρεις υπόλοιπες σχετίζονται και με LG και με HG κλινική εικόνα. Συνεπώς, δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη σοβαρότητα της νόσου και στη μετάλλαξη.

Από την άλλη πλευρά, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην προέλευση του στελέχους και την κλινική εικόνα, αφού τα E στελέχη εμφάνιζαν τόσο LG όσο και HG κλινική εικόνα, ενώ από τα μη ευρωπαϊκά στελέχη, τα AA σχετίζονται περισσότερο με νεοπλασίες (HG) και τα Af-1 συνδέονται με χαμηλού σταδίου καρκίνο (LG).

Η παρούσα εργασία δίνει πολύ χρήσιμες πληροφορίες για τη φυλετική προέλευση του HPV-16 που περιέχεται σε δείγματα της χώρας μας, αλλά για τις μεταλλάξεις που υπάρχουν σε αυτόν στις περιοχές E6 και E7 του γονιδιώματος, οι οποίες είναι οι περιοχές του ιού με την ογκογόνο δράση. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έρχονται να προστεθούν σε αυτά

άλλων εργασιών για να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τους HPV. Δημιουργήθηκαν φυλογενετικά δένδρα από τα οποία μπορεί να βρεθεί με ποιο HPV variant ομαδοποιείται ο κάθε κλώνος. Οδηγεί, επομένως, σε χρήσιμα συμπεράσματα για την ογκογόνο δράση του HPV, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ακόμη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων και σε σύγκριση με διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα να βοηθήσουν στη δημιουργία ενός αποτελεσματικού τρόπου αντιμετώπισής του ιού.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins *Virus Res* 2006; 1:208-11.
- Aumailley M, A E I Khal, N. Kuoss and I Tuhggal. Laminin processing and its integration in the ECM, *Matrix Biol* 2003; 22: 49-54.
- Bouvard V, Storey A, Pim P and Bank L, characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes *EMBOJ*, 1994; 13: 5451-5459.
- Brink AA, Snijders PI, Meijer CI, HPV detection methods. *Dis Markers* 2007; 23(4): 273-81.
- Brink AA, Snijders PJ, Neijer CI, HPV detection methods, *Dis Markers* 2007; 23(4): 273-81.
- Chong T, Apt P, Closs B, Isa M and Bernard H-U: The enhancer of human papillomavirus 16: binding sites for the ubiquitous transcription factor OCT-1, NFYA, TEF-2, NF1 and AP1 participate in epithelial cell-specific transcription, *J Virol* 1991, 65: 5933-5943.
- Collins Y, Einstein MH, Gostout BS, Herzog TJ, Massad LS, Rader JS, Whith J, Cervical cancer in the era of prophylactic vaccines: A Preview of gynaecologic oncologists *Gyn One* 2006; 102, 552-562.
- Conrad M, Bubbs VJ, and Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 1993; 67:6170–6178.
- Culp et al. Keratinocyte-secreted Laminins function as a Transient Receptor for Human Papillomavirus by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent cells *Journal of Virology* 2006; 89:40-8950.
- Day P Low y, D and Schiller J, Papillomaviruses infect cells via clathrin-dependent pathway, *Virology* 2003; 307: 1-11.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard H and Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- Demeret C, M Le Moal, M Yaun and F Thierry. Control of HPV18 DNA replication by cellular and viral transcription factors, *Nucleic Acids Res* 1995; 4777-84

- Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW, Broker TR, Chow LT, Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 2004; 78:13954-13969.
- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006; 110: 525-541.
- Dostathi N, Lambert P.F, Sousa R, Ham J, Howley P.M and Yaniv M, The functional BPV-1 E2 transactivating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex, *Genes Dev* 1991; 5: 1657-1671.
- Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998; 12(15):2245-62.
- Fau X, Chen J.I. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the papillomavirus E6 on cogenecrit Rer Eu Karyot Expt 14:183-202, 2004
- Fau X, Lin Y., Chen J.I. Down regulation of P21 contributes to apoptosis induced by HPV E6 in human mammary epithelial cells, *Apoptosis* 10: 63-73, 2005
- Frazer J. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination, *Nature Reviews Immunology*, 2004; 4, 46-54.
- Garcia-Carrauca A, Thierry F and Yaniv M: Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18, *J Virol* 1988, 62: 4321-4330.
- Garnett TJ, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins, *Arch Virol* 2006; 151:2321-2335.
- Groglou T, Florin L, Schafer F, Streek RG, Shapp M: Human papillomavirus infections requires cell surface heparan Sulfate, *J Virol* 2001;75: 1565-1570.
- Gloss Band Bernard H.V: The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant SP1 distal element, *J Virol*, 1992, 64: 5577-5584.
- Grassman K, Rapp B, Maschek H, Petry KV, Iftner T, , Identification of differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papilloma virus 16 in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV 16. *DNA* 1996; 23: 39-49
- Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM, Cenotypin of 27 human

- papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a singly-hybridization, reverse lineblot detection method J Clin Microbiol. 1998 36(10): 3020-7.
- Gregoire L, Arella M, Campione-Piccardo J, Lancaster WD. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers, J Clin Microbiol 1989; 27(12): 2660-5.
- Harvey W. Exercitationes de Generation Animalium, quidam accedunt quaedam de Partu, de Membranis, ac Tumoribus Uteri et de Conceptione, 1651
- Hessalink AT, van de Brule AJ, Brink AA, Berkhof J, van Kemenade FJ, Verheijen RH, Snijders PJ. Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. Cancer 2004; 102(1): 11-8.
- Hopman AH, Smedtsand F, Dignef W, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. J Pathol 2004; 202:23-33.
- Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication, In: Knipe D, Howley P.M, editors, Field Virology. Uthed Baltimor: Lippincott, Williams Wilking 2001. p 2197-2229.
- Ishiji Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16 J. Dermatol. 27: 73-86, 2000
- Joyce JC, Tung JS, Pr ZySiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KV, Keller PM, The L1 Major capsid protein of human papillomavirus type 1L, recombinant virus-like particles interact with heparin and cell-surface glycosaminoglycans of human keratinocytes, J Biol Chem 1999; 274: 5810-5822.
- Kim SW, Yang IS, Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target, Yonsei Med J. 47, 2006
- Kirnbauer R, Booy F, Cheung N, Lowy DR and Schiller IT., Papillomavirus L, major capsid protein self assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89:12180-12184.
- Massimi P, Pim DiBertolice, Bouvard V and Banks L Interaction between the HPV 16 E2 transcriptional activator and P53 Oncogene 1999;16: 7748-7754



- Mclutye MC, Frattini MG, Grossma SR, Laimins LA, Human Papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-x-xCys motifs for zinc binding, dimerization and transformation but not for Rb binding *Virol.* 67: 3142-3150, 1993
- Moliju A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LI, Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections, *J. ClinVirol* 2005; 32 Suppl 1: 543-51.
- Monsonogo J, Bohbot JM, Pollinia, Krawec C, Vincent C, Merignargues I, Haroun F, Sednaoui P, Moufort L, Dachez R, Syrjanen K, Performance of the Roch, Amplicor human papillomavirus ( HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in woman with abnormal PAPSmear, *Gynecol Oncol* 2005; 99(1): 160-8.
- Narisawa – Saito M and Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; 98(10): 1505-1511
- Nguyen ML, Kraft RM. P53 and h TERT determine sensitivity to viral apoptosis, Aubert M, Goodwin E, DiMaio D, *J Virol* 81: 12985-12995, 2007
- O'Connor M, Shih-Yen Chan, and Hans-Ulrich B. Transcriptional factor binding sites in the Long Control Region of HPVs. 1995.
- Pfister H. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr* 2003; 31, 52–56.
- Shew M.L, Fortenber J.D. HPV infection in adolescents:natural history, complication and indicators for viral typing. *SeminPediatr Infect Dis* 2005; 16:168-174.
- Snijders PS, Voudou Brude AI, Meijer CI, The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity, *J Pathol* 2003; 201(1): 1-6.
- Stanley M.A, Immune responses to human papillomavirus: vaccine SI:16-22, 2005
- Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance,. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1993; 67: 4521-4532.
- Stubenrauch F and Laimins LA, Human papillomavirus lifecycle: active and

- latent phases: semin. *Cancer Biol.* 1999;9: 379-386.
- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI, Common fragile sites are preferential target for HPV16, integration in cervical tumors, *Oncogene* 2003; 22: 1225-37.
- Tieben LM, Terschegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BI, Jebbink MF, Smits HL, Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primer, *J Virol Methods*, 1993; 42 (2-3): 265-79.
- Ustav M, Stelund A, , Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991; (2): 449-57.
- Van de Brule AI, Rol R, Frauseu- Daal- Meijer N, Schools LM, Meijer CI, Snijders PJ, GPST/GT PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high throughput identification of human papillomavirus genotypes, *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 779-87.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JG, Schlegel R, Transcriptional activation of telomerase TERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein, *J Virol* 75: 4467-4472, 2001
- Wang Q, Griffin H, Southern S, et al, Functional Analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 proteins a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament re-organisation. *J Virol* 2004; 78: 821-833.
- Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, Roberts S, The Full-length E1 protein of human papillomavirus type 18 Modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression, *Virology* 362: 4530-460, 2007
- Xin L, Clements A, Zhou O and Marwornstein R, structure of the human papillomavirus E7 of the Retinoblastoma Tumor Suppressor J, *Biol Chem* 281: 578-586, 2006
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer, *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158: 27-34.