

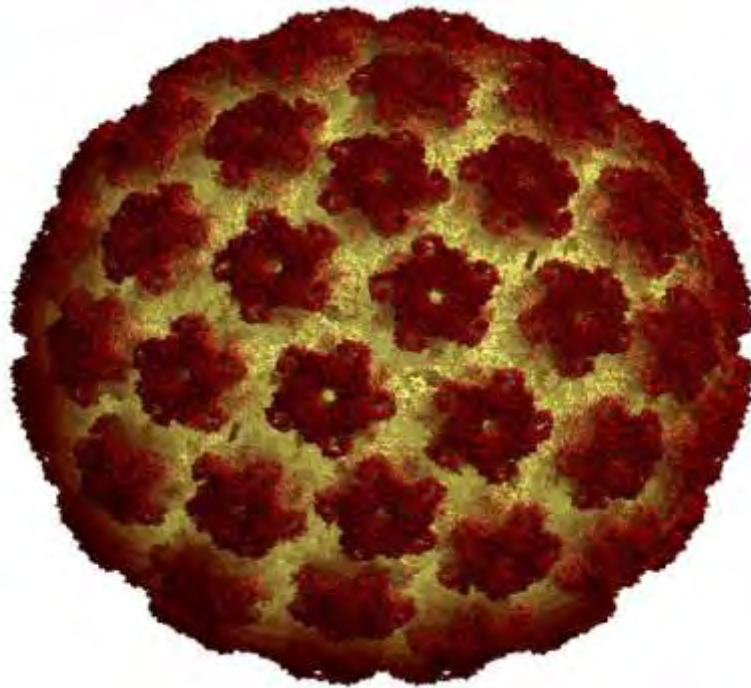
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

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

ΠΑΣΧΑΛΗΣ Γ. ΓΚΟΡΤΣΙΔΑΣ

**Χαρτογράφηση των θέσεων ρήξης των γονιδίων E1
και E2 του Human Papillomavirus (HPV) -16 σε
υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες**



Επιβλέπων: Καθηγητής Παναγιώτης Μαρκουλάτος

Λάρισα 2011

**Χαρτογράφηση των θέσεων ρήξης των γονιδίων E1 και E2
του Human Papillomavirus (HPV) -16 σε υψηλού και
χαμηλού βαθμού δυσπλασίες**

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

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

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Κ. Ματθιόπουλος: Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Βιολογίας.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Δ. Μόσιαλος: Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Στους γονείς μου,

Ιωάννη και Αναστασία

και στα αδέρφια μου,

Δημήτρη και Καλλιόπη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2010 – Απρίλιος 2011 στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών <<Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες>>.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κύριο Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο και Δημήτριο Μόσιαλο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή επιτροπή για τη παρούσα μελέτη,.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την βαθύτερη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση τις συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας όσο και για τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών. Υπήρξε για μένα υπόδειγμα πανεπιστημιακού δασκάλου με τις γνώσεις του και το ήθος του. Οι συμβουλές του πάνω στο αντικείμενο ήταν πάρα πολύ σημαντικές για μένα και θα με ακολουθούν συνέχεια στην περαιτέρω σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την ψυχή μου την διδάκτορα Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και τον υποψήφιο διδάκτορα Τσακογιάννη Δημήτρη για την βοήθεια τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους τόσο στον εργαστηριακό τομέα όσο και στο να μπορέσουν να ξεπεραστούν τα όποια προβλήματα προέκυψαν. Το ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον που αναπτύχθηκε μεταξύ μας ήταν πάρα πολύ σημαντικό για να μπορέσω να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία με ευχαρίστηση. Το ήθος και ο χαρακτήρας που ανέδειξαν μέσα στο εργαστήριο ήταν πολύ σημαντικά για μένα. Τους εκτιμώ και τους σέβομαι βαθύτατα γι' αυτό.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου, Ιωάννη και Αναστασία, για την συμπαράστασή τους καθώς και για τις θυσίες και τον αγώνα που έκαναν τόσα χρόνια προσφέροντάς μου όλα τα απαραίτητα αγαθά, υλικά και ψυχικά, για τη πραγματοποίηση των σπουδών μου. Η συγκεκριμένη εργασία είναι αφιερωμένη, εξολοκλήρου, σε αυτούς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Η Βιολογία των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPV)	3
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	3
1.1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών	8
1.2 Δομή των Ανθρώπινων papilloma ιών (HPV).....	11
1.2.1 Δομή του καψιδίου	11
1.2.2. Γενωμική οργάνωση	12
1.3 Ο κύκλος ζωής των HPV	24
1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή	24
1.3.2 Αντιγραφή του ιικού γενόματος.....	25
1.3.3 Μεταγραφή του ιικού γενόματος	27
1.3.4 Ενσωμάτωση του ιικού γενόματος.....	28
1.3.5 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	30
1.3.6 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	32
1.4 Εργαστηριακή διάγνωση.....	35
1.4.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap)	35
1.4.2 Hybrid Capture II test	36
1.4.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1 Κλινικά Δείγματα	40
2.2 Απομόνωση του DNA	40
2.2.1 Απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα που φυλάσσονται σε ThinPrep	40
2.2.2 Απομόνωση DNA από τις τομές τραχηλικού ιστού οι οποίες είναι μονιμοποιημένες με παραφίνη	42
2.2.3 Απομόνωση DNA από καλυπτρίδα πάνω στην οποία βρίσκονται μονιμοποιημένα τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα για εξέταση Pap test	42
2.3 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου E1 του HPV-16	43
2.4 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E1	46
2.4.1 Απλή PCR	46
2.4.2 AutoNested PCR.....	47

2.5 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου E2 του HPV-16	48
2.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E2	50
2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	52
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
3.1 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E1 του HPV-16	53
3.2 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E2 του HPV-16	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
5. ΒΙΒΛΟΓΡΑΦΙΑ	60

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomaviruses, HPV) είναι μικροί ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Το γονιδιώμά τους αποτελείται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 8000 βάσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί και πλήρως αλληλουχηθεί πάνω από 130 διαφορετικοί γενότυποι HPV, οι οποίοι μολύνουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου του δέρματος και του βλεννογόνου του γεννητικού συστήματος και των άκρων. Ευθύνονται για μια σειρά βλαβών που εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι και καρκίνο. Μια ομάδα HPV ιών αποτελούν την κύρια αιτία για το καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μιας που στο 99% των όγκων έχει ανιχνευθεί το DNA αυτών των ιών. Οι τύποι του ιού οι οποίοι μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του γεννητικού συστήματος ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης που προκαλούν χωρίζονται σε τρεις ομάδες επικινδυνότητας: την ομάδα υψηλού κινδύνου, την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου και την ομάδα χαμηλού κινδύνου. Οι τύποι υψηλού κινδύνου εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του γεννητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένου και του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι μολύνσεις από HPV χαμηλού κινδύνου προκαλούν μόνο καλοήγη γεννητικά θηλώματα. Οι κυριότεροι τύποι υψηλού κινδύνου είναι οι HPV-16, -18, -31, -33 και -45, ενώ οι κυριότεροι τύποι χαμηλού κινδύνου είναι οι HPV-6 και HPV-11. Οι HPV οι οποίοι προσβάλλουν το γεννητικό σύστημα είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι και πιστεύεται ότι περίπου τα 2/3 των ατόμων που έχουν σεξουαλική επαφή με ένα μολυσμένο άτομο μολύνονται και αυτά. Ωστόσο, η πλειοψηφία των μολύνσεων δεν παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα. Η μόλυνση από HPV υψηλού κινδύνου δεν περιορίζεται μόνο στο γεννητικό σύστημα, μιας και περίπου το 20% των καρκίνων του στοματοφάρυγγα περιέχουν DNA από αυτούς τους τύπους HPV.

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% (Bosch FX. et al 1995) και 10-25% αντίστοιχα. Ακολουθούν ο HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%. Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά παραμένουν αρκετά υψηλά.

Το γονιδίωμα των HPV μπορεί να βρίσκεται σε δύο μορφές μέσα στα κύτταρα-ξενιστές, είτε ως επισωματική μορφή, είτε ως γραμμική μορφή

ενσωματωμένο στο γονιδίωμα των κυττάρων-ξενιστών. Επίσης, σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των κυττάρων το γονιδίωμα του ιού συνυπάρχει και με τις δυο μορφές του. Η ενσωμάτωσή του πραγματοποιείται μετά από ρήξη σε μεγαλύτερο ποσοστό στην περιοχή του γονιδίου E2 και σε ένα μικρότερο ποσοστό έχει παρατηρηθεί ρήξη στο γονίδιο E1. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού είναι ένα σημαντικό βήμα για την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και καθώς αυξάνεται ο βαθμός δυσπλασίας αυξάνεται και το ποσοστό ενσωμάτωσης.

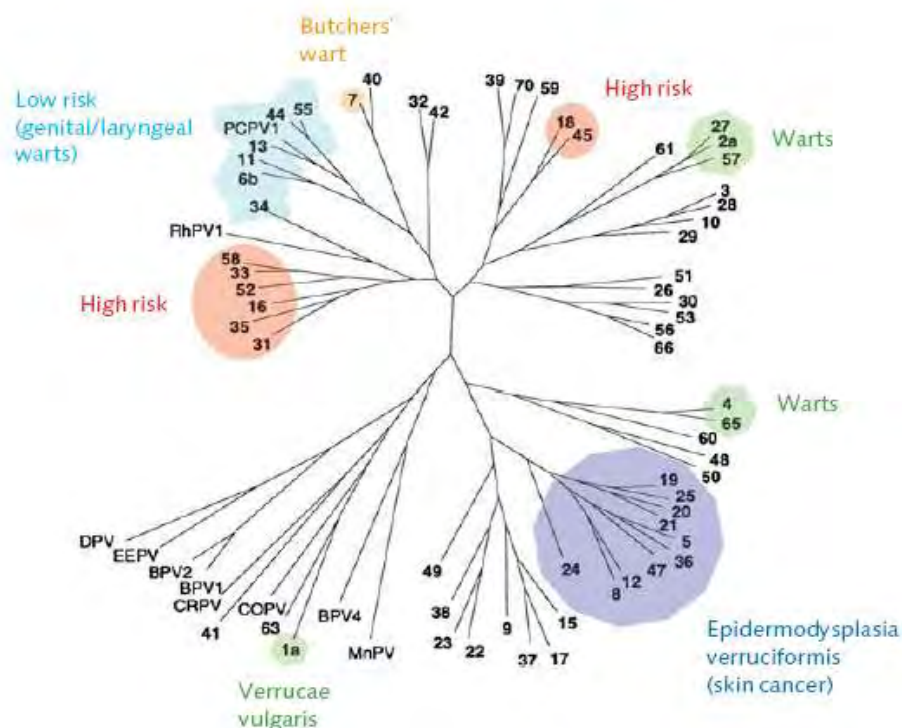
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η χαρτογράφηση των θέσεων ρήξης των γονιδίων E1 και E2 του HPV-16 σε ενδοεπιθηλιακές τραχηλικές αλλοιώσεις. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν PCR για την ενίσχυση των δύο αυτών γονιδίων χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητικών μορίων τα οποία είτε είναι εξωτερικά και ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο, είτε είναι εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα και ενισχύουν επιμέρους περιοχές των δυο γονιδίων, προκειμένου να διαπιστώσουμε την θέση ρήξης. Σε τέσσερα δείγματα παρατηρήσαμε ρήξη σε διάφορες περιοχές του γονιδίου E1 και σε έξι δείγματα σε διάφορες περιοχές του γονιδίου E2 κυρίως προς το 5' άκρο του γονιδίου. Τέλος, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η καλύτερη πηγή δειγμάτων είναι οι τομές τραχηλικού ιστού αν και το καλύτερο θα ήταν να υπάρχουν από κάθε ασθενή διάφορες πηγές δειγμάτων για ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Βιολογία των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPV)

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από την λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν την μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη μιας σειράς βλαβών (εικόνα 1.1, πίνακας 1.1), οι οποίες εκτείνονται από τα κοινά θηλώματα μέχρι τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του πέους (zur Hausen H., 1996).



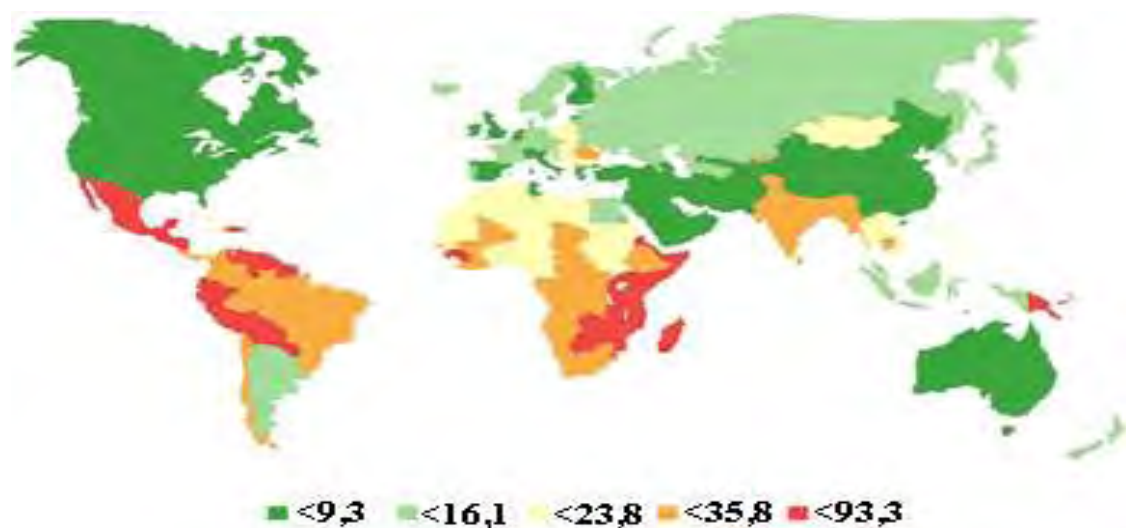
Εικόνα 1.1: Γενεαλογικό δέντρο των Papilloma ιών (PVs) στο οποίο φαίνονται και οι βλάβες που προκαλούν. Οι υψηλού κινδύνου (**High risk**) HPVs είναι κυρίως υπεύθυνοι για την πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Συμπτώματα	Στέλεχος
<i>Θηλώματα του πέλματος (μυρμηγκιές)</i>	HPV-1, 2, 4, 63
<i>Επίπεδα θηλώματα</i>	HPV-3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
<i>Μωσαϊκά θηλώματα</i>	HPV-2, 27, 57
<i>Epidermodisplasia Verruciformis</i> (επιδερμιδοδυσπλασία κονδυλωματώδης)	HPV-2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
<i>Επιδερμικές αλλοιώσεις (Μη θηλωματικές)</i>	HPV-37, 38
<i>Αναπνευστική παπιλλομάτωση</i>	HPV- 6, 11
<i>Καρκίνος των πνευμόνων</i>	HPV- 6, 11, 16, 18
<i>Κονδυλώματα στον λάρυγγα</i>	HPV-6, 11, 30
<i>Καρκίνος στον λάρυγγα</i>	HPV-16, 18
<i>Κονδυλώματα στην κοιλότητα της γνάθου</i>	HPV-16, 18
<i>Στοματική επιθηλιακή υπερπλασία</i>	HPV-13, 32
<i>Καρκίνος στο στόμα</i>	HPV-16, 18
<i>Στοματική λευκοπλακία</i>	HPV-16, 18
<i>Καρκίνος στον οισοφάγο</i>	HPV-16, 18
<i>Γιγάντια κονδυλώματα (Buschke-Lowenstein tumor)</i>	HPV-6, 11
<i>Κοινά θηλώματα</i>	HPV-1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65

Πίνακας 1.1: Διάφοροι τύποι HPV και τα συμπτώματα που προκαλούν.

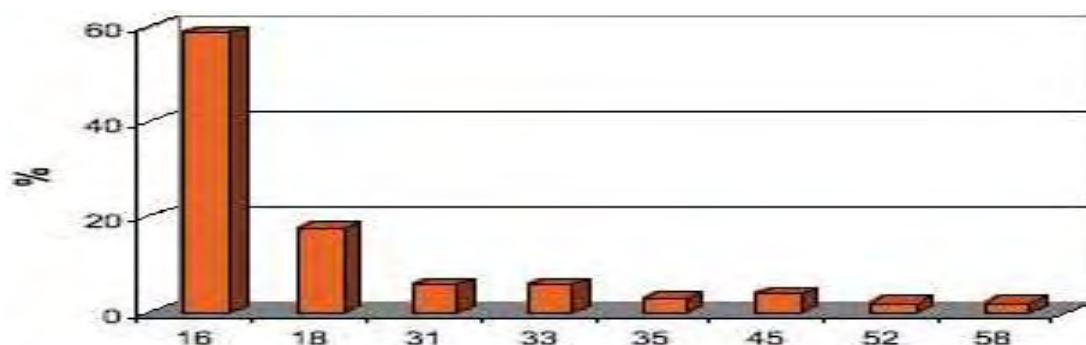
Ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων. Το 1935, παρατηρήθηκε από ερευνητές ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus*

εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία 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 ο άνθρωπος. Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 καθώς ανακαλύφθηκε, ότι ορισμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papillomaviruses) 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 και τον πέμπτο πιο θανατηφόρο καρκίνο στις γυναίκες (Parkin et al., 2000, Pisani et al., 2002). Περίπου 500.000 καινούργιες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου αναφέρονται ετησίως, με κυριότερη ηλικία ανάπτυξης κακοήθειας τα 52 χρόνια ενώ συγχρόνως 270.000 γυναίκες πεθαίνουν ετησίως από την ασθένεια (Boring et al., 1994, Pisani et al., 2002). Παγκοσμίως, το 80-85% των θανάτων παρατηρείται στις υποανάπτυκτες ή αναπτυσσόμενες χώρες (εικόνα 1.2). Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν βρεθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Δυτική Ευρώπη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο αριθμός των περιπτώσεων αυτού του τύπου καρκίνου ελαττώθηκε πάνω από 80% τα τελευταία χρόνια λόγω της εφαρμογής του τέστ Παπανικολάου (Pap test) ως διαγνωστική μέθοδο (Singer et al., 1995).



Εικόνα 1.2: Παγκόσμια ποσοστά θανάτων από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. (National Cancer Institute, www.cancer.gov).

Περίπου το 99% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι θετικές σε HPV μόλυνση. Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV υψηλού κινδύνου που προκαλούν καρκίνο είναι αυτοί που φαίνονται στην εικόνα 1.3 με τον HPV-16 (με τον οποίο ασχολείται και η παρούσα μελέτη) να καταλαμβάνει ποσοστό μεγαλύτερο του 50% και τον HPV-18 περίπου το 20% των περιπτώσεων (Bosch et al., 1995).



Εικόνα 1.3: Ποσοστά των τύπων HPV υψηλού κινδύνου που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται κυρίως μέσω δερματικής και σεξουαλικής επαφής. Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 130 διαφορετικοί τύποι HPV (Zur Hausen H., 2000). Μια ομάδα 30 στελεχών HPV μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα (Gillison ML and Shah KV, 2001). Οι HPV βάσει του τροπισμού τους μπορούν να διαχωριστούν σε ιούς που προσβάλλουν το δέρμα και σε ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες (πίνακας 1.2): στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση 'επεκτατικού' καρκίνου συνήθως του ουρογεννητικού συστήματος (εικόνα 1.4), στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk), τα μέλη της οποίας,

εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz et al., 2003).



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

Πίνακας 1.2: Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

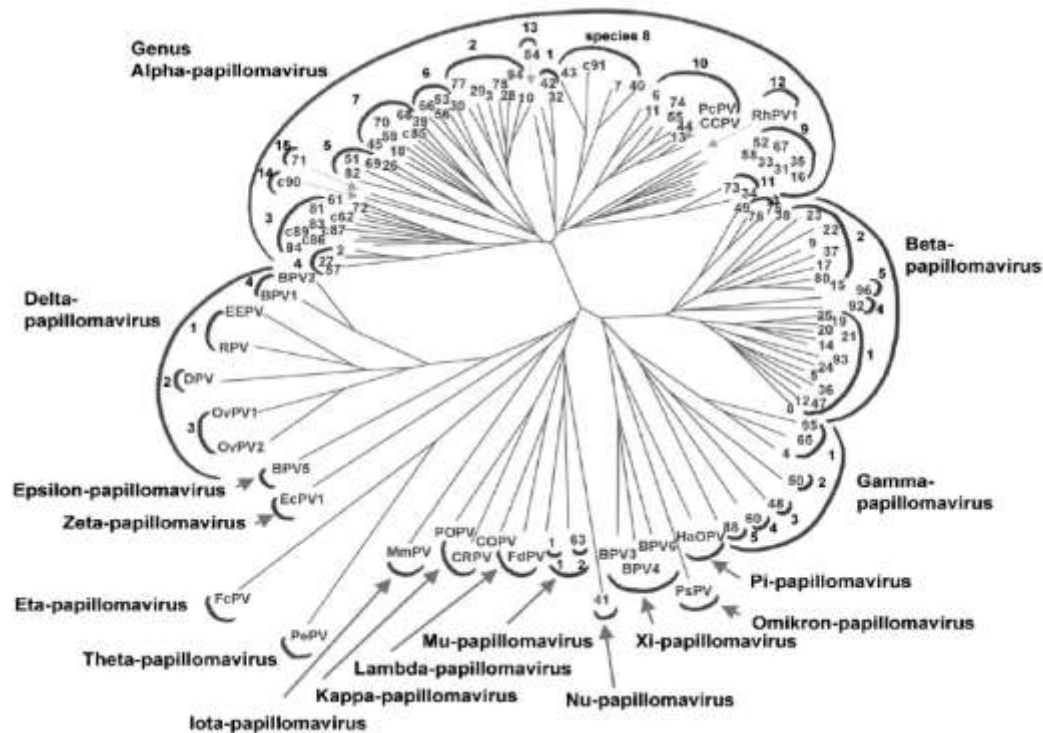
Εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας οι HPV επίσης σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους papilloma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

1.1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά είχαν ταξινομηθεί μαζί με τους polyoma ιούς και τον ιό SV40 σε μια ενιαία μεγάλη οικογένεια, την οικογένεια των Papovaviridae. Η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε σε ομοιότητες στην δομή των καψιδίων των ιών αυτών καθώς και στο γεγονός ότι διαθέτουν παρόμοιο δίκλωνο κυκλικό μορίο DNA. Αργότερα, όμως, παρατηρήθηκε ότι οι δυο αυτές ομάδες των ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, εντελώς διαφορετική γενωμική οργάνωση και καθόλου σημαντικές ομοιότητες στις νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες τους. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο να ταξινομηθούν οι παραπάνω ιοί, από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV), σε δυο διαφορετικές διακριτές οικογένειες. Την οικογένεια των Papillomaviridae, η οποία περιλαμβάνει όλους τους ιούς των θηλωμάτων (papillomaviruses) και την οικογένεια των Polyomaviridae που περιλαμβάνει τους polyomaviruses (de Villiers et al., 2004, The Papillomaviruses, 2007).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, οι papilloma ιοί ταξινομούνται βάση των διαφορών που υπάρχουν στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Το L1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (L1 ORF) είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο στους ιούς των θηλωμάτων και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται ακόμα για την ταξινόμηση νέων τύπων των ιών αυτών. Οι papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Έτσι έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του γονιδίου L1. Κάθε καινούργιος papilloma ιός που απομονώνεται αποτελεί διαφορετικό τύπο, αν η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από το γονίδιο L1 του κοντινότερου γνωστού τύπου, περισσότερο από 10%. Διαφορές μεταξύ 2% και 10% υποδηλώνουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορές λιγότερο από 2% υποδηλώνουν μια παραλλαγή (variant) (de Villiers et al., 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο (Doorbar J., 2006), ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lambda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 1.4 περιέχουν

στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Charles et al., 2007, Antonson A. and McMillan N.A., 2006).



Εικόνα 1.4: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers et al., 2004).

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο αριθμητικά γένος από τα υπόλοιπα και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Το γένος των Alpha-papillomaviruses επίσης συμπεριλαμβάνει και τους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV όπως έχει ήδη αναφερθεί ταξινομούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (High risk). Ο HPV-16 και ο HPV-18 είναι οι κύριοι παράγοντες για την πρόκληση τραχηλικών αλλοιώσεων οι οποίες μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου.

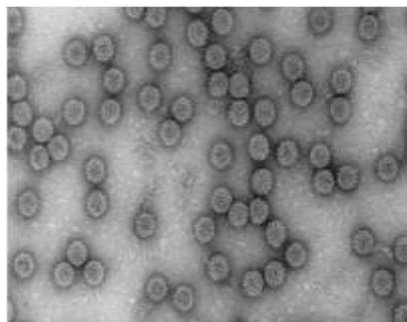
Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου ανευρίσκεται DNA ιών HPV και περίπου σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του ιού HPV-16 (Bosch et al., 2001). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται, ως ενδιάμεσου κινδύνου (Middle risk) και χαμηλού κινδύνου (Low risk), βάσει της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί χαμηλού κινδύνου εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου πολύ σπάνια, αλλά ερευνητικά και διαγνωστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος. (Doorbar J., 2006).

Οι τύποι HPV που προσβάλουν το δέρμα διαχωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά γένη (Beta, Gamma, Mu και Nu-papillomaviruses). Οι ιοί αυτοί συχνά εντοπίζονται σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί, ότι η μόλυνση από τα στελέχη του γένους beta σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis), μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Pfister H., 2003). Κυρίως τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 εμπλέκονται στο 90% αυτών των όγκων (Kremsdorf et al., 1983).

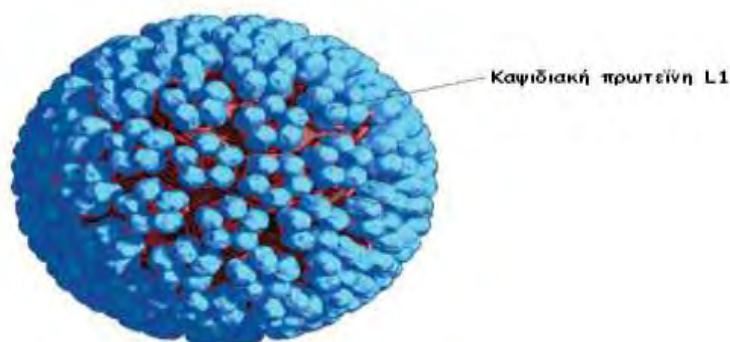
1.2 Δομή των Ανθρώπινων papilloma ιών (HPV)

1.2.1 Δομή του καψιδίου

Οι papilloma ιοί έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο 55-60 nm (Εικόνα 1.5). Η εξωτερική τους επιφάνεια αποτελείται από το καψίδιο, το οποίο συγκροτείται από 72 πενταμερή (καψομερίδια) της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (Εικόνα 1.6) (The Papillomaviruses, 2007). Η L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Luxton J. and Sepherd P., 2001; Yang et al., 2004). Επίσης, τα εμβόλια τα οποία κυκλοφορούν αυτή την στιγμή (Cervarix και Gardasil) περιέχουν καθαρές πρωτεΐνες L1 συγκεκριμένων τύπων HPV υψηλού κινδύνου. Όλα τα πενταμερή μαζί σχηματίζουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με triangulation number $T=7$. Η δεύτερη καψιδιακή πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη L2, η οποία παράγεται σε μικρότερες ποσότητες από την L1, τοποθετείται εσωτερικά του καψιδίου. Πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται στο C-τελικό της άκρο. Κύριος ρόλος της L2 είναι το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσυντεθέντα ιικά σωματίδια σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2 (Buck et al., 2004).



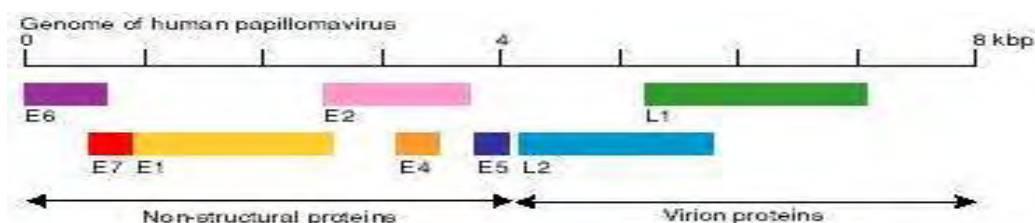
Εικόνα 1.5: Ιός των θηλωμάτων των βοοειδών (Bovine Papillomavirus, BPV). Ηλεκτρονική μικρογραφία. (The Papillomaviruses, 2007).



Εικόνα 1.6: Τρισδιάστατη απεικόνιση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV). Σ' αυτήν την εικόνα φαίνονται τα πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (Physians' Research Network).

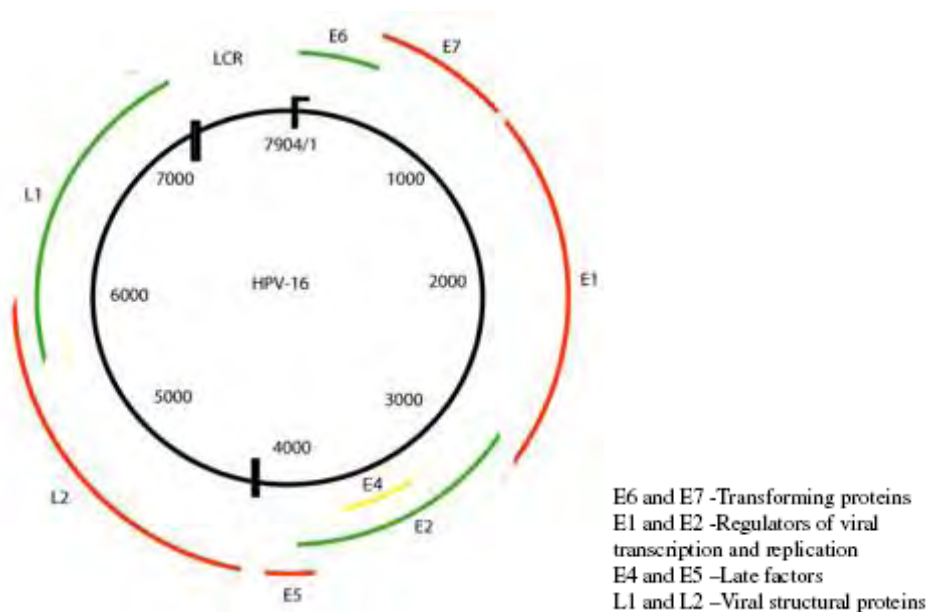
1.2.2. Γενωμική οργάνωση

Η οργάνωση του γενόματος είναι αρκετά συντηρημένη ανάμεσα στους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων και στους ιούς των θηλωμάτων των ζώων (εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7: Γενωμική οργάνωση του HPV -16.

Ο ιός φέρει ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 7.400 με 8.200 βάσεων (εικόνα 1.8) το οποίο αντιγράφεται ως ένα εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων του ξενιστή (The Papillomavirus, 2007).



Εικόνα 1.8: Δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA του HPV-16.

Στα ιικά σωματίδια, το DNA βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια μορφή που μοιάζει με χρωματίνη (Howley P.M., 1996). Το γένωμα περιλαμβάνει 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία εκφράζονται

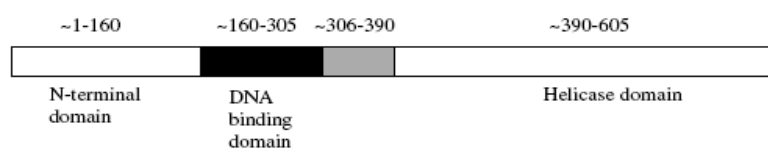
από πολυκιστρονικά mRNAs που προέρχονται από την ίδια αλυσίδα DNA, και χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές, βάση των λειτουργικών και δομικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E=Early region), την όψιμη περιοχή (L=Late region) και την ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos et al., 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές L1 και L2 πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο. Τόσο η περιοχή E όσο και η περιοχή L ακολουθούνται από μια θέση πολυαδενυλίωσης (polyA) (The Papillomaviruses, 2007). Η έκφραση του γενώματος των HPV τύπων υψηλού κίνδυνου (high-risk) ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, ο ένας από τους οποίους βρίσκεται πάνω από το E6 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων. Για παράδειγμα, στους HPV-16 και -31 ο υποκινητής αυτός ονομάζεται p97, ενώ στον HPV-18 ονομάζεται p105. Ο υποκινητής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων, στον HPV-31 ονομάζεται p742 (Hummel et al., 1992) και στον HPV-16 p670 (Grassmann et al., 1996).

Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR, η οποία ονομάζεται και URR (upstream regulatory region), έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6 (Demeret et al., 1995; Tan et al., 2002). Η LCR περιέχει πληθώρα ρυθμιστικών στοιχείων, όπως θέσεις σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων, υποκινητές, καθώς και την θέση έναρξης της αντιγραφής του γονιδιώματος των HPVs.

1.2.2.1. Η ιϊκή πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 (εικόνα 1.9) είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος (Ustav M. and Stenlund A., 1991). Παρουσιάζει μια εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστηριότητα

ελικάσης, ΑΤΡάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α (Wilson et al., 2002).



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της πρωτεΐνης E1.

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

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

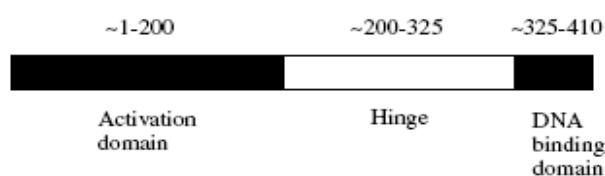
Η E1 προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo et al., 2003). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα E2 διμερές και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν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

Η E1 είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ιϊκή αντιγραφή (White et al., 2003).

1.2.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 (εικόνα 1.10) έχει μέγεθος περίπου 50 kDa και είναι διμερής. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αντιγραφή του ιϊκού DNA

όσο και στην ρύθμιση της μεταγραφής (Laimins L. A. 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: το καρβοξυ-τελικό άκρο, το οποίο διαθέτει μια διμερή δομή β-βαρελίου και είναι αυτό που συνδέεται στο DNA (Hedge et al., 1992), μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία ονομάζεται περιοχή-αρθμός (hinge region), και το αμινο-τελικό άκρο το οποίο έχει δομή α-έλικας πλούσιας σε γλουταμίνη (Antson et al., 2000; Harris S. F. and Botchan M. R., 1999) και αποτελεί μια περιοχή ενεργοποίησης, όταν το καρβοξυ-τελικό άκρο αλληλεπιδρά με την E1 (Chen G. and Stenlund A., 2000).



Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της πρωτεΐνης E2.

Τα διμερή E2 συνδέονται σε συντηρημένες παλινδρομικές αλληλουχίες (ACCN₆GGT) που ονομάζονται περιοχές σύνδεσης της E2 (E2 binding sites, E2BSs) (Laimins L. A., 1998). Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες περιοχές στην LCR και τρεις από αυτές περιβάλλουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής (Howley P. M., 1996). Με τον τρόπο αυτό η E2 βοηθά την E1 να συνδεθεί στην θέση έναρξης της αντιγραφής.

Επίσης επιδρά στην ρύθμιση της μεταγραφής, κυρίως των E6 και E7 γονιδίων, δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al., 1987). Πιο συγκεκριμένα, η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η E2 συνδέεται σε απομακρυσμένες από τον υποκινητή του E6 γονιδίου περιοχές, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων (Sp1, TFIID) 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 TFIID (Demeret et al., 1997; Dostatni et al., 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνδεσης των παραπάνω κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων και κατ' επέκταση την καταστολή της μεταγραφής.

1.2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

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

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

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

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

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

1.2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

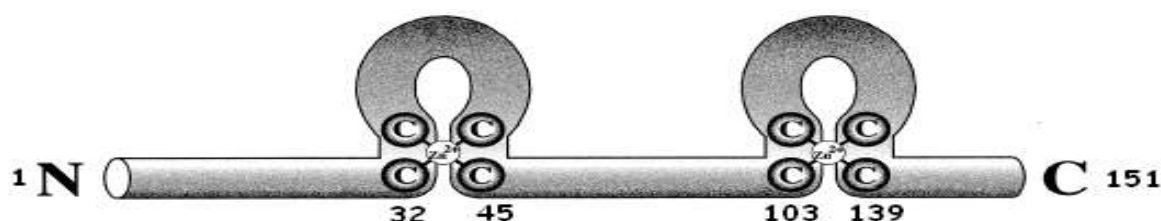
Η πρωτεΐνη E5 των HPVs υψηλού κινδύνου έχει βρεθεί, μαζί με τις πρωτεΐνες E6 και E7, ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση. Η E5 είναι μια υψηλά υδρόφοβη

μεμβρανοσυνδεόμενη πρωτεΐνη. Αποτελείται από 83 αμινοξέα και αλληλεπιδρά τόσο με το σύστημα Golgi, όσο και με το ενδοπλασματικό δίκτυο και την πυρηνική μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al., 1993).

Η E5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV-31 έχει αποδειχθεί ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα καθώς επίσης και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrmman et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores et al., 2000). Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al., 2005).

1.2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

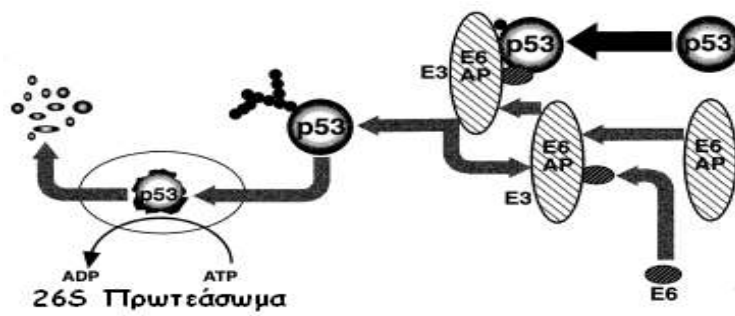
Η E6 πρωτεΐνες, τόσο στους χαμηλού κινδύνου όσο και στους υψηλού κινδύνου ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων, έχουν μέγεθος περίπου 150 αμινοξέων και περιέχουν στο μόριό τους δυο περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου οι οποίες διαθέτουν το μοτίβο Cys-X-X-Cys (εικόνα 1.11) (zur Hausen H., 2002).



Εικόνα 1.11: Η πρωτεΐνη E6 του HPV 16 στην οποία φαίνονται οι δυο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου.

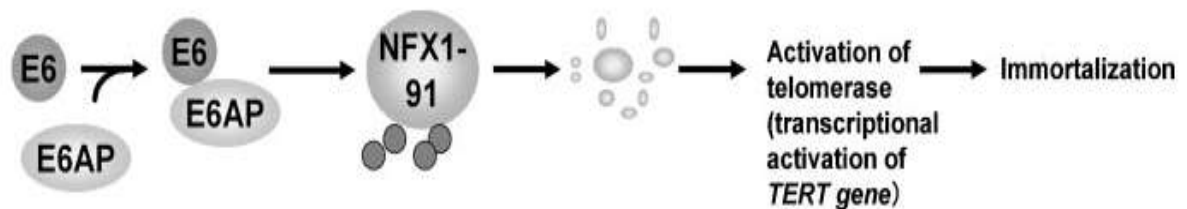
Η Ε6 των τύπων υψηλού κινδύνου εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και τον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων. Είναι μια από τις ογκοπρωτεΐνες των ιών αυτών και μαζί με την πρωτεΐνη Ε7 προκαλούν αθανασία και εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων. Η Ε6 επιφέρει αρκετές σημαντικές αλλαγές στα κύτταρα του ξενιστή μέσω αλληλεπίδρασής της με μια πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της Ε6 προκαλεί υπερπολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, απώλεια της διαφοροποίησης στα επιθηλιακά στρώματα και ανάπτυξη ήπιων και κακοήθων όγκων μέσω αναστολής της απόπτωσης, αλλαγής του μεταγραφικού μηχανισμού, καταστροφής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων (ένα σημαντικό στάδιο στην δημιουργία κακοήθειας) και αύξησης του χρόνου ζωής των κυττάρων.

Μια από τις κύριες λειτουργίες της Ε6 είναι η αλληλεπίδρασή της με το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53*, δηλαδή την πρωτεΐνη *p53*, η οποία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και λειτουργεί ως καταστολέας όγκων (Werness et al., 1990). Αναλύσεις ανθρώπινων όγκων έχουν δείξει ότι το γονίδιο *p53* είναι ένα από τα πιο κοινά μεταλλαγμένα γονίδια (Vogelstein B., 1990). Καταστάσεις κυτταρικού στρες όπως για παράδειγμα υπερίσχυση ακτινοβολία, υποξία ή μόλυνση από ιό προκαλούν αύξηση της κυτταρικής *p53*. Η αύξηση αυτή με την σειρά της επάγει την παραγωγή του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (CdK), δηλαδή του *p21*. Μ' αυτόν τον τρόπο σταματάει ο κυτταρικός κύκλος (στην φάση G1) και το κύτταρο έχει χρόνο να διορθώσει τις προκαλούμενες από το στρες, βλάβες στο DNA (Ko L.J. and Prives C., 1996; Kuebritz et al., 1992). Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η *p53* οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S. E. and Attardi L.D., 2005). Η Ε6 προκαλεί αποδόμηση της *p53* μέσω ουβικιτινίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η Ε6 συνδέεται με μια άλλη κυτταρική πρωτεΐνη, την Ε6ΑΡ η οποία λειτουργεί ως μια Ε3 ουβικιτινική λιγάση (Huibregtse et al., 1993; Scheffner et al., 1993). Το σύμπλοκο Ε6-Ε6ΑΡ προκαλεί ουβικιτινίωση της *p53* και στην συνέχεια την αποδόμηση της από το 26S πρωτεάσωμα (εικόνα 1.12) (Hubbert et al., 1992; Huibregtse et al., 1993). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επίσης, η Ε6 μπορεί να αναστείλει την *p53* μέσω της σύνδεσής της με το *p300/CBP*, ο οποίος είναι ένας συνενεργοποιητής της *p53* (Lechner M. S. and Laimins L.A., 1994; Zimmermann et al., 1999).



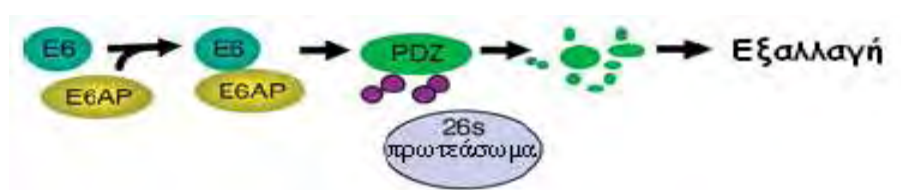
Εικόνα 1.12: Αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 μέσω της δράσης της πρωτεΐνης E6 των HPV's (Thomas et al., 1999).

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για την δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Klingelutz et al., 1996,). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων έτσι ώστε να αυξάνεται η σταθερότητα τους και να αποφεύγεται η σμίκρυνσή τους κατά την αντιγραφή. Η απώλεια της τελομεράσης οδηγεί στην προοδευτική σμίκρυνσή του τελομερικού DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων κατά την διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα την γήρανσή τους και τελικά τον θάνατό τους (Harley et al., 1990). Η τελομεράση είναι ενεργοποιημένη τουλάχιστον στο 90% των καρκινικών κυττάρων αλλά απουσιάζει από τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα (Kim et al., 1994). Η E6 επάγει την έκφραση της hTERT συμμετέχοντας στην αποικοδόμηση ενός καταστολέα του υποκινητή του γονιδίου *hTERT*, του NFX1-91 (εικόνα 1.13) (Yugawa T. and Kiyono T., 2009), γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της τελομεράσης την διατήρηση μεγάλων τελομερικών άκρων κατά την διαίρεση των κυττάρων με άμεση συνέπεια την αναστολή της γήρανσής τους και την απόκτηση αθανασίας (Artandi S.E. and Attardi L.D., 2005).



Εικόνα 1.13: Η διαδικασία με την οποία η πρωτεΐνη E6 των HPV υψηλού κινδύνου επάγουν την έκφραση της hTERT.

Τέλος, η E6 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσης τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου (εικόνα 1.14). Η αποδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας σε πειράματα με ποντίκια (Nguyen et al., 2003).



Εικόνα 1.14: Η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη E6 των HPV υψηλού κινδύνου αποδόμηση των πρωτεϊνών PDZ.

1.2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για την αθανασία όσο και για την παθογένεια του ιού είναι η E7. Οι E7 πρωτεΐνες, τόσο των τύπων υψηλού όσο και των τύπων χαμηλού κινδύνου, εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και έχουν μέγεθος περίπου 100 αμινοξέα (Munger et al., 1989; Riley et al., 2003). Η κυριότερη λειτουργία της E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb, p107, p130), οι οποίες λειτουργούν ως καταστολείς όγκων (Dyson N., 1989). 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 και περιέχει τα αμινοξέα 21-39 και είναι αρκετά συντηρημένη σε όλους τους τύπους υψηλού κινδύνου και τέλος την περιοχή CR3 η οποία περιέχει δυο μοτίβα 'δάχτυλα' ψευδαργύρου, περιλαμβάνει τα αμινοξέα 40-100 και βρίσκεται στο C-τελικό άκρο (εικόνα 1.15) (Dyson N., 1989). Οι περιοχές CR1

και CR2 έχουν μεγάλη αμινοξική ομολογία με τις περιοχές CR1 και CR2 του αδενοϊού E1A οι οποίες προσδένουν κι αυτές τις πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος (Phelps et al., 1988).

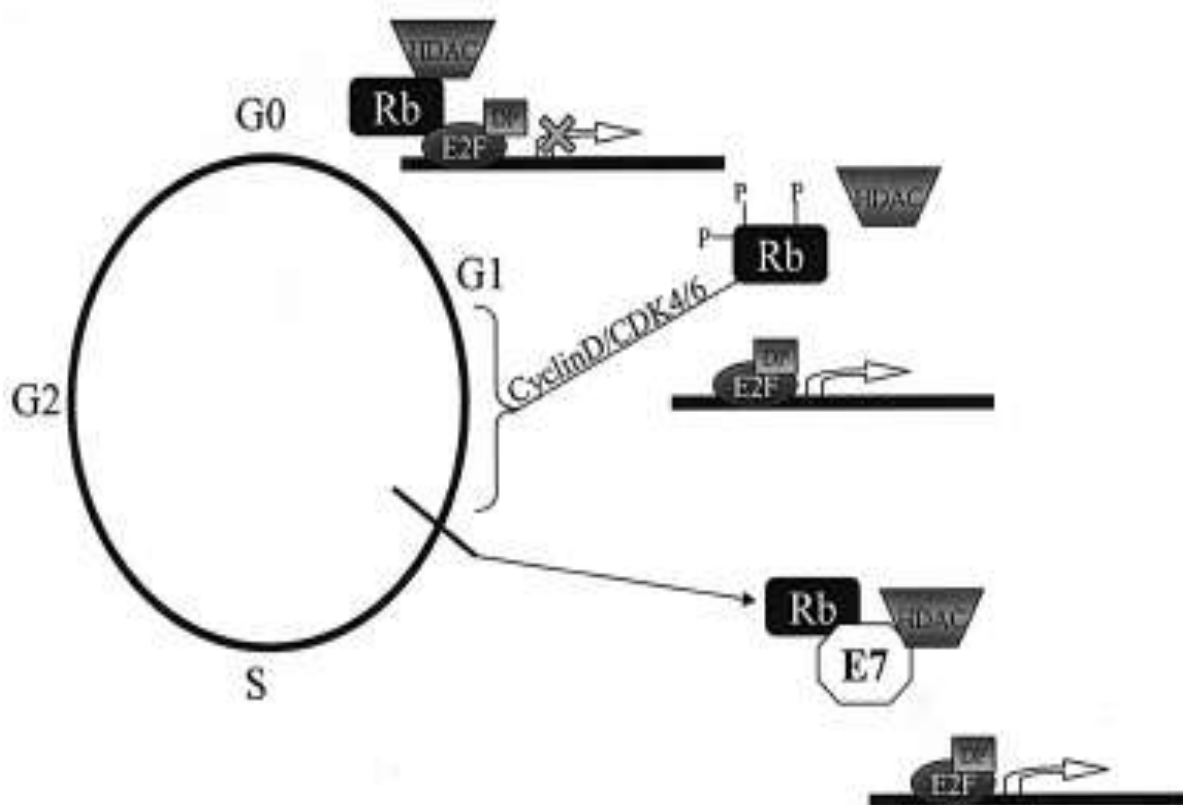


Εικόνα 1.15: Η πρωτεΐνη E7. Στην εικόνα αυτή φαίνονται οι τρεις περιοχές της πρωτεΐνης.

Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1 με συνέπεια να ενεργοποιείται και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA (Dyson et al., 1998; Chakrabarti O. and Krishna S., 2003) . Η πρωτεΐνη E7 δεσμεύει την αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου E2F/DP1 και κατ' επέκταση τον συνεχή πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Επίσης, η E7 αλληλεπιδρά και με την απακετυλάση των ιστονών (histone deacetylase, HDAC) (Brehm et al., 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η συνεργασία της με την pRb στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν μολυνθεί από HPV, η Rb προσδένει τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές που εξαρτώνται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Οι HDACs αφαιρούν ακετυλομάδες από πλούσιες σε λυσίνη αμινοτελικές ουρές ιστονών οι οποίες συγκροτούν τα νουκλεοσώματα. Επιπροσθέτως, μπορούν να απακετυλιώσουν απευθείας τους

μεταγραφικούς παράγοντες E2F, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους και κατ' επέκταση την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Marks et al., 2001). Η E7 συνδέει ταυτόχρονα την Rb και την HDAC, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στον υπερπολλαπλασιασμό και την αθανασία των μολυσμένων κυττάρων (Liu J.P., 1999). Όλα τα παραπάνω αναπαριστώνται στην εικόνα 1.16.

Τέλος, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. (Funk et al., 1997). Στον πίνακα 1.3 αναγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες όλων των πρωτεϊνών του ιού.



Εικόνα 1.16: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από της πρωτεΐνες Rb, HDAC και το μεταγραφικό σύμπλοκο E2F/DP-1, καθώς και πως επηρεάζεται από την δράση της E7.

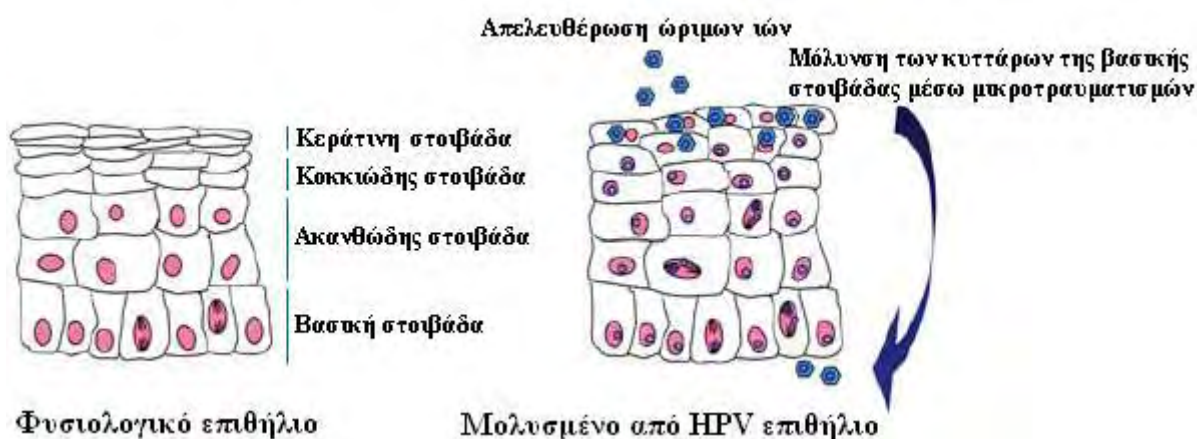
Γονίδιο	Λειτουργία
E1	Αντιγραφή του DNA, διατήρηση επισώματος, μεταγραφική καταστολή .
E2	Αντιγραφή του DNA (με την E1), έλεγχος μεταγραφής.
E3	Άγνωστη λειτουργία (έχει βρεθεί μόνο στον ιό BPV1).
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHRT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών (HDAC).
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη. Εμπλέκεται στην σταθεροποίηση της δομής του καψιδίου και πιθανώς και στο πακετάρισμα του DNA.

Πίνακας 1.3: Περιληπτική αναφορά όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

1.3 Ο κύκλος ζωής των HPV

1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή

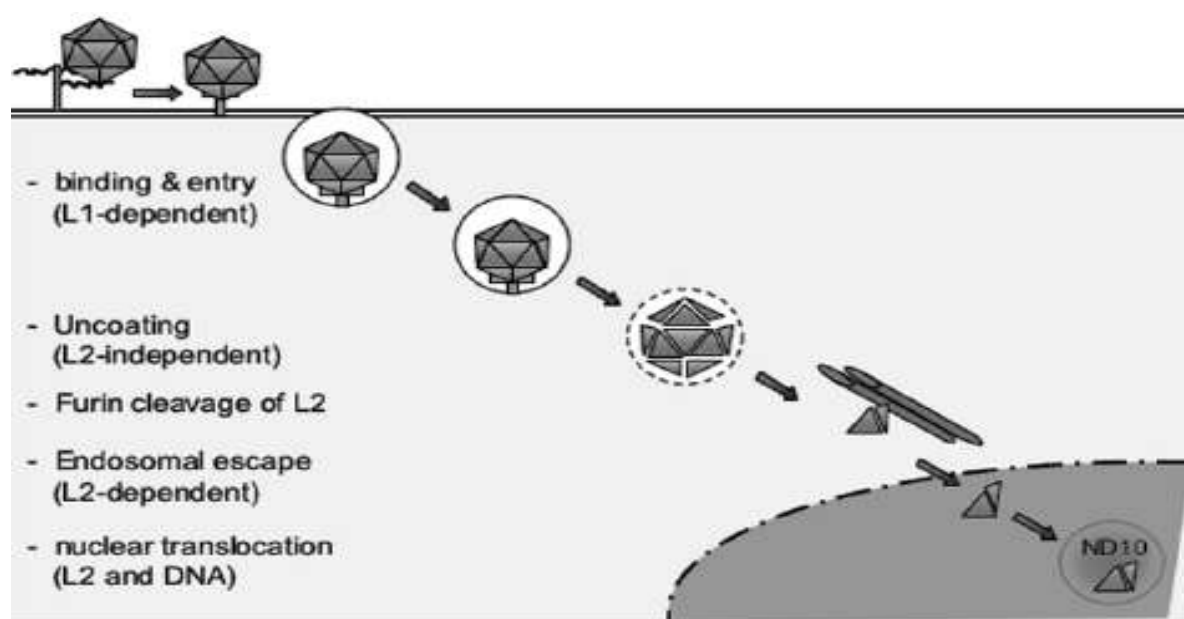
Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή (Howley and Lowy, 2001). Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17: Μόλυνση της βασικής στοιβάδας από HPV.

Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσης του με την θεϊκή ηπαρίνη η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti-Keramat et al., 2003). Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon et al., 2001). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp et al., 2006). Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έπειτα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα

λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (εικόνα 1.18) (Day et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί, ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών.

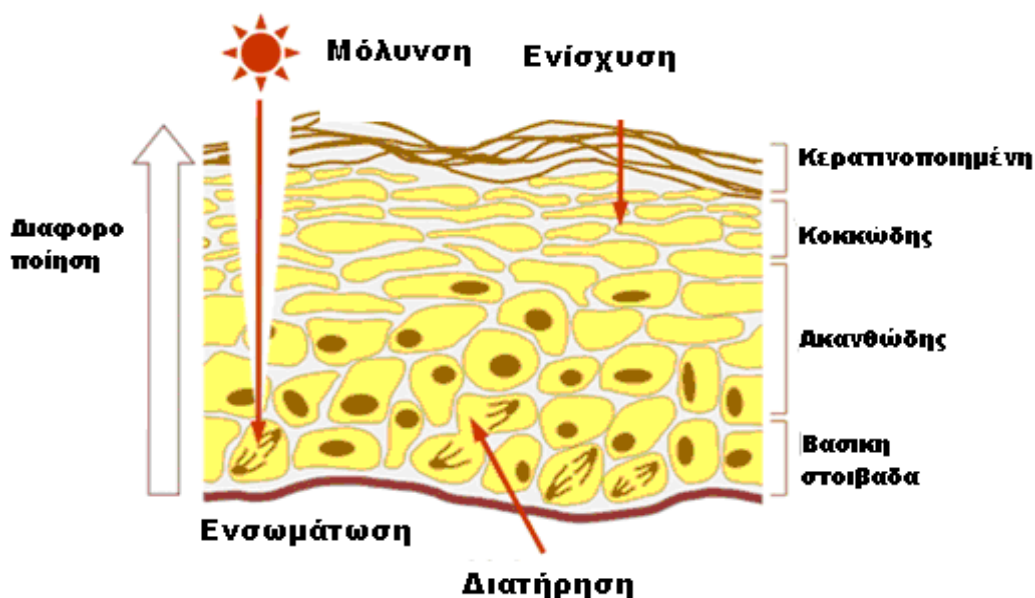


Εικόνα 1.18: Είσοδος του HPV στο κύτταρο και του DNA στον πυρήνα.

1.3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του γενώματος των HPV κατά την διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την ενσωμάτωση, την διατήρηση και την ενίσχυση (εικόνα 1.19). Κατά την διάρκεια της φάσης της ενσωμάτωσης που ακολουθεί την μόλυνση, ένα HPV γένωμα μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και ξεκινά αρκετούς γύρους αντιγραφής και φτάνει 50 - 100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Σε αυτό το σημείο το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Ακολουθώντας την ενσωμάτωση, το ιικό γένωμα αντιγράφεται, μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, κατά μέσο όρο ένα σε κάθε κυτταρικό κύκλο κατά την διάρκεια της φάσης S, με την διατήρηση ενός σταθερού αριθμού αντιγράφων τα οποία περιορίζονται σε δεκάδες εξαιτίας της ρύθμισης της έκφρασης των E1 και E2

από την E2 πρωτεΐνη (Steger G. and Corbach S. 1997; Stubenrauch et al., 1998b). Τα επίπεδα της E2 ρυθμίζουν την πρώιμη ιική μεταγραφή. Σε μικρό αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της E2, η E2 ενεργοποιεί την έκφραση από τον πρώιμο υποκινητή ο οποίος οδηγεί στην έκφραση των E1 και E2, ενώ, από την άλλη, η E2 σε υψηλά επίπεδα, παρεμποδίζει την μεταγραφή (Stubenrauch et al., 1998b). Μ' αυτόν τον τρόπο, η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και ο αριθμός των αντιγράφων του ιικού γενώματος πιστεύεται ότι διατηρούνται σε ένα σταθερό, ευνοϊκό επίπεδο στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Κατά την διαφοροποίηση, η μεταγραφή των αντιγραφικών γονιδίων εξαρτάται, όχι πλέον από τον E2-ρυθμιζόμενο πρώιμο υποκινητή, αλλά από τον περισσότερο ενεργό όψιμο υποκινητή ο οποίος είναι ανεξάρτητος από την πρωτεΐνη E2 (Klumpp D.J. and Laimins L.A., 1999). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των E1 και E2 πρωτεϊνών αντιγραφής από αυτόν τον ειδικό υποκινητή οδηγούν στην ενίσχυση του ιικού γενώματος σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέρθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffmann et al., 2006). Ανάλυση των επιπέδων των ιικών μετάγραφων κατά την διάρκεια της σύνθεσης του DNA υποδηλώνει ότι η E1 πρέπει να είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ενίσχυσης του ιικού γονιδιώματος (Ozbum M.A. and Meyers C., 1998a).



Εικόνα 1.19: Οι τρεις φάσεις της αντιγραφής του γενώματος του HPV (ενσωμάτωση, διατήρηση και ενίσχυση).

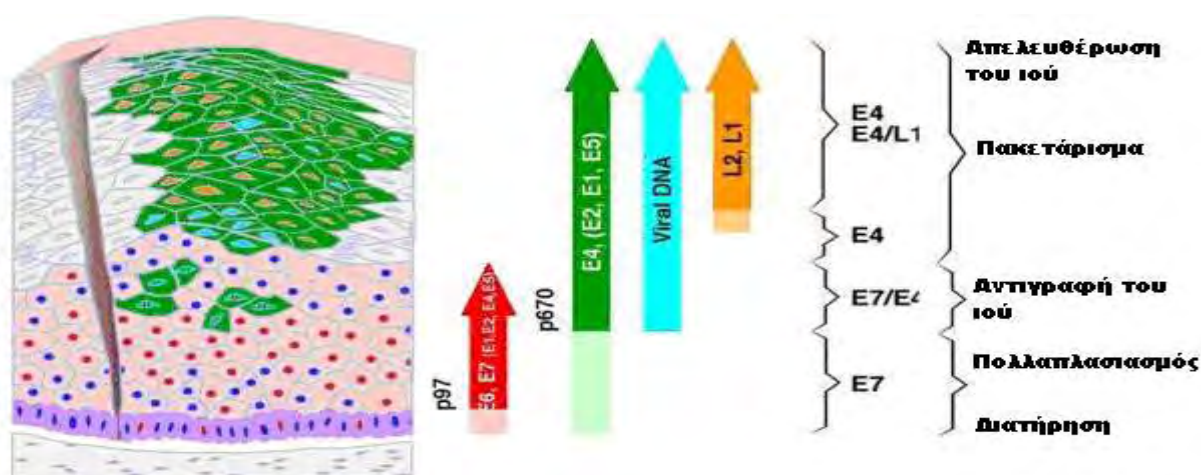
Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) (Corden et al., 1999; Pett et al., 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με την σειρά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

Σε χαμηλού βαθμού CIN αλλοιώσεων, το γονιδίωμα των HPV παραμένει σε επισωματική μορφή, και τα mRNA τα οποία κωδικοποιούνται από τον HPV και εκφράζονται σ' αυτές τις αλλοιώσεις περιέχουν μόνο ικές αλληλουχίες. (Lehn et al., 1988; Fukushima et al., 1990). Σε τραχηλικά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο, το ιικό γονιδίωμα είναι συχνά ενσωματωμένο στα χρωμοσώματα των κυττάρων-ξενιστών (Baker et al., 1987; Schwartz et al., 1985; Durst et al., 1985). Η ενσωμάτωση του γενώματος των HPV στις περισσότερες περιπτώσεις επιδρούν στην δημιουργία των mRNA τα οποία περιέχουν τα ικά ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και αλληλουχίες του κυτταρικού γονιδιώματος (Lehn et al., 1988; Choo et al., 1987). Η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος συμβάλει στην απορύθμιση της έκφρασης των ικών ογκογονιδίων E6 και E7 (von Knebel Doeberitz et al., 1991; Jeon S. and Lampert P.F., 1995). Τελικά, είναι πλήρως αποδεδειγμένο ότι η έκφραση αυτών των ογκογονιδίων είναι απαραίτητη για την πρόκληση και την διατήρηση του νεοπλασματικού φαινοτύπου των τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (von Knebel Doeberitz et al., 1994). Αυτές οι πληροφορίες υποδηλώνουν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου τα οποία εκφράζουν τα ενσωματωμένα στα χρωμοσώματα HPV ογκογονίδια, παρουσιάζουν ένα μεγάλο πλεονέκτημα επιλεκτικής ανάπτυξης και είναι επιρρεπή για κλωνική ανάπτυξη σε καρκινικά κύτταρα.

1.3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006).

Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στην σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1,E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1, L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670. 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 (Grassmann et al., 1996). Η μεταγραφή παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 1.20.



Εικόνα 1.20: Συνοπτική απεικόνιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος.

1.3.4 Ενσωμάτωση του ιικού γενώματος

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή σε μεγάλο ποσοστό 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 ιικού DNA στο γονιδίωμα του ανθρώπου αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την εξέλιξη των τραχηλικών αλλοιώσεων CIN (1,2,3) σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου (εικόνα 1.23) και είναι γεγονός ότι το DNA του ιού έχει βρεθεί ενσωματωμένο στην πλειοψηφία των τραχηλικών καρκίνων (Monica Cricca et al., 2009, Hudelist et al., 2004). Ενσωματωμένο HPV DNA έχει βρεθεί επίσης σε κυτταρικές σειρές που είχαν απομονωθεί από τραχηλικές νεοπλασίες, καθώς και σε αθάνατα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (Cricca et al., 2009).

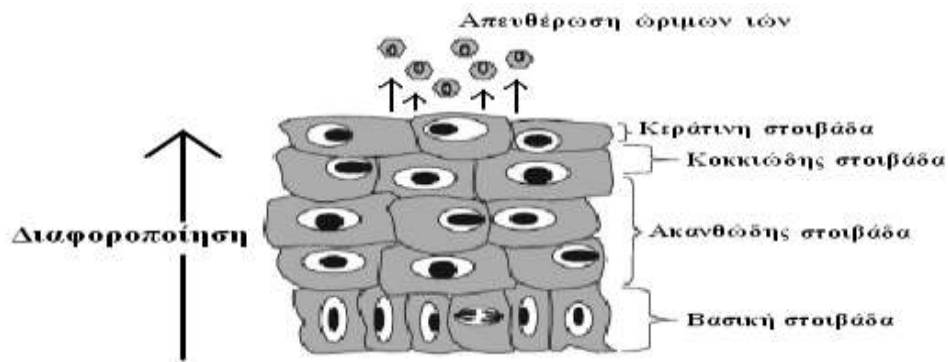
Κατά κανόνα, η ενσωμάτωση του γονιδιώματος των HPV στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή γίνεται στην περιοχή του γονιδίου E2 του ιικού γενώματος. Δηλαδή, κατά την ενσωμάτωση παρατηρείται διάσπαση του γονιδίου E2, με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της παραγωγής της πρωτεΐνης E2 και κατ' επέκταση την μη σωστή ρύθμιση και την αυξημένη παραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Αυτό το γεγονός παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή η μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 ελέγχεται από την E2 (Bechtold et al., 2003). Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο γονίδιο E1 (Arias-Pulido et al., 2006). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις (CIN 2,3) η διάσπαση περιλαμβάνει και το γονίδιο E1 και το γονίδιο E2, ενώ σε χαμηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις (CIN 1) μόνο το E1 έχει διασπαστεί. Τέλος, σε όλες τις περιπτώσεις CIN 2,3 παρατηρείται διάσπαση του E2 γονιδίου. Γι' αυτό το E2 φαίνεται να είναι καταλληλότερος στόχος από το E1 για τον προσδιορισμό της ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε υψηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις (Cricca et al., 2009).

Τέλος, σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται διάφορες κυτταρογενετικές αλλαγές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ή το κέρδος λειτουργίας πολλών κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες κυτταρογενετικές αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του HPV. Μερικά γονίδια γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου έχει παρατηρηθεί ότι διαρρηγνύονται λόγω της ενσωμάτωσης του HPV. Μερικά από αυτά είναι τα MYC, TP63, NR4A2, APM-1, FANCC, TNFAIP2 και hTERT (Wentzensen et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα η

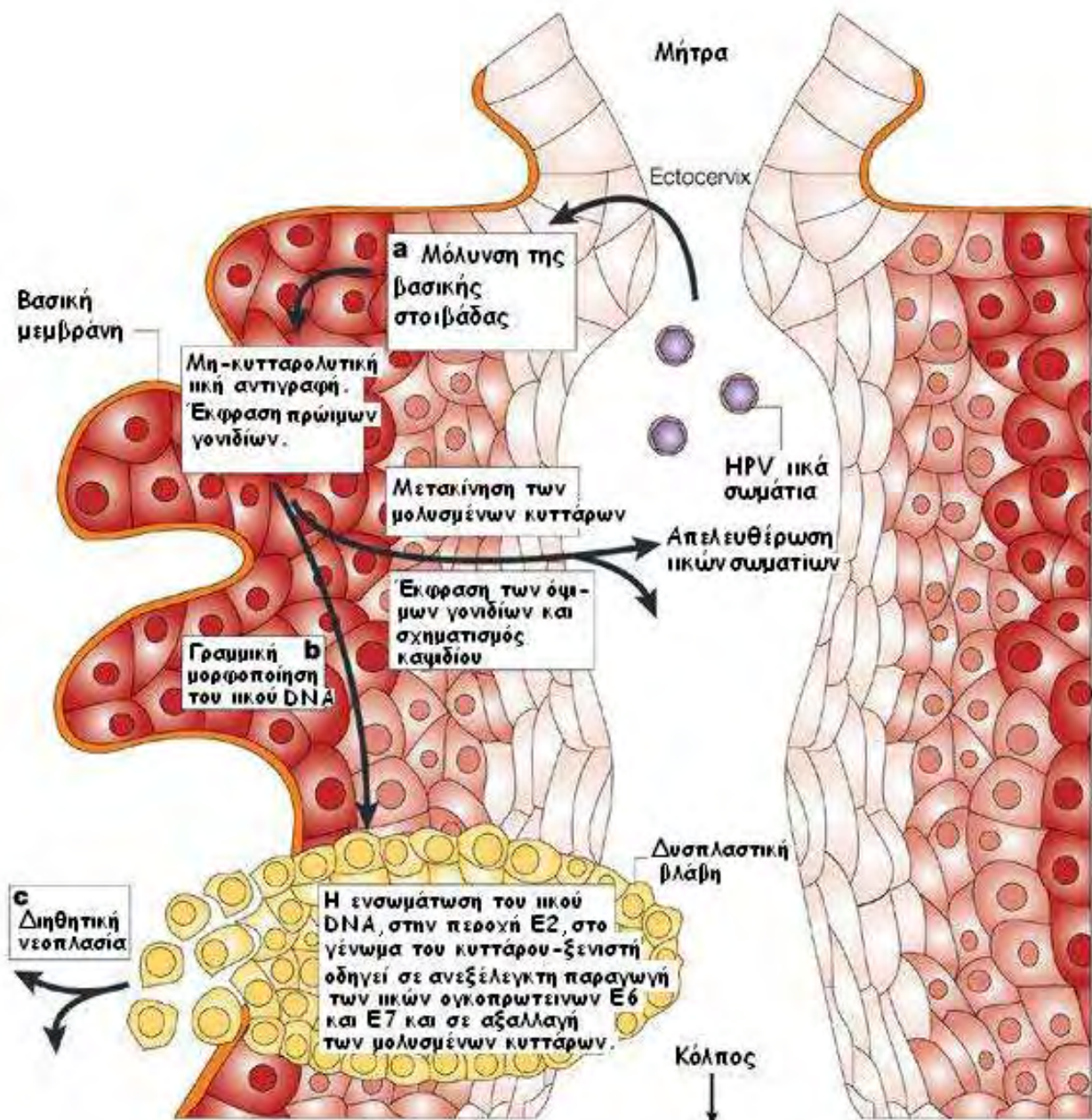
ενσωμάτωση του HPV-16 κοντά στο πρώτο-ογκογονίδιο c-myc, συναντάται στο 10% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σχετίζεται με την αυξημένη έκφρασή του πρώτο-ογκογονιδίου (Durst et al., 1987; Herrick et al., 2005, Wentzensen et al., 2004). Επομένως εκτός από την εκτεταμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων E6 και E7, η θέση στο κυτταρικό χρωμόσωμα όπου ο ιός έχει ενσωματωθεί προφανώς παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων.

1.3.5 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Στο τελικό στάδιο του κύκλου ζωής των HPV πραγματοποιείται η τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος μέσα στα νεοσυντεθέμενα ιικά καψίδια. Η συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων πραγματοποιείται στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα, και περιλαμβάνει, εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, και την πρωτεΐνη E2, η οποία έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck et al., 2004). Η L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή και σχηματίζει τα L1 πενταμερή, τα οποία είναι απαραίτητα για την συγκρότηση του καψιδίου, ενώ η L2 εντοπίζεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και πιστεύεται ότι συμβάλει στο πακετάρισμα του ιικού γενώματος εντός των νεοσυντεθέμενων καψιδίων (Florin et al., 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 (εικόνα 1.21). Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr et al., 2004). Στην εικόνα 1.22 απεικονίζεται συνολικά ο κύκλος ζωής των HPV.



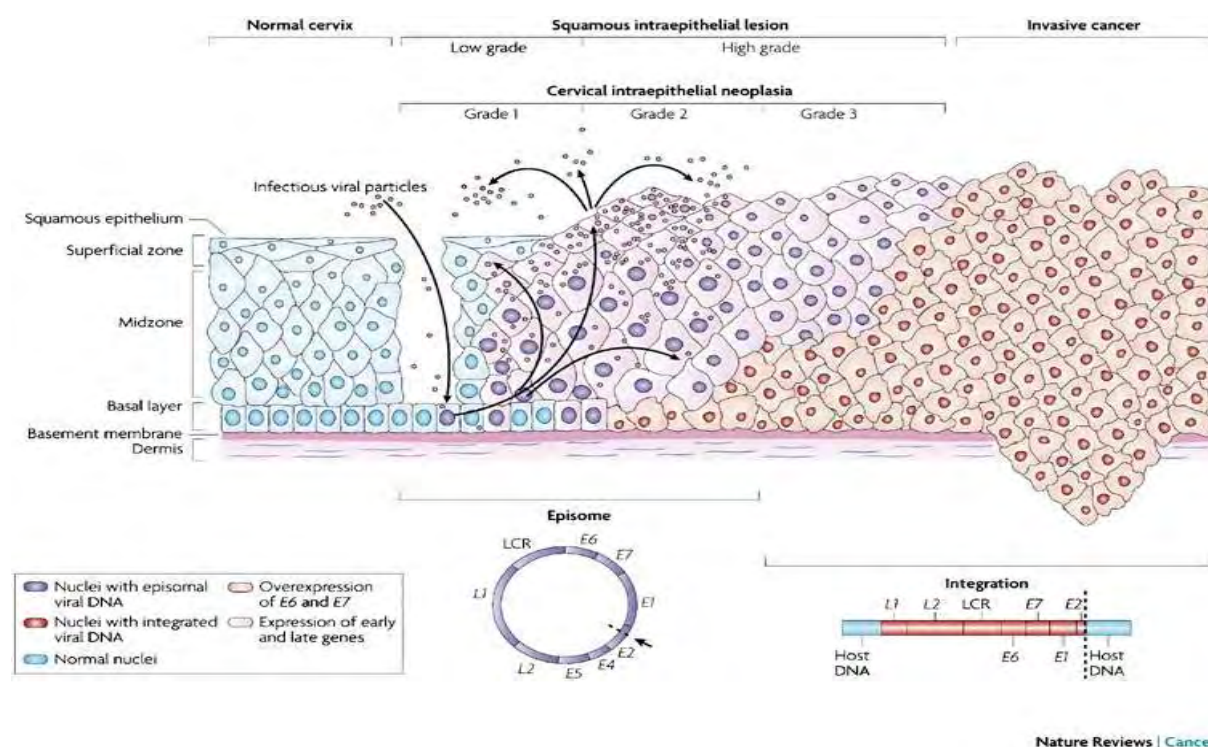
Εικόνα 1.21: Απελευθέρωση των ώριμων HPV ιών από την κεράτινη στοιβάδα.



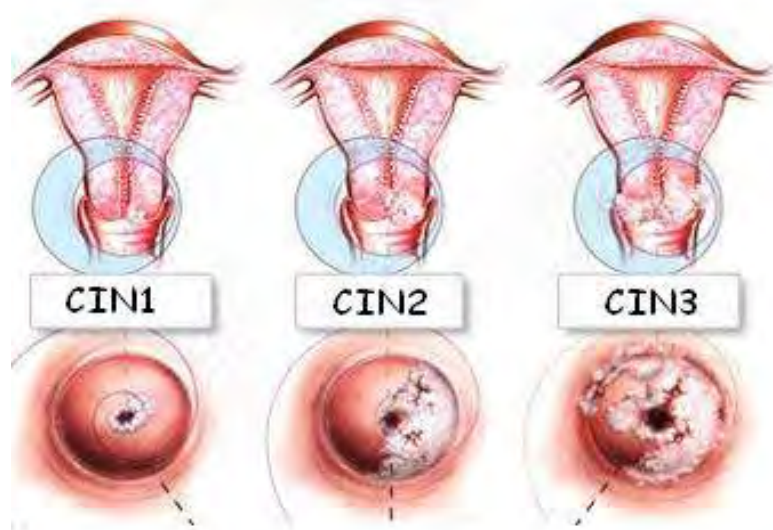
Εικόνα 1.22: Συνοπτική απεικόνιση του κύκλου ζωής των

1.3.6 Ιστολογικές αλλοιώσεις

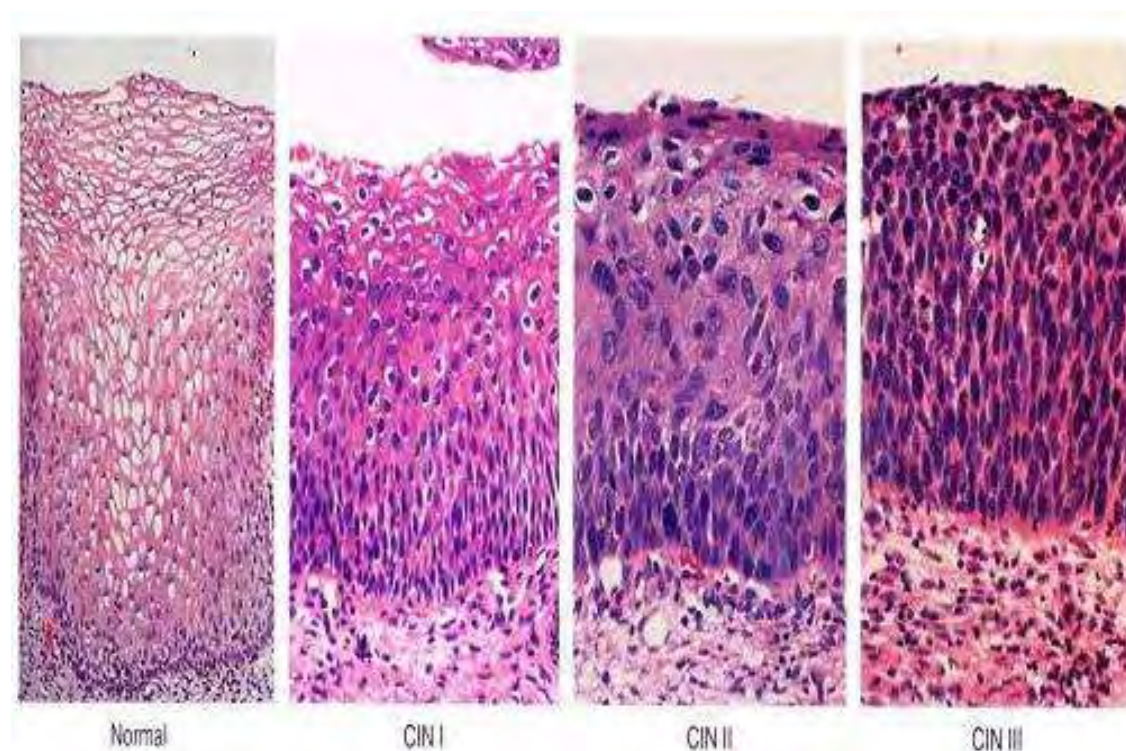
Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A. and Monk B.J., 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή όπως φαίνεται στην εικόνα 1.23. 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 η έκφραση κυτταροκερατινών, γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός και απαιτείται μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A., 2003). Οι παραπάνω αλλοιώσεις φαίνονται στις εικόνες 1.24 και 1.25. Τέλος, στην εικόνα 1.26 απεικονίζεται συνοπτικά όλη η πορεία, από την μόλυνση της βασικής στοιβάδας από τους HPV (τόσο χαμηλού όσο και υψηλού κινδύνου) μέχρι και τις αλλοιώσεις που αυτοί προκαλούν.



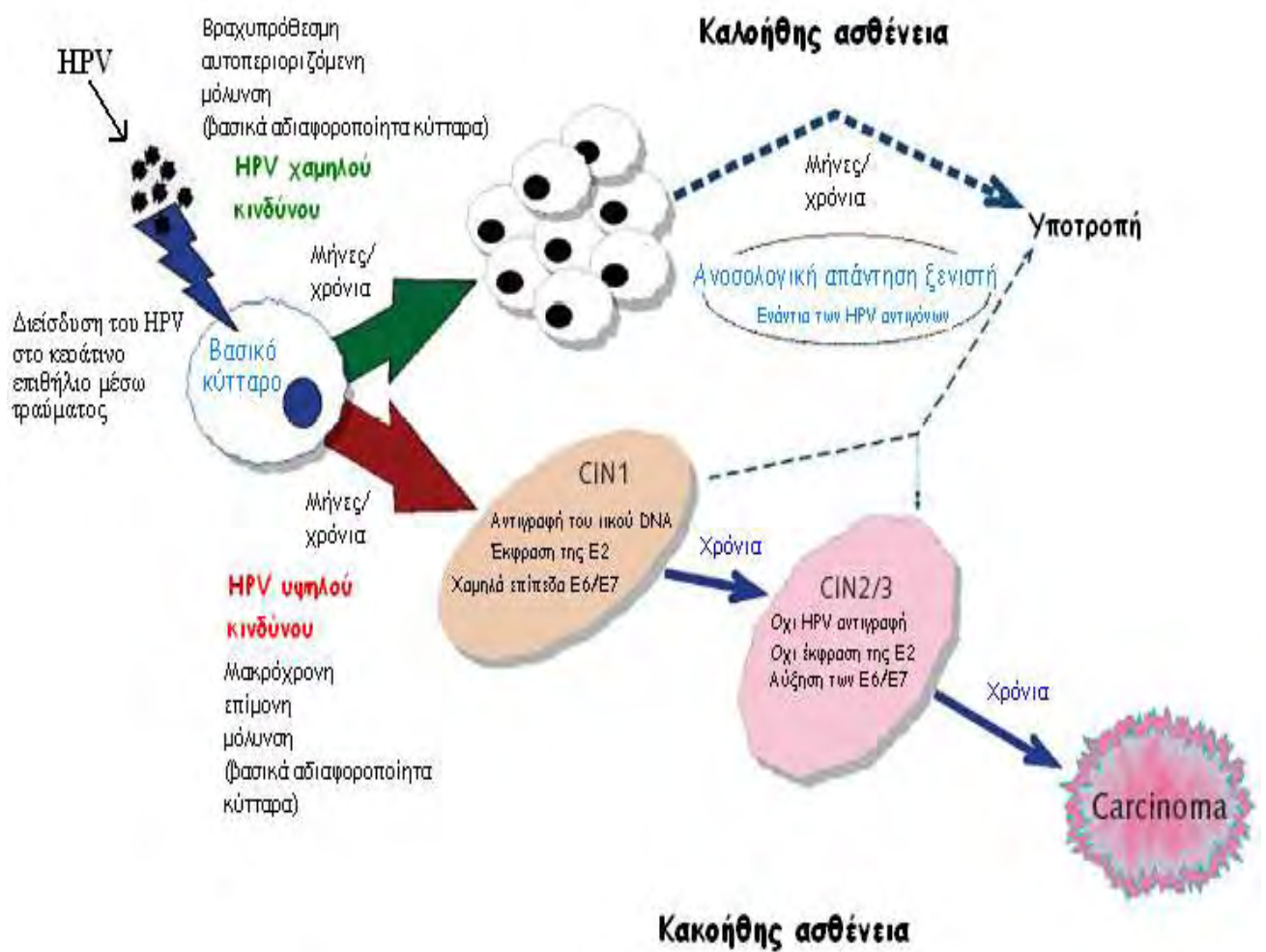
Εικόνα 1.23: Σχηματική απεικόνιση των αλλοιώσεων του επιθηλίου (CIN1-3, Invasive Cancer) σε μοριακό επίπεδο.



Εικόνα 1.24: Καρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.



Εικόνα 1.25: Μικροσκοπική ανάλυση τομών ιστού τραχήλου της μήτρας στην οποία φαίνονται οι αλλοιώσεις του επιθηλίου. Το στάδιο προσδιορίζεται από την μορφολογία που εμφανίζουν τα κύτταρα, καθώς και από την ποσότητα των καρκινικών κυττάρων.



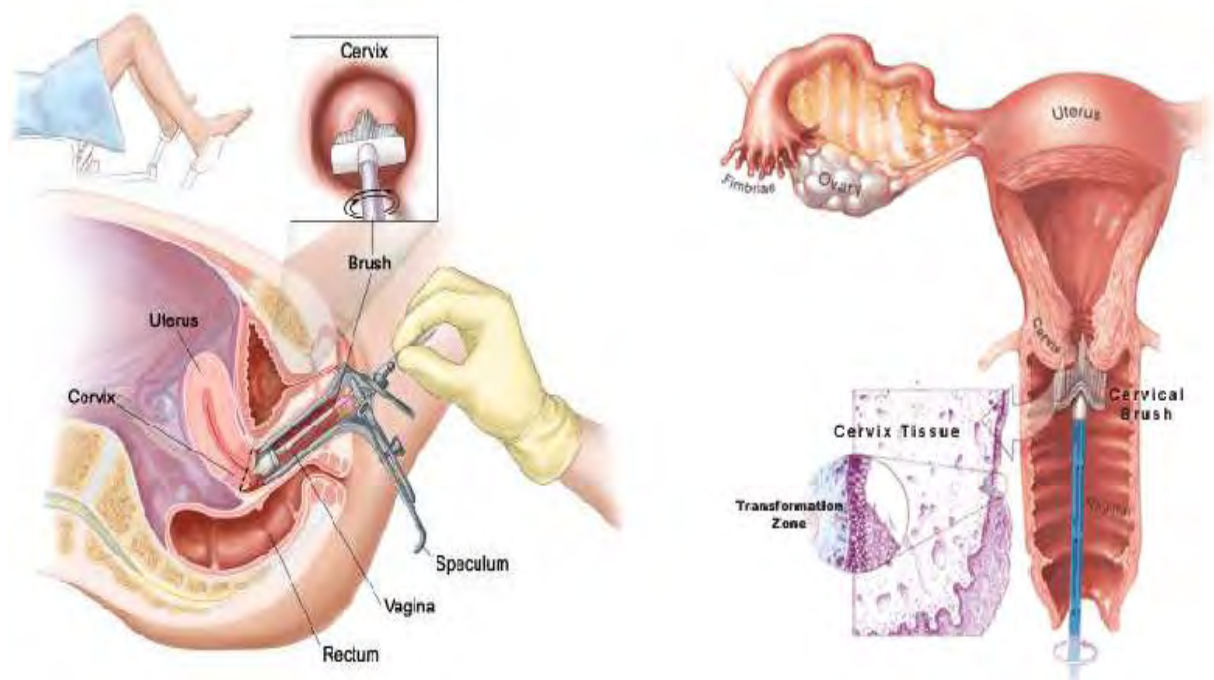
Εικόνα 1.26: Συνοπτική απεικόνιση της συνολικής πορείας των HPV, από την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου μέχρι και τις αλλοιώσεις που αυτοί προκαλούν.

1.4 Εργαστηριακή διάγνωση

Για την εργαστηριακή διάγνωση των HPV χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα στα νοσοκομεία κυρίως δύο μέθοδοι ρουτίνας. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν το test Pap και το Hybrid Capture-II και έχουν συμβάλει σημαντικά στην μείωση της επίπτωσης και της επέκτασης της ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες.

1.4.1 Τεστ Παπανικολάου (test Pap)

Το τεστ Παπανικολάου (test Pap) αποτελεί μια κυτταρολογική εξέταση και βασίζεται στην μικροσκοπική ανίχνευση μετασχηματισμένων τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 1.27). Επινόηθηκε από τον Έλληνα γιατρό Γεώργιο Παπανικολάου και εφαρμόζεται παγκοσμίως για περισσότερα από 50 χρόνια. Η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία των κυτταρολόγων και τον ποιοτικό έλεγχο που εφαρμόζεται σε κάθε εργαστήριο. Επισημαίνεται ότι το test Pap παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα όπως σχετικά υψηλό ποσοστό (15–70%) ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων και σημαντικό ποσοστό (5-15%) ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, τονίζεται ότι το test Pap έχει χαμηλή προγνωστική αξία καθώς “φωτογραφίζει” απλά την κατάσταση του τραχήλου τη στιγμή της λήψης. Το δείγμα μπορεί να απλωθεί απευθείας σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή μπορεί να τοποθετηθεί σε διάλυμα συντήρησης. Σύμφωνα με την Food and Drug Administration (FDA) υπάρχουν δύο μέθοδοι για την παρασκευή υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτές είναι το PrepStain σύστημα και η ThinPrep smear μέθοδος (Howell L.P. et al., 1998). Κατά την μέθοδο ThinPrep τα κύτταρα του τραχήλου συλλέγονται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως στο κλασικό test Pap, απλά διαφέρει ο τρόπος χειρισμού, μεταφοράς και εξέτασης του υλικού λήψης. Το PraipStain είναι ένα σύστημα παρασκευής υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων. Μετατρέπει ένα υγρό εναιώρημα κυττάρων σε ξεχωριστά βαμμένα, ομογενή διαγνωστικά κυτταρικά συμπλέγματα λεπτής στιβάδας. Με τις μεθόδους αυτές βελτιώνεται η ποιότητα και η ποσότητα του υλικού που εξετάζεται και συνεπώς η αξιοπιστία της εξέτασης. Επιπλέον, σε περίπτωση που κριθεί απαραίτητο μπορούν να γίνουν επιπλέον εξετάσεις στο ίδιο δείγμα όπως η ανίχνευση και ταυτοποίηση του HPV με μοριακές μεθόδους, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 1.27: Κύτταρα συλλέγονται από τον τράχηλο της μήτρας με την βοήθεια της τραχηλικής βούρτσας (Cervical Brush) και εξετάζονται μικροσκοπικά για τυχόν αλλοιώσεις. Τα κύτταρα που συλλέγονται αποτελούν το επίχρισμα Παπανικολάου (Pap smear).

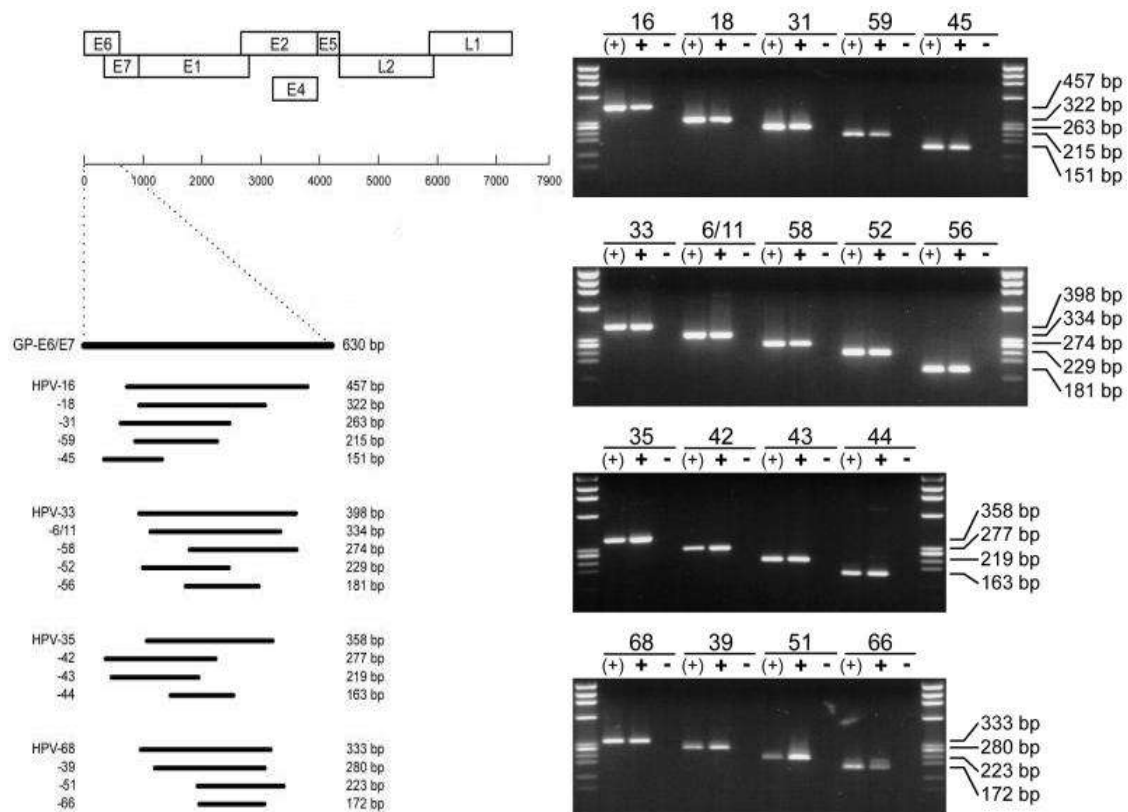
1.4.2 Hybrid Capture II test

Στις ΗΠΑ η FDA συνιστά στις γυναίκες άνω των 30 ετών για την ανίχνευση των HPV μαζί με το pap test και την χρήση του Hybrid Capture II test. Το Hybrid Capture II test είναι μια μη ραδιενεργή μέθοδος και βασίζεται στην ενίσχυση σήματος, από τον υβριδισμό σημασμένων DNA ανιχνευτών με το DNA του HPV στόχου (Bozzeti et al., 2000, Loriez et al., 1996). Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται DNA ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες 13 τύπων υψηλής επικυνδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπους χαμηλής επικυνδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44). Παρόλα αυτά μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των τύπων HPV με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση HPV λοίμωξης από ότι, το pap test και το Hybrid Capture II test. (Clavel et al., 2001; Cuzick et al., 1999; Schiffman et al., 2000).

1.4.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των HPV μολύνσεων. Υπάρχουν διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων DNA για την ανίχνευση των HPV. Ωστόσο οι PCR που χρησιμοποιούν εκκινητές που ενισχύουν την συντηρημένη περιοχή L1 του ιού χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικές μελέτες. Τέτοια συστήματα ενίσχυσης για την ανίχνευση των HPV είναι η PCR με συνδυασμό εκκινητών MY09/MY11 (MY-PCR) και η PCR με GP5+/GP6+. Το δύο αυτά συστήματα έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία αλλά διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης σε κάποιους τύπους HPV. Το MY09/MY11 είναι ένα μείγμα 25 εκκινητών ικανών να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα τύπων HPV. Τα προϊόντα της MY-PCR έπεται από ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη και να υποβληθούν σε υβριδισμό με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές ειδικούς για τους διάφορους τύπους HPV. Τέλος οι μεμβράνες εμφανίζονται με αυτοραδιογραφία. Γενικά το σύστημα MY09/MY11 φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστο για τον εντοπισμό πολλαπλών μολύνσεων (Weimin Qu et al., 1997).

Μια ακόμη σημαντική μέθοδος για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV είναι η Nested Multiplex PCR. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 (E6 και E7 ORFs) των πιο συχνά εμφανιζόμενων HPV υψηλού κινδύνου. Στην συνέχεια, τα προϊόντα αυτής της PCR υποβάλλονται σε Nested Multiplex PCR. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα ειδικά για κάθε τύπο HPV (type-specific primers) και ενισχύουν το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR E6 και E7 γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού. Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές συνήθως χρησιμοποιούνται σε μείγματα (cocktails). Εντός των μειγμάτων οι εκκινητές οργανώνονται μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους (T_m) (εικόνα 1.28, αριστερά) ενώ τα προϊόντα τους (PCR amplicons) θα πρέπει να είναι διαφορετικών ζευγών βάσεων (εικόνα 1.28, δεξιά) (Sotlar et al., 2004).



Εικόνα 1.28: Μείγματα τυπο-ειδικών εκκινητών με παραπλήσια T_m (αριστερά). Αποτελέσματα της Nested Multiplex PCR, όπου το κάθε μέγεθος (bp) αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο τύπο HPV (δεξιά), Sotlar et al., 2004.

Επίσης, εκτός από τις κλασσικές μεθόδους PCR, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV, χρησιμοποιείται επίσης η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR). Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή 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-E7 των HPV υψηλής επικυνδυνότητας. 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.

Τέλος, ένας ακόμη τρόπος για την ανίχνευση και 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 χρησιμοποιεί τον υβριδισμό

των σημασμένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια πλάκα η οποία διαβάζεται από ένα scanner εμφανίζοντας στην συνέχεια τα αποτελέσματα στην οθόνη ενός υπολογιστή. Η μέθοδος που κάνει χρήση της PCR και των microarrays ονομάζεται PCR/APEX. Η PCR/APEX χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου με την ενίσχυση 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. Στην μέθοδο της PCR/APEX αρχικά πραγματοποιείται μια multiplex PCR με διαφορετικούς primers για κάθε τύπο HPV. Στην συνέχεια τα προϊόντα υποβάλλονται σε ειδική επεξεργασία κατά την οποία προστίθενται σ' αυτά χρωστικές που φθορίζουν και τοποθετούνται σε microarray chip στο οποίο είναι ακινητοποιημένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα τμήμα του γονιδίου E7 για να λάβει μέρος ο υβριδισμός. Μετά τον υβριδισμό το chip ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τυχόν μη υβριδοποιημένα νουκλεοτίδια και σαρώνεται για να εντοπιστούν οι θέσεις υβριδισμού που φθορίζουν δίνοντας έτσι σήμα που επεξεργάζεται από κατάλληλο λογισμικό. Το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να αναδειχθούν οι συμπληρωματικές αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τον τύπο του HPV (Gheit et al., 2006).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κλινικά Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 43 κλινικά δείγματα χαμηλού (Low Grade, LG) και υψηλού βαθμού (High Grade, HG) τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Τα 20 (επιχρίσματα σε ThinPrep και σε καλυπτρίδα) από αυτά προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, τα 11 (τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου με παραφίνη) από ένα ιδιωτικό παθολογοανατομικό ιατρείο και τα 12 (επιχρίσματα σε ThinPrep) από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Άγιος Σάββας'. Όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας ως HPV -16 με την μέθοδο της Nested Multiplex PCR σύμφωνα με την δημοσίευση του Sotlar και των συνεργατών του, το 2004. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (2.1).

2.2 Απομόνωση του DNA

2.2.1 Απομόνωση DNA από κλινικά δείγματα που φυλάσσονται σε ThinPrep.

Η απομόνωση του DNA έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1996). Από κάθε τραχηλικό επίχρισμα πήραμε 100μl, τα οποία τα αναμείξαμε μετά από καλό vortex με 10μl/tube γλυκογόνο και 600μl Lysis Buffer αποτελούμενου από: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate και τα επώασαμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl κρύας ισοπροπανόλης διατηρημένης στους -20°C. Μετά από καλό vortex τα δείγματα έμειναν στον πάγο για 20min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C. Η ισοπροπανόλη (υπερκείμενο) απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500μl κρύας αιθανόλης 70%. Μετά από καλό vortex ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C. Η αιθανόλη (υπερκείμενο) απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA επαναδιαλύθηκαν σε 100μl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το

απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

Κωδικοποίηση Δειγμάτων	Υλικό απομόνωσης	Κλινική Εικόνα	Προέλευση
ΠΝΑ 2	ThinPrep	Δυσπλασία τραχήλου	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 4	ThinPrep	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 5	ThinPrep	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 6	ThinPrep	HG (CIN II – III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 7	ThinPrep	HG (Ca in situ)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 8	ThinPrep	HG (CIN II, HSIL)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 9	ThinPrep	LG (CIN I – II)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 10	ThinPrep	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 11	ThinPrep	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 15	ThinPrep	HG (Βιοψία: CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ 16	ThinPrep	HG (Ca τραχήλου διηθητικό)	Παν. Νοσ. Λάρισας
2121	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2127	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2148	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2186	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2209	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2216	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2279	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
2290	ThinPrep	CIN0	Άγιος Σάββας
A3	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A4	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A6	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A13	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A15	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A17	Επίχρισμα	LG (CIN I)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A24	Επίχρισμα	LG (CIN I)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A31	Επίχρισμα	HG (CIN III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
A38	Επίχρισμα	LG (CIN I)	Παν. Νοσ. Λάρισας
Δ2	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ3	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ4	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ7	Τομή ιστού σε παραφίνη	LG (CIN I-II)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ13	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ14	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ15	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ16	Τομή ιστού σε παραφίνη	HG (CIN III)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ30	Τομή ιστού σε παραφίνη	LG (CIN I-II)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ34	Τομή ιστού σε παραφίνη	LGSIL	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
Δ42	Τομή ιστού σε παραφίνη	LG (CIN I-II)	Ιδ. παθολ/τομικό ιατρείο
793	ThinPrep	LG (CIN I-II)	Άγιος Σάββας
796	ThinPrep	LG (CIN I-II)	Άγιος Σάββας
858	ThinPrep	LG (CIN I-II)	Άγιος Σάββας
868	ThinPrep	LG (CIN I-II)	Άγιος Σάββας

Πίνακας 2.1: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης.

2.2.2 Απομόνωση DNA από τομές τραχηλικού ιστού οι οποίες είναι μονιμοποιημένες με παραφίνη.

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

Κάθε υπερκείμενο της ανωτέρω εκχύλισης (που αντιστοιχεί σε διαφορετικό κλινικό δείγμα) επεξεργάστηκε περαιτέρω με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.1 , ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του εκχυλισθέντος DNA.

2.2.3 Απομόνωση DNA από καλυπτρίδα πάνω στην οποία βρίσκονται μονιμοποιημένα τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα για εξέταση Pap test.

Η απομόνωση DNA από την καλυπτρίδα πάνω στην οποία είχαν μονιμοποιηθεί κύτταρα για την εξέταση test pap έγινε με την χρήση πρωτεΐνάσης K. Από κάθε καλυπτρίδα απομακρύνθηκαν τα κύτταρα με νυστέρι, τοποθετήθηκαν μέσα σε σωληνάρια Eppendorf και αναμείχθηκαν με 0,5 έως 1,5 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων. Στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου ενώ το ίζημα διαλύθηκε με την προσθήκη 1 ml buffer I (10 mM Tris, 1mM EDTA) και επώαστηκε στους 4°C για 1 ώρα. Με το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min, διαλυτοποίηση του ιζήματος με 50 μl buffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,5%

Tween 20) και προσθήκη 1μl πρωτεΐνάσης K (20μg/μl). Το μείγμα με το ένζυμο παρέμειναν στους 55°C για 60 min ενώ ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 95°C για 10 min για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 13.000 rpm για 5 min και συλλογή του υπερκείμενου το οποίο περιείχε και DNA.

Στην συνέχεια για να αυξήσουμε την καθαρότητα του υπερκείμενου κάθε δείγματος και να απομακρύνουμε επιπλέον κύτταρα και πρωτεΐνες που είχαν παραμείνει μετά το τέλος της πρώτης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη σε σειρά απομόνωση DNA, με την διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.1.

2.3 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου E1 του HPV-16

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητικών μορίων, τα οποία δημοσιεύθηκαν στην εργασία των Arias-Pulido et al., 2006 και ενισχύουν το γονίδιο E1 του HPV-16 σε επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα. Η αλληλουχία αυτών των εκκινητικών μορίων μαζί με το μέγεθος των τμημάτων του γονιδίου E1 που ενισχύουν φαίνονται στον πίνακα 2.2.

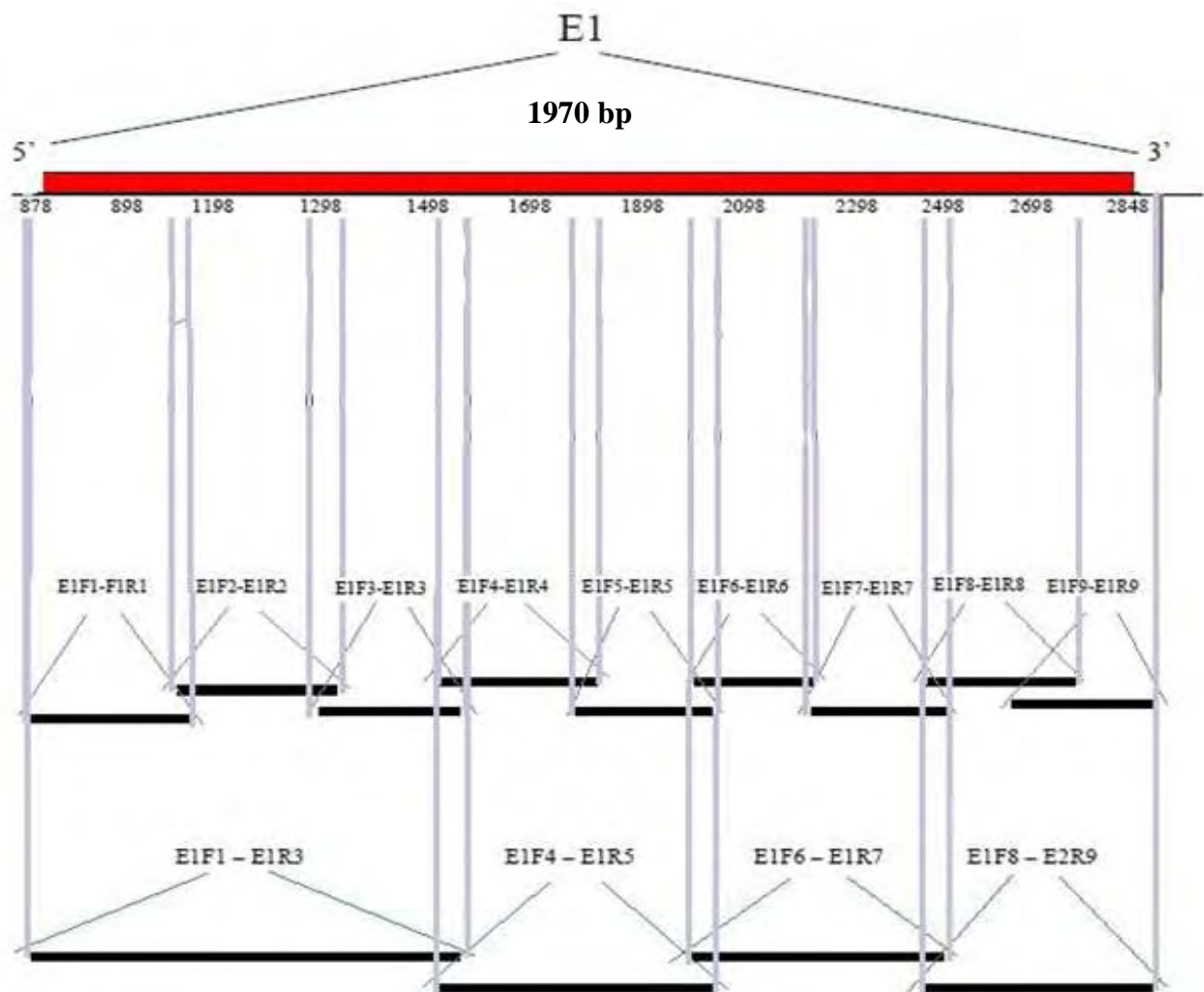
Επειδή τα ενισχυμένα τμήματα θα ήταν πάρα πολλά για όλα τα δείγματα, για λόγους ευκολίας τα εκκινητικά μόρια του πίνακα 2.2 ομαδοποιήθηκαν δημιουργώντας μ' αυτό τον τρόπο μεγαλύτερα PCR προϊόντα. Τα ομαδοποιημένα ζεύγη παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3. Στις περιπτώσεις που κάποια τμήματα του γονιδίου E1 δεν ενισχύθηκαν με τα ομαδοποιημένα ζεύγη εκκινητών, υποβλήθηκαν σε PCR με τα ζεύγη των εκκινητών του πίνακα 2.2, προκειμένου να προσδιορισθεί η θέση ρήξης του. Στην εικόνα 2.1 παρουσιάζονται σχηματικά οι θέσεις σύνδεσης των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του γονιδίου E1.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR
E1F1	878 – 896	Sense	CAGGTACCAATGGGGAAGA	241 bp
E1R2	1095 – 1118	Antisense	ACCTGTA CTGCATCTCTATGTTGT	
E1F2	1059 – 1079	Sense	GACAGCACATGCGTTGTTTAC	265 bp
E1R2	1306 – 1323	Antisense	AGTCTCATGGCGCCCTTC	
E1F3	1312 – 1330	Sense	CGCCATGAGACTGAAACAC	212 bp
E1R3	1503 – 1523	Antisense	GAAAAACTCACCCCGTATAAC	
E1F4	1503 – 1523	Sense	GTTATACGGGGTGAGTTTTTC	282 bp
E1R4	1763 – 1784	Antisense	ATCATCATACACATTGGAGACA	
E1F5	1760 – 1782	Sense	GTGTGTCTCCAATGTGTATGATG	232 bp
E1R5	1968 – 1991	Antisense	GCAATTTCACTATCGTCTACTATG	
E1F6	1952 – 1974	Sense	GGGCCTACGATAATGACATAGTA	235 bp
E1R6	2168 – 2186	Antisense	TGCTTCCAATCACCTCCAT	
E1F7	2170 – 2187	Sense	GGAGGTGATTGGAAGCAA	316 bp
E1R7	2464 – 2485	Antisense	CCAATGCATTTCTTAAATTGTC	
E1F8	2443 – 2466	Sense	CCCTGTTGGA ACTACATAGATGAC	301 bp
E1R8	2725 – 2743	Antisense	CCTCGTCCTCGTGCAAACT	
E1F9	2662 – 2686	Sense	CCAGTGTATGAGCTTAATGATAAGA	187 bp
E1R9	2824 - 2848	Antisense	GTCTATATGGTCACGTAGGTCTGTA	

Πίνακας 2.2: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων από την δημοσίευση των Arias-Pulido et al., 2006, καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους, η πολικότητά τους και το μέγεθος του προϊόντος της PCR (PCR product length).

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR
E1F	878 – 896	Sense	CAGGTACCAATGGGGAAGA	645 bp
E1R3	1503 – 1523	Antisense	GAAAAACTCACCCCGTATAAC	
E1F4	1503 – 1523	Sense	GTTATACGGGGTGAGTTTTTC	488 bp
E1R5	1968 – 1991	Antisense	GCAATTTCACTATCGTCTACTATG	
E1F6	1952 – 1974	Sense	GGGCCTACGATAATGACATAGTA	533 bp
E1R7	2464 – 2485	Antisense	CCAATGCATTTCTTAAATTGTC	
E1F8	2443 – 2466	Sense	CCCTGTTGGA ACTACATAGATGAC	405 bp
E1R9	2824 - 2848	Antisense	GTCTATATGGTCACGTAGGTCTGTA	

Πίνακας 2.3: Παρουσιάζονται τα ομαδοποιημένα ζεύγη των εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης των Arias-Pulido et al., 2006.

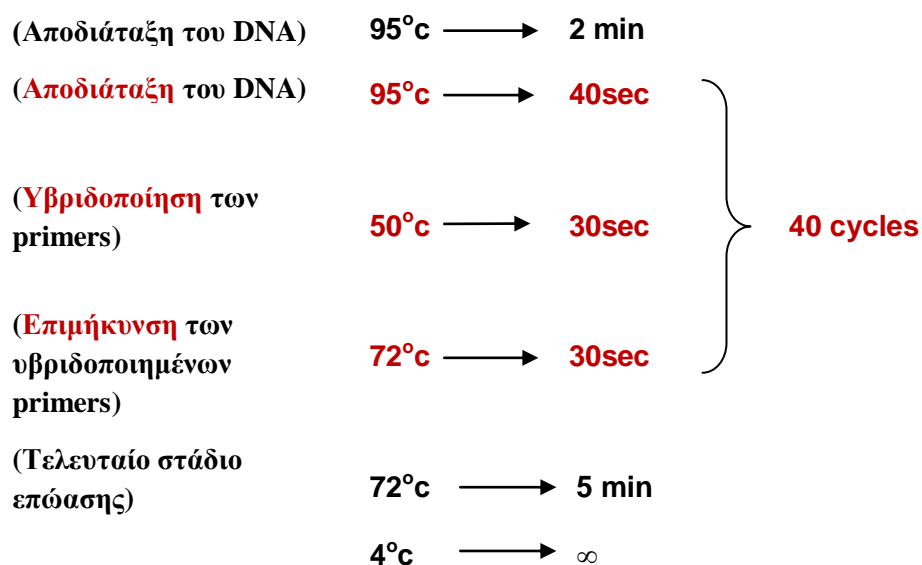


Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την μελέτη των θέσεων ρήξης του γονιδίου E1 του HPV 16 καθώς και οι θέσεις σύνδεσής τους πάνω στο συγκεκριμένο γονίδιο.

2.4 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E1

2.4.1 Απλή PCR

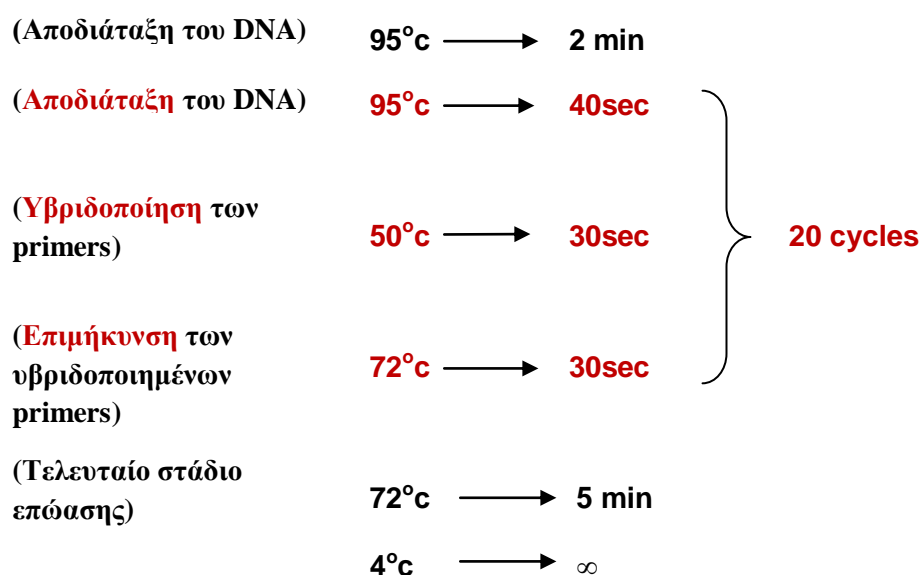
Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων του γονιδίου E1 του ιού, με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε εκχυλισθέν δείγμα, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000TM DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RoboCycler Gradient 96 της εταιρείας Stratagene. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης των εκκινητικών μορίων με τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA στους 50°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Τα στάδια της PCR φαίνονται σχηματικά παρακάτω.



2.4.2 AutoNested PCR

Τα δείγματα, τα οποία δεν μας έδωσαν καθόλου προϊόν ή το προϊόν το οποίο πήραμε ήταν πάρα πολύ ασθενές, υποβλήθηκαν σε μία δεύτερη PCR. Πιο συγκεκριμένα, στην δεύτερη PCR το δείγμα του DNA ήταν το προϊόν της πρώτης PCR και τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ίδια μ' αυτά της πρώτης. Αυτή είναι η λεγόμενη AutoNested PCR και την εφαρμόσαμε προκειμένου να ενισχύσουμε περισσότερο τα προϊόντα της πρώτης PCR.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε προϊόν της πρώτης PCR, 2 μl από κάθε ζεύγος των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν και στην πρώτη PCR σε συγκέντρωση 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της AutoNested PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RoboCycler Gradient 96 της εταιρείας Stratagene. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 20 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης των εκκινητικών μορίων με τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA στους 50°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 30sec. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Τα στάδια της AutoNested PCR φαίνονται σχηματικά παρακάτω.



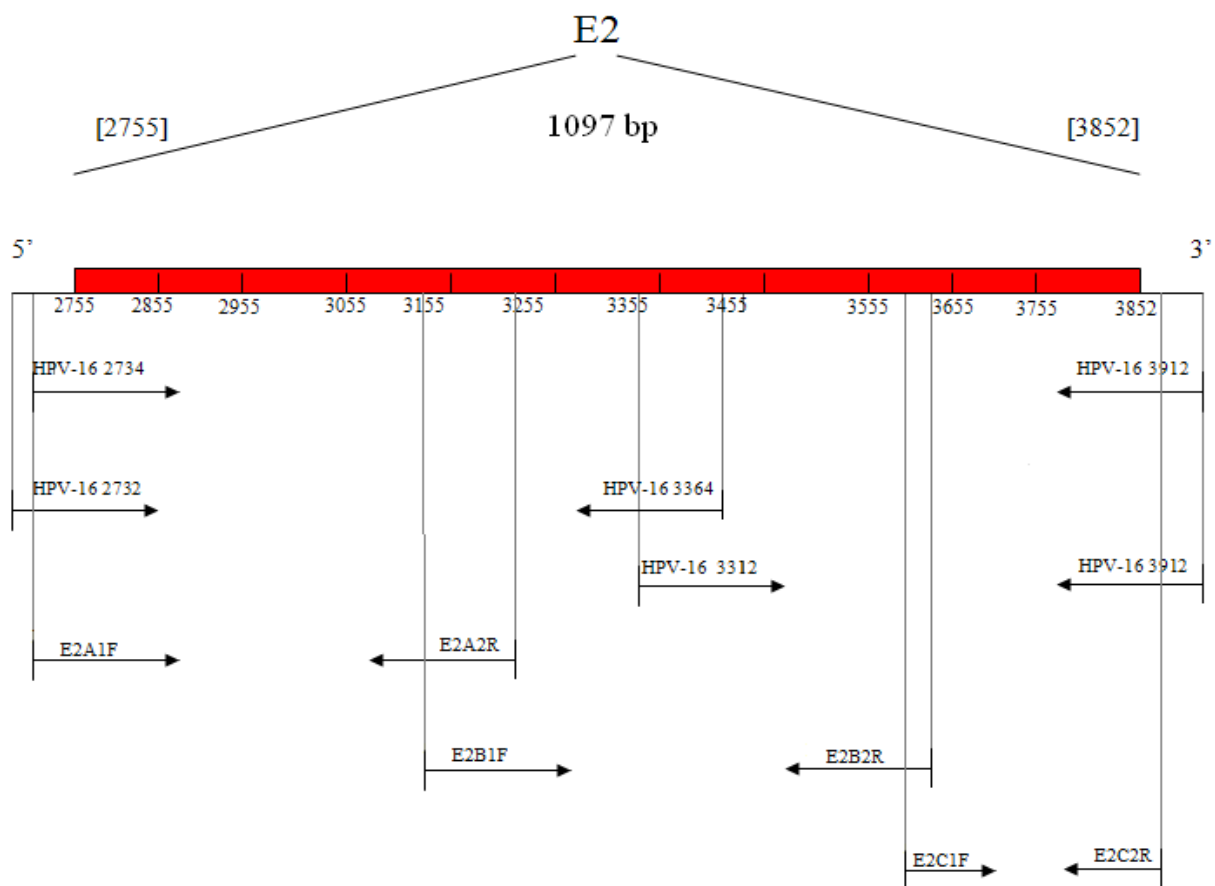
2.5 Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου E2 του HPV-16

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε, αρχικά, ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων το οποίο ενισχύει ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2 (E2 ORF) του HPV-16. Για τις περιπτώσεις στις οποίες δεν πήραμε PCR προϊόν, χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικά εκκινητικά μόρια τα οποία ενισχύουν επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου E2 προκειμένου να εξακριβώσουμε την θέση ρήξης του γονιδίου. Από τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, ορισμένα σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο (αυτά με τον αστερίσκο στον πίνακα 5.4) με την βοήθεια του προγράμματος Primer3 Output, Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>) και με βάση την κατατεθειμένη αλληλουχία στο GenBank του πρότυπου ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) τύπου -16 (κωδικός αριθμός πρόσβασης αλληλουχίας: NC001526). Τα υπόλοιπα εκκινητικά μόρια προέρχονται από την δημοσίευση των Wei Li et al., 2008. Όλα τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του γονιδίου E2 παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (2.4). Στην εικόνα 2.2 φαίνεται σχηματικά η θέση πρόσδεσης όλων των εκκινητών πάνω στο γονίδιο E2.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR
HPV-16 2734*	2734	Sense	GACGAGGACAAGGAAAACGA	1176 bp
HPV-16 3912*	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
HPV-16 2732*	2732	Sense	GAGGACGAGGACAAGKAAAA	632 bp
HPV-16 3364*	3364	Antisense	CGTTGCTGCTAAACACAGATG	
HPV-16 3312*	3312	Sense	ATGCGGGTGGTCAGGTAAT	598 bp
HPV-16 3912*	3912	Antisense	GCACACAAAGCAAAGCAAAA	
E2A1F	2743	Sense	AGGACGAGGACAAGGAAAA	475 bp
E2A2R	3210	Antisense	ACTTGACCCTCTACCACAGTTACT	
E2B1F	3172	Sense	TTGTGAAGAAGCATCAGTAACT	477 bp
E2B2R	3649	Antisense	TAAAGTATTAGCATCACCTT	
E2C1F	3597	Sense	GTAATAGTAACACTACACCCATA	276 bp
E2C2R	3873	Antisense	GGATGCAGTATCAAGATTGT	

Πίνακας 2.4: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την μελέτη του γονιδίου E2 του HPV-16 καθώς και η θέση σύνδεσής τους πάνω σ' αυτό, η αλληλουχία τους, η πολικότητά τους και το μέγεθος του προϊόντος της PCR. Το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV-16 2734 / HPV-16 3912 ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο E2, ενώ τα υπόλοιπα ζεύγη ενισχύουν επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματά του.

*Οι primers αυτοί σχεδιάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Primer3 στο εργαστήριό μας έτσι, ώστε να πιάνουν εξωτερικά του γονιδίου E2. Μ' αυτόν τον τρόπο αυξήσαμε την πιθανότητα να ενισχύσουμε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου. Τα υπόλοιπα τρία ζεύγη εκκινητικών μορίων είναι από την δημοσίευση των Wei Li et al., 2008.



Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την μελέτη των θέσεων ρήξης του γονιδίου E2 του HPV 16 καθώς και οι θέσεις σύνδεσής τους πάνω στο συγκεκριμένο γονίδιο.

2.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E2

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του E2 γονιδίου του ιού, ολόκληρου ή τμημάτων του, με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε εκχυλισθέν δείγμα, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RoboCycler Gradient 96 της εταιρείας Stratagene. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι της PCR. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 min. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Οι συνθήκες των PCR με τα αντίστοιχα εκκινητικά μόρια φαίνονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
2734-3912 2732-3364 3312-3912	<p>Αποδιάταξη: 2min</p> <p>Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec</p> <p>Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 56°C για 30sec</p> <p>Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40sec</p> <p>Στάδιο επώασης: 5min</p> <p>40 cycles</p>

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
E2A1F-E2A2R E2C1F-E2C2R	Αποδιάταξη: 2min Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης : 72°C για 30sec Στάδιο επώασης: 5min <div style="position: relative; left: 700px; top: 200px;"> } 40 cycles </div>

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
E2B1F-E2B2R	Αποδιάταξη: 2min Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης : 72°C για 30sec Στάδιο επώασης: 5min <div style="position: relative; left: 700px; top: 550px;"> } 40 cycles </div>

Τα δείγματα, τα οποία δεν μας έδωσαν καθόλου προϊόν ή το προϊόν το οποίο πήραμε ήταν πάρα πολύ ασθενές, υποβλήθηκαν σε AutoNested PCR με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για το γονίδιο E1 στην ενότητα 2.4.2.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό συνίστατο από: 3 μl DNA από κάθε προϊόν της πρώτης PCR, 2 μl από κάθε ζεύγος των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν και στην πρώτη PCR σε

συγκέντρωση 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 μονάδες (U) Paq DNA πολυμεράση (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της AutoNested PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RoboCycler Gradient 96 της εταιρείας Stratagene. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 25 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης των εκκινητικών μορίων με τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA στους 50°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 30sec. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases

2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 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 κάθε προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 135V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E1 του HPV-16

Αρχικά τα δείγματα, ενισχύθηκαν με τα ομαδοποιημένα ζεύγη εκκινητικών μορίων του πίνακα 2.3 (ενότητα 2.3) τα οποία αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου E1. Στις περιπτώσεις όπου δεν είχαμε αποτέλεσμα, τα αντίστοιχα τμήματα ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια της δημοσίευσης των Arias-Pulido et al., 2006 (πίνακας 2.2, ενότητα 2.3) τα οποία αντιστοιχούν σε μικρότερα εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του γονιδίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Δείγματα	E ₁ F ₁ - E ₁ R ₃ (645 bp)	E ₁ F ₄ - E ₁ R ₅ (488 bp)	E ₁ F ₆ - E ₁ R ₇ (533 bp)	E ₁ F ₈ - E ₁ R ₉ (405 bp)	Κλινική Εικόνα
ΠΝΛ 2	+	+	+	+	Δυσπλασία τραχήλου
ΠΝΛ 4	+	+	+	+	CIN III
ΠΝΛ 5	+	+	+	+	CIN III
ΠΝΛ 6	+	+	+	+	CIN II - III
ΠΝΛ 7	+	+	+	+	Ca in situ
ΠΝΛ 8	+	+	+	+	CIN II, HSIL
ΠΝΛ 10	+	+	+	+	CIN III
ΠΝΛ 11	+	+	+	+	CIN III
ΠΝΛ 15	+	+	+	+	Test PAP: CIN I, Βιοψία: CIN III
ΠΝΛ 16	+	+	+	+	Ca τραχήλου διηθητικό
2121	+	+	+	+	CIN 0
2127	+	+	+	+	CIN 0
2148	+	+	+	+	CIN 0
2216	+	+	+	+	CIN 0
2279	+	+	+	+	CIN 0
2290	+	+	+	+	CIN 0
Δ13	+	+	+	+	HG (CIN III)
Δ14	+	+	+	+	HG (CIN III)
Δ30	+	+	+	+	LG (CIN I-CINII)
Δ34	+	+	+	+	LSIL
Δ42	+	+	+	+	LG (CIN I)
A17	+	+	+	+	LG (CIN I)
A24	+	+	+	+	LG (CIN I)
A38	+	+	+	+	LG (CIN I)
793	+	+	+	+	LG (CIN I)
796	+	+	+	+	LG (CIN I)
858	+	+	+	+	LG (CIN I)
868	+	+	+	+	LG (CIN I)

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα των PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E1 με τα ομαδοποιημένα ζεύγη εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης των Arias-Pulido et al., 2006.

Δείγματα	E1F1 - E1R1 (241 bp)	E1F2 - E1R2 (265 bp)	E1F3 - E1R3 (232 bp)	E1F4 - E1R4 (282 bp)	E1F5 - E1R5 (316 bp)	E1F6 - E1R6 (235 bp)	E1F7 - E1R7 (301 bp)	E1F8 - E1R8 (187 bp)	E1F9 - E1R9 (212 bp)	Κλινική Εικόνα
2186	+	-	+	+	-	+	+			CIN 0
2209	+	+	+	+	+	+	-	+	+	CIN 0
Δ2	+	+	+							HG (CIN III)
Δ3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	HG (CIN III)
Δ4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	HG (CIN III)
Δ7	+	+	+							LG (CIN I-CINII)
Δ15	+	+	+							HG(CIN III)
Δ16	+	+	+							HG(CIN III)
ΠΝΛ 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CIN I – II

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα των PCR με τα επιμέρους εσωτερικά ζεύγη εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης των Arias-Pulido et al., 2006 για την ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου E1 που δεν ενισχύθηκαν με τα ομαδοποιημένα ζεύγη του πίνακα 5.5. Τα γαλάζια κουτάκια υποδηλώνουν ότι στις περιοχές αυτές δεν πραγματοποιήθηκε PCR γιατί τις ενισχύσαμε με τα ομαδοποιημένα εκκινητικά μόρια.

3.2 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου E2 του HPV-16

Αρχικά, στα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR με το εξωτερικό ζεύγος εκκινητικών μορίων (εικόνα 2.2, πίνακας 2.4) που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο μας και ενισχύει ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2. Στις περιπτώσεις όπου δεν είχαμε αποτέλεσμα, τα δείγματα ενισχύθηκαν με τα επιμέρους εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα εκκινητικά μόρια (εικόνα 2.2, πίνακας 2.4). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Δείγματα (ThinPrep)	2734 - 3912 (1176 bp)	Κλινική Εικόνα
ΠΝΛ 2	+	Δυσπλασία τραχήλου
ΠΝΛ 4	+	CIN III
ΠΝΛ 5	+	CIN III
ΠΝΛ 6	+	CIN II – III
ΠΝΛ 7	+	Ca in situ
ΠΝΛ 8	+	CIN II, HSIL
ΠΝΛ 9	+	CIN I – II
ΠΝΛ 10	+	CIN III
ΠΝΛ 11	+	CIN III
ΠΝΛ 15	+	Test PAP: CIN I, Βιοψία: CIN III
ΠΝΛ 16	+	Ca τραχήλου διηθητικό
2121	+	CIN 0
2127	+	CIN 0
2148	+	CIN 0
2186	+	CIN 0
2209	+	CIN 0
2216	+	CIN 0
2279	+	CIN 0
2290	+	CIN 0
793	+	LG (CIN I)
796	+	LG (CIN I)
858	+	LG (CIN I)
868	+	LG (CIN I)

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα PCR των δειγμάτων σε ThinPrep με το εξωτερικό ζεύγος εκκινητικών μορίων το οποίο σχεδιάστηκε στο εργαστήριο μας και ενισχύει ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2.

Δείγματα (επίχρισμα για Pap test)	2734 - 3912 (1176 bp)	Κλινική Εικόνα
A17	+	LG (CINI)
A24	+	LG (CINI)
A38	+	HG

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα PCR των δειγμάτων από επίχρισμα κυττάρων σε καλυπτρίδα για εξέταση Pap test με το εξωτερικό ζεύγος εκκινητικών μορίων το οποίο σχεδιάστηκε στο εργαστήριο μας και ενισχύει ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2.

Δείγματα (επίχρισμα για Pap test)	2732-3364 (632 bp)	3312-3912 (598)	Κλινική Εικόνα
A3	+	+	CIN III
A4	+	+	CIN III
A6	+	+	CIN III
A13	+	+	CIN III
A15	+	+	CIN III
A31	+	+	CIN III

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα PCR των δειγμάτων από επίχρισμα κυττάρων σε καλυπτρίδα για εξέταση Pap test με τα δύο εσωτερικά ζεύγη εκκινητικών μορίων τα οποία σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο μας και ενισχύουν το γονίδιο E2 σε δύο επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές.

Δείγματα (ιστός σε παραφίνη)	E2A1F - E2A2R (475 bp)	E2B1F - E2B2R (477 bp)	E2C1F - E2C2R (276 bp)	Κλινική Εικόνα
Δ2	+	-	+	HG (CIN III)
Δ3	+	+	-	HG (CIN III)
Δ4	-	-	+	HG (CIN III)
Δ13	+	-	-	HG (CIN III)
Δ14	+	-	-	HG (CIN III)
Δ15	+	+	-	HG (CIN III)
Δ16	+	+	+	HG (CIN III)
Δ30	+	+	+	LG (CIN I-CINII)
Δ7	+	+	+	LG (CIN I-CINII)
Δ34	+	+	+	LG (CIN I-CINII)
Δ42	+	+	+	LG (CIN I-CINII)

Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα PCR των δειγμάτων από τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου με παραφίνη με τα τρία εσωτερικά ζεύγη εκκινητικών μορίων της δημοσίευσης των Wei Li et al., 2008 και ενισχύουν το γονίδιο E2 σε τρεις επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα, αναμφίβολα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συνδέεται άμεσα με την μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) του τραχήλου, μιας και το 99% των περιπτώσεων αυτού του καρκίνου είναι θετικό σε HPV μόλυνση. 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 (high-risk HPV). Η ογκογόνος δράση αυτών των ιών οφείλεται στις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7, των οποίων η ρύθμιση της μεταγραφής εξαρτάται από την πρωτεΐνη E2, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Το γονιδίωμα του HPV-16 μπορεί να βρίσκεται σε δυο μορφές μέσα στα κύτταρα-ξενιστές, είτε επισωμικό, είτε γραμμικό ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Επίσης, σε ένα μεγάλο ποσοστό μπορεί να συνυπάρχουν και οι δυο μορφές του ιικού γονιδιώματος μέσα στα κύτταρα. Η ενσωμάτωση γίνεται τις περισσότερες φορές μετά από θραύση στην περιοχή του γονιδίου E2 και σε ένα μικρότερο ποσοστό μετά από θραύση στην περιοχή του γονιδίου E1.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την χαρτογράφηση των θέσεων ρήξης των γονιδίων E1 και E2 του HPV-16 σε χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες σε 43 δείγματα. Απ' αυτά, τα 23 ήταν δείγματα σε ThinPrep, τα 9 ήταν επιχρίσματα κυττάρων σε καλυπτρίδα για εξέταση Pap test και τα 11 ήταν τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου με παραφίνη. Αρχικά, όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως HPV-16 με Nested-Multiplex PCR χρησιμοποιώντας τυποειδικά εκκινητικά μόρια. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν PCR για την ενίσχυση των δυο γονιδίων (E1 και E2) χρησιμοποιώντας ειδικά για κάθε γονίδιο εκκινητικά μόρια, τα οποία ενισχύουν είτε ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης των δυο γονιδίων, είτε επιμέρους αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα τους. Πιο συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις όπου δεν είχαμε σήμα ενίσχυσης σε κάποια PCR, ενισχύσαμε αυτά τα δείγματα με τα εσωτερικά εκκινητικά μόρια τα οποία ενισχύουν τα γονίδια E1 και E2 σε μικρότερα αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα, με σκοπό να προσδιορίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια την θέση ρήξης στην περιοχή αυτών των δύο γονιδίων.

Όσον αφορά το γονίδιο E1, από τα PCR αποτελέσματα παρατηρήσαμε ότι εκτός από τέσσερα δείγματα (2186, 2209, Δ3 και Δ4) στα οποία είχαμε ρήξη του

γονιδίου, σε όλα τα υπόλοιπα ενισχύσαμε όλες τις περιοχές του. Αυτό αποδεικνύει το χαμηλό ποσοστό ρήξης που παρατηρείται γενικά στο συγκεκριμένο γονίδιο. Στα δείγματα Δ3 (CIN III) και Δ4 (CIN III) η ρήξη ήταν στον μέσον του γονιδίου, στο δείγμα 2186 (CIN 0) η ρήξη είναι προς το 5' άκρο του και στο δείγμα 2209 (CIN 0) ήταν προς το 3' άκρο του E1. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η ρήξη του γονιδίου E1 δεν συμβαδίζει με τον βαθμό δυσπλασίας, καθώς επίσης ότι ανιχνεύεται ολόκληρο το γονίδιο και σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες.

Στην περίπτωση του γονιδίου E2, από τα αποτελέσματα των PCR που πραγματοποιήσαμε παρατηρήσαμε ότι σε όλα τα δείγματα ThinPrep και σε τρία από τα επιχρίσματα για Pap test (A17, A24 και A38) ενισχύσαμε ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2 με τα εξωτερικά εκκινητικά μόρια (2734-3912) που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριό μας ανεξάρτητα από τον βαθμό δυσπλασίας του κάθε δείγματος. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία θα περιμέναμε τουλάχιστον στα δείγματα με υψηλού βαθμού δυσπλασία (CIN II-invasive Cancer) να έχουμε ρήξη του γονιδίου E2. Ο λόγος που πιθανόν συμβαίνει αυτό θα εξηγηθεί λίγο παρακάτω.

Επίσης, έξι δείγματα CIN III από επιχρίσματα για Pap test (A3, A4, A6, A13, A15 και A31) δεν ενισχύθηκε ολόκληρο το γονίδιο E2 από το εξωτερικό ζεύγος εκκινητικών μορίων αλλά ενισχύθηκε από τα δύο επιμέρους εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητικών μορίων (2732-3364 και 3312-3912) τα οποία επίσης σχεδιάστηκαν στο εργαστήριό μας (πίνακας 3.5). Αυτό συμβαίνει γιατί στα δείγματα αυτά, πιθανόν να έχουμε διπλή μόλυνση από διαφορετικές παραλλαγές (variants) του HPV-16 οι οποίες να έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή μετά από ρήξη σε διαφορετικές περιοχές του γονιδίου E2. Γι' αυτό τον λόγο δεν μπορούμε να ενισχύσουμε ολόκληρο το γονίδιο με τα εξωτερικά εκκινητικά μόρια και το ενισχύουμε ολόκληρο μόνο μέσω των περιοχών που δεν έχουν υποστεί ρήξη με τα εσωτερικά εκκινητικά μόρια.

Στα δείγματα που προέρχονται από τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου με παραφίνη και δεν είχαμε ενίσχυση με τα εξωτερικά εκκινητικά μόρια πραγματοποιήσαμε PCR με τα επιμέρους εσωτερικά αλληλεπικαλυπτόμενα εκκινητικά μόρια της δημοσίευσης των Wei Li et al., 2008. Από τα αποτελέσματα που πήραμε παρατηρήθηκε ρήξη του γονιδίου E2 στα έξι (Δ2, Δ3, Δ4, Δ13, Δ14 και Δ15) από τα έντεκα δείγματα (πίνακας 3.6). Αυτά τα έξι δείγματα ήταν υψηλού βαθμού δυσπλασίας (CIN III) ενώ από τα υπόλοιπα πέντε, στα οποία ενισχύσαμε όλες

τις επιμέρους περιοχές του γονιδίου, το ένα (Δ16) ήταν υψηλού (CIN III) και τα τέσσερα ήταν χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (CIN I). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το γεγονός ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός της αλλοίωσης τόσο αυξάνεται και η ρήξη του γονιδίου E2. Στο δείγμα Δ2 η ρήξη ήταν στο μέσον του γονιδίου, στο Δ3 ήταν προς το 3' άκρο του και στα δείγματα Δ4, Δ13, Δ14 και Δ15 προς το 5' άκρο τους.

Ο πιθανός λόγος για τον οποίο σε όλα τα δείγματα ThinPrep πήραμε ολόκληρο το γονίδιο E2 είναι ότι τα κύτταρα σε αυτά τα δείγματα προέρχονται από την εξωτερική στοιβάδα του τραχήλου της μήτρας. Σ' αυτά τα κύτταρα υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα το γονιδίωμα του ιού να βρίσκεται ταυτόχρονα και με τις δύο μορφές του (επισωματική και ενσωματωμένη). Επίσης, υπάρχει το ενδεχόμενο να υπάρχουν σ' αυτά τα δείγματα και ώριμα ιικά σωματίδια τα οποία είχαν απελευθερωθεί και διαθέτουν ακέραιο το γονίδιο E2. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε δεν μπορεί να διαχωρίσει τις δυο μορφές του ιικού γονιδιώματος όταν αυτές συνυπάρχουν στα κύτταρα γιατί η PCR θα ενισχύσει ολόκληρο το γονίδιο E2 που υπάρχει στην επισωματική μορφή. Επομένως οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η καλύτερη πηγή δείγματος είναι οι τομές τραχηλικού ιστού από τις οποίες μπορούμε να απομονώσουμε κύτταρα κατευθείαν πάνω από την αλλοίωση.

Το γεγονός ότι στα δείγματα Δ7, Δ16, Δ30, Δ34 και Δ42 πήραμε ολόκληρο το γονίδιο E2 μέσω των εσωτερικών αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητικών μορίων και όχι με το εξωτερικό ζεύγος μπορεί να οφείλεται σε δυο κυρίως αιτίες: πρώτον, η πιθανότητα να έχουμε πολλαπλή μόλυνση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και δεύτερον το γεγονός ότι τα εξωτερικά εκκινητικά μόρια που σχεδιάσαμε να μην ενίσχυαν το γονίδιο λόγω της ύπαρξης κάποια μετάλλαξης στην θέση σύνδεσής τους.

Πολλά από τα παραπάνω προβλήματα θα μπορούσαν να λυθούν με την αλληλούχηση (sequencing) των δειγμάτων. Επίσης, με την αλληλούχηση θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε την ακριβή θέση ρήξης και των δύο γονιδίων (E1 και E2) σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.

Τέλος, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι HPV και όλοι οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται είναι ένα πάρα πολύ δύσκολο πεδίο έρευνας. Στην δυσκολία αυτή συνεισφέρει και το γεγονός ότι οι HPV δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες γιατί απαιτούν επιθηλιακά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται. Στην δική μας περίπτωση και γενικότερα σε

κάθε μελλοντική έρευνα, καλό θα ήταν για κάθε ασθενή να υπάρχουν δείγματα τόσο από ThinPrep όσο και από τομές τραχηλικού ιστού για σύγκριση των αποτελεσμάτων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Antonsson A, McMillan NA**, 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
2. **Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland**, 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805-809.
3. **Arias-Pulido H., Peyton C. L., Joste N. E., Vargas H. and Wheeler C. M.**, 2006. Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *J. Clin. Micr.* 1755-1762.
4. **Artandi SE, Attardi LD**, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(3):881-90. Review.
5. **Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS**, 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins *Virus Res.* (1-2):208-11.
6. **Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley P. M.**, 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61: 962-971.
7. **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.
8. **Boring, C. C., T. S. Squires, T. Tong, and S. Montgomery**, 1994. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 44:7-26.
9. **Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, de Sanjosé S, Moreno V, Puig-Tintore LM, Smith PG, Muñoz N, zur Hausen H.**, 2001. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* (3):163-75.

10. **Bosch, F.X.**, 1995. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst*; 87:796-802.
11. **Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T**, 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391(6667):597-601.
12. **Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT**, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol*. (2):751-7.
13. **Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M.**, 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53: 25-36
14. **Chakrabarti O, Krishna S**, 2003. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci.* 28(3):337-48.
15. **Charles E. Wood, Zigui Chen, J. Mark Cline, Brigitte E. Miller, and Robert D. Burk**, 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol*. 81(12):6339-45.
16. **Chen, G., and A. Stenlund**, 2000. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol.* 74:1506-1512.
17. **Choo, K. B., Pan, C. C., and S. H.**, 1987. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Viriology*. 161: 259-261.
18. **Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P**, 2001. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*. 84(12):1616-23.
19. **Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG**, 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol*. (5):275-82.
20. **Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid III, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek**, 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-

- dependent enhancer, and by viral E2 *trans*-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745-3753.
21. **Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND,** 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells 1: *J Virol.* (18):8940-50.
 22. **Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akker E,** 1999. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess.* 3(14):i-iv, 1-196. Review. No abstract available.
 23. **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.
 24. **Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J,** 2002. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* (19):9806-18.
 25. **Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT,** 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (39):14252-7.
 26. **de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hausen H.,** 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27.
 27. **Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F.** Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9343-9
 28. **Demeret C, M Le Moal, M Yaniv, and F Thierry,** 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.*:4777-84.
 29. **Doorbar J.,** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541)
 30. **Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv,** 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 5:1657-1671.

31. **Durst M, Croce C, Gissmann L.** Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84.
32. **Durst, M., Kleinheinz. A., Hotz. M., and Gissman L.,** 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.*, 66: 1515-1522.
33. **Dyson N,** 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12(15):2245-62. Review.
34. **Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E,** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243(4893):934-7.
35. **Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK,** 2006. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology.* (2):271-9.
36. **Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins,** 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* **77**:2819-2831.
37. **Flores, E., B. L. Allen-Hoffman, D. Lee, and P. F. Lambert,** 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622-6631.
38. **Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M,** 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* (19):10009-14.
39. **Fraiser, L. D. et al,** 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360.
40. **Fukushima M., Yamakawa Y., Shimano S., Hashimoto M., Sawada Y. and Fujinaga K.,** 1990. The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer (Philla.)*, 66: 2155-2161.
41. **Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA,** 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(16):2090-100

- 42. Garcea R.L. and DiMaio D.** (2007) The Papillomaviruses. Copyright: Springer
- 43. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M,** 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol.* 44(6):2025-31
- 44. Gillison ML, Shah KV.** Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 2001 May;13(3):183-8. Review.
- 45. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T,** 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49.
- 46. Haris S. F., and M. R. Botchan,** 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284:1673-1677.
- 47. Harley CB, Futcher AB, Greider CW,** 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345(6274):458-60.
- 48. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler,** 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505-512.
- 49. Heise A.,** 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19.
- 50. Herrick J, Conti C, Teissier S.** Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65.
- 51. Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K,** 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* (9):4431-9.
- 52. Holt SE, Wilson VG,** 1995. Mutational analysis of the 18-base-pair inverted repeat element at the bovine papillomavirus origin of replication:

- identification of critical sequences for E1 binding and in vivo replication. *J. Virol.* (10):6525-32.
- 53. Howley P.M., 1996. *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.**
 - 54. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT, 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 66(10):6237-41.**
 - 55. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar;92(3):873-80.**
 - 56. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* (2):775-84.**
 - 57. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, 1993. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol.* (8):4918-27.**
 - 58. Hummel, N., J. B. Hudson, and L. A. Laimins, 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070-6080.**
 - 59. Jeon, S., and Lampert, P. F., 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92: 1654-1658,**
 - 60. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L. and Shay J. W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266:2011-2015.**
 - 61. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.**
 - 62. Klaes R., Woerner S. M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., Lotz B., Melsheimer P. and Magnus von Knebel Doeberitz,**

1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Research*. 59:6132-6136.
- 63. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK**, 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 380(6569):79-82.
- 64. Klumpp DJ, Laimins LA**, 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*. 257(1):239-46.
- 65. Ko LJ, Prives C**, 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 10(9):1054-72. Review. No abstract available.
- 66. Kremsdorf D, S Jablonska, M Favre, and G Orth**, 1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. 48(2): 340–351.
- 67. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB**, 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(16):7491-5.
- 68. Laimins, L. A.**, 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201-223. *In* D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 69. Lechner MS, Laimins LA**, 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 68(7):4262-73.
- 70. Lehn, H., Villa, L. L., Marziona, F., Hilgarth, M., Hillemans, H. G., and Sauer, G.** Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J. Gen. Virol.*, 69:187-196, 1988.
- 71. 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.
- 72. Liu J.S, Kuo SR, Broker TR, Chow LT** 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem*. (45):27283-91.

73. **Liu, J. P.**, 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
74. **Luxton J, Shepherd P**, 2001. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition. *Curr Opin Infect Dis.* (2):139-43. Review.
75. **Mahdavi A, Monk BJ**, 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
76. **Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA**, 2001. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol.* 13(6):477-83. Review
77. **Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA** 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* 72(9):7407-19.
78. **Monica Crica, Simona Ventruroli, Elisa Leo, Silvano Costa, Monica Musiani, Marialuisa Zerbini.** Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods* 158 (2009) 180-183.
79. **Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM**, 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8(13):4099-105.
80. **Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D.**, 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer *N Engl J Med.* 348(6):518-27.
81. **Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. Griep, and P. F. Lambert**, 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol.* 77:6957-6964.
82. **Ozbun MA, Meyers C**, 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology.* 248(2):218-30.
83. **Ozbun MA, Meyers C**, 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol.* 72(4):2715-22.
84. **Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani**, 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan. *Int. J. Cancer* 94:153-156.

- 85. Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault , Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault**, 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 29, 26765-26772.
- 86. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N**, 2006. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response *Proc Natl Acad Sci U S A.* (10):3822-7.
- 87. Pfister, H.**, 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 52–56.
- 88. Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM.** The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* 1988 May 20;53(4):539-47.
- 89. Pisani, P., F. Bra, and D. M. Parkin**, 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* 97:72-81.
- 90. 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. *Rev Med Virol.* 2009 Mar;19(2):97-113. Review.
- 91. Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM**, 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 63(16):4862-71.
- 92. Robert L. Garcea and Daniel DiMaio**, 2007. *The Papillomavirus*. Springer.
- 93. 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.
- 94. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM**, 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75(3):495-505.

95. Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Bratti C. Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer. *JAMA*. 2000 May 17;283(19):2525-6.
96. Schwartz, F., Freese, U. K., Gissiman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H., 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell lines. *Nature (Lond.)* 314: 111-114.
97. Sedman J, Stenlund A., 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* (8):6893-7.
98. Shafiti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R, 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 77(24):13125-35.
99. Shih-Yen Chan, H Delius, A L Halpern, and H U Bernard, 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 69(5):3074-83.
100. Singer, A., L. Ho, G. Terry, and T. S. Kwie, 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, p. 105-129. *In* A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection*. Edward Arnold, London, United Kingdom.
101. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B, 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42(7):3176-84.
102. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B, 2004. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 74(1):107-16.
103. Steger, G., and S. Corbach, 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 71:50-58.
104. Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance, 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67:4521-4532.

105. **Stubenrauch, F., H. B. Lim, and L. A. Laimins**, 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of the oncogenic human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 72:1071-1077.
106. **Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU** 2002. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology.* 305(2):486-501.
107. **Thomas M, Pim D, Banks L.** 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7690-700. Review.
108. **Thorner LK, Lim DA, Botchan MR.** 1993. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J. Virol.* (10):6000-14.
109. **Titolo S., E. Welchner, P. W. White, and J. Archambault**, 2003. Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy. *J. Virol.* (9): 5512–5518.
110. **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.
111. **Vogelstein B.,** 1990. Cancer. A deadly inheritance; *Nature (London)* 348:681-682.
112. **Von Knebel Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsch, D., and zur Hausen, H.,** 1991. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1411-1415.
113. **Von Knebel Doeberitz, M., Rittmuler, C., Aengeneyndt, F., Jansen-Durr, P., and Spitkovsky, D.,** 1994. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRb interactions. *J. Virol.*, 68: 2811-2821.
114. **Wei Li, Wei Wang, Mani Si, Linfei Han, Qinglei Gao, Aiyue Luo, Yan Li, Yunping Lu, Shixuan Wang, Ding Ma,** 2008. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1355-2361.
115. **Weimin Qu, Gang Jiang, Yvette Cruz, Chee Jen Chang, Gloria Y. F. Ho, Roberts S. Klein, and Robert D. Burk.** 1997. PCR Detection of

- Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems. *J Clin Microbiol.* Jun;35(6):1304-10.
- 116. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M.** Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64.
- 117. Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.
- 118. Wilson R, Fehrman F, Laimins LA,** 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* (11):6732-40.
- 119. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D.** Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* 2002 Jun;24(3):275-90. Review.
- 120. Yang, Francisco Martinez Murillo, Hengmi Cui, Richard Blosser, Satoshi Uematsu, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Raphael P. Viscidi, and Richard B. S. Roden,** 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.* Oct;78(20):11152-60.
- 121. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW,** 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):668-73.
- 122. Yugawa T, Kiyono T.** Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins.
- 123. Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker,** 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
- 124. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ,** 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* 73(8):6209-19.
- 125. Zur Hausen H,** 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.

- 126. Zur Hausen H.**, 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*.1288(2):F55-78.
- 127. zur Hausen H.**, 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92(9):690-8. Review.