

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

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

ΖΑΡΚΑΔΟΥΛΑ ΙΩΑΝΝΑ

**Ανάπτυξη μιας Real-time PCR για τον ποσοτικό
προσδιορισμό των γονιδίων E2, E6 και E7 του HPV 16**



Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

2012

**Ανάπτυξη μιας Real-time PCR για τον ποσοτικό
προσδιορισμό των γονιδίων E2 , E6 και E7 του HPV -
16.**

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

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

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Σ.Πουρνάρας: Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής.

Δ.Μόσιαλος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ [7]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ [8]

1. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ HUMAN PAPILOMA VIRUS (HPV) [10]

- 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά [10]
- 1.2 Ταξινόμηση των Papillomaviruses [11]
 - 1.2.1 Alpha – papillomavirus [13]
 - 1.2.2 Beta -papillomavirus [13]
 - 1.2.3 Gamma , Nu , Mu papillomavirus [14]

2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ HUMAN PAPILOMA VIRUS (HPV) [15]

- 2.1 Δομή καψιδίου [15]
- 2.2 Οργάνωση γενώματος [16]
 - 2.2.1 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1 [18]
 - 2.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2 [18]
 - 2.2.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4 [20]
 - 2.2.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5 [20]
 - 2.2.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6 [21]
 - 2.2.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7 [22]
- 2.3 Μορφή γενώματος [24]

3. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HPV [27]

- 3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο [27]
- 3.2 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος [27]
- 3.3 Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος [28]
- 3.4 Σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού [29]
- 3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις [30]

4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ [32]

- 4.1 Ιστολογικές αλλοιώσεις [32]
- 4.2 Τρόποι μετάδοσης [33]
- 4.3 Παράγοντες κινδύνου [34]
- 4.4 Κλινική εικόνα [34]
- 4.5 Διάγνωση των HPV λοιμώξεων [35]
- 4.6 Κλινική και κολποσκοπική εξέταση [35]
- 4.7 Μικροσκοπική Εξέταση κυτταρολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων (PAP- TEST) [36]

4.8 Μοριακή διάγνωση της HPV λοίμωξης [36]

4.9 Μέτρηση του ιϊκού φορτίου και ενσωμάτωση του HPV – 16 στο γονιδίωμα του ξενιστή [37]

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ [39]

5.1 Δείγματα [39]

ΜΕΘΟΔΟΙ [40]

5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA [40]

5.3 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GAPDH (glyceraldehyde – 3- phosphate dehydrogenase) [41]

5.4 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε2 ΓΟΝΙΔΙΟΥ [42]

5.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε6 ΓΟΝΙΔΙΟΥ [42]

5.6 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε7 ΓΟΝΙΔΙΟΥ [43]

5.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR [44]

5.8 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΘΗΚΑΝ [44]

5.8.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ AUTONESTED GO TAQ PCR ΑΠΟ ΤΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ [46]

5.8.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ [46]

5.8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ [47]

5.8.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ [47]

5.8.5 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ [48]

5.8.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ [48]

5.8.7 ΠΕΨΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ [49]

5.9 ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ REAL-TIME PCR [50]

5. 10 REAL- TIME PCR για Ε2, Ε6 και Ε7 ΓΟΝΙΔΙΑ [52]

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ [54]

6.1 Αποτελέσματα PCR για το γονίδιο GAPDH [54]

6.2 PCR ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ Ε2 , Ε6 ΚΑΙ Ε7 [55]

6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GAPDH [56]

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ Ε2, Ε6,Ε7 [59]

6.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ $E2/E6$ ΚΑΙ $E2/E7$ [60]

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ [63]

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ [66]

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση και την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας με θέμα : “Ανάπτυξη μιας Real – time για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων E2 , E6 και E7 του HPV -16 ”. Μου έδωσε τη δυνατότητα να προχωρήσω στην εφαρμογή των γνώσεων της θεωρίας του μεταπτυχιακού σε πειραματικό επίπεδο.

Μέσα στον κόσμο των πειραμάτων και του εργαστηρίου γνώρισα πολύ αξιόλογους επιστήμονες που με βοήθησαν εμπράκτως στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας . Θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου που ανήκει στο μόνιμο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου και την κ. Ειρήνη Ρούτερ για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν αλλά και για την υπομονή που έδειξαν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον κ. Δημήτρη Τσακογιάννη , υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος , γιατί χωρίς τη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή του δεν θα είχα φέρει σε πέρας την παρούσα εργασία.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε όλο το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος , ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και κυρίως στο σύζυγό μου Δημήτρη και το γιο μου Αντώνη για τη στήριξη και την υπομονή που έκαναν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) είναι μια ομάδα επιθηλιοτροπικών DNA ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα που προκαλούν αλλοιώσεις στο επιθήλιο του δέρματος (θηλώματα) και στο επιθήλιο του βλεννογόνου (κονδυλώματα). Μολύνουν μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα πτηνά μέχρι τα θαλάσσια θηλαστικά. Ο ιός των θηλωμάτων απέκτησε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον όταν διαπιστώθηκε ότι προκαλεί μια σειρά δερματικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο. Η συσχέτισή τους τα τελευταία χρόνια με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τους κατέστησε ακόμα πιο ελκυστικούς στην επιστημονική κοινότητα. Κυρίως μας ενδιαφέρουν οι τύποι που χαρακτηρίζονται υψηλής επικινδυνότητας όπως είναι ο HPV -16.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των γονιδίων E2, E6 και E7 του HPV-16. Χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της απλής PCR για την ενίσχυση των παραπάνω γονιδίων και στη συνέχεια προχωρήσαμε στην κλωνοποίησή τους. Τέλος, μετρήσαμε ποσοτικά τα γονίδια αυτά και κατ' επέκταση και το φορτίο του ιού με Real-time PCR. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε κλινικά δείγματα με ποικίλες ιστολογικές αλλοιώσεις που ήταν όμως θετικά στην ανίχνευση του HPV-16. Για να προβλέψουμε τον κίνδυνο σε μία γυναίκα να αναπτύξει καρκίνο του τραχήλου της μήτρας θα πρέπει να γνωρίζουμε τη φυσική κατάσταση του ιού, το φορτίο του και φυσικά τον τύπο του. Με τον όρο φυσική κατάσταση του ιού εννοούμε αν ο ιός βρίσκεται στα κύτταρα σε επισωματική, σε ενσωματωμένη ή και στις δύο μορφές. Ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή σε χαμηλού βαθμού δυσπλασίες στις οποίες μία γυναίκα δεν κινδυνεύει να αναπτύξει σοβαρού βαθμού δυσπλασία γιατί ο ιός πιθανότατα θα αποβληθεί αυτόματα από τον οργανισμό με τη βοήθεια και των ανοσοποιητικών μηχανισμών του ξενιστή. Όταν ο ιός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή τότε αυτός έχει υποστεί ρήξη συνήθως εντός του E2 γονιδίου του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της E2 πρωτεΐνης που δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας των ογκογονιδίων E6 και E7. Η ογκογόνος έκφραση του ιού στα αρχικά στάδια της δυσπλασίας προκαλεί γενωμική αστάθεια η οποία υποβοηθά την περαιτέρω ενσωμάτωση του ιού. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η ενσωμάτωση συμβαίνει νωρίς στην ανάπτυξη της δυσπλασίας και του καρκίνου. Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων θα υπολογίσουμε τους λόγους E2/E6 και E2/E7. Οι λόγοι αυτοί

αποτελούνται από ένα γονίδιο σταθερό και ένα μεταβλητό. Το μεταβλητό είναι το E2 που μπορεί να υποστεί ρήξη κατά την ενσωμάτωση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή. Επίσης, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το ιϊκό φορτίο έχει σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαβαθμίσεων που υπάρχουν στις τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Όσο η αλλοίωση εξελίσσεται από χαμηλού σε υψηλού βαθμού τόσο και το φορτίο του ιού αυξάνεται. Τέλος, στο διηθητικό καρκίνο το φορτίο του ιού αρχίζει να μειώνεται.

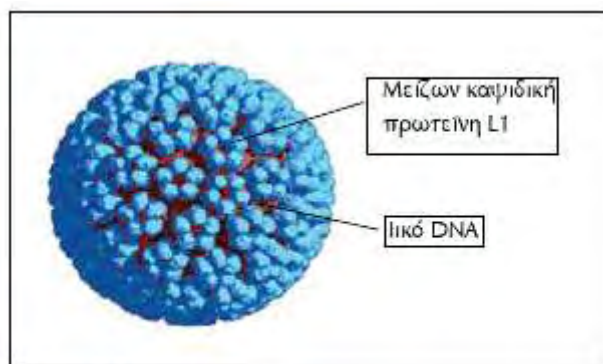
Συμπερασματικά, η κατάσταση ενσωμάτωσης είναι πολύ σημαντική για την πρόγνωση της νόσου. Η ενσωμάτωση ορίζεται με την έλλειψη ενίσχυσης του E2 γονιδίου με τη Real-time PCR. Έτσι, οι παραπάνω λόγοι ελαττώνονται μέχρι και στο μηδέν με την πρόοδο της νόσου.

Άρα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα δείκτη για την αξιολόγηση της προόδου της νόσου εκτός της τυποποίησης και της ποσοτικοποίησης (ιϊκού φορτίου) του ιού.

1. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV)

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από τη λατινική λέξη papilla : θηλή και την ελληνική κατάληξη oma : όγκος) ανήκουν στο γένος των Papillomavirus . Είναι κυκλικοί, δίκλωνοι DNA ιοί μικρού μεγέθους ,7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Αν και σχετίζονται με τα κοινά κονδυλώματα, μερικοί τύποι του



Εικόνα 1.1 Δομή ιού HPV

ιού έχουν ισχυρή συσχέτιση με τη δημιουργία καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 τύποι του ιού. Διαφορετικοί τύποι HPV εκδηλώνουν τροπισμό σε διαφορετικούς ιστούς. Αυτό βασίζεται στον τύπο του επιθηλιακού κυττάρου που ο ιός προτιμά να μολύνει π.χ. δέρμα ή βλεννογόνο.

Ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχτηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων με τη βοήθεια ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό , συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι 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 πρόκληση καρκίνου. Από τότε διάφοροι τύποι αυτής της ομάδας των ιών εντοπίστηκαν και συνδέθηκαν με τη δημιουργία όγκων σε πολλά είδη μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 όταν ο Harald zur Hausen (1983)απομόνωσε τον πρώτο HPV -16 σε γυναίκα που έπασχε από καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα ανακαλύφθηκαν και άλλα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων που συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Όπως αναφέραμε, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV , ενώ περισσότεροι από 120

θεωρητικά καινούριοι τύποι έχουν εν μέρει χαρακτηριστεί (Zur Hausen 2000). Πάνω από 30 τύποι του ιού μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή και αναφέρονται και ως γενετικοί τύποι (Gillison 2001). Οι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι τύποι HPV κατηγοριοποιούνται σε τρεις επιμέρους ομάδες. Στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (high risk), τα μέλη της οποίας συνδέονται με την πρόκληση διηθητικού καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος. Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (intermediate risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (low risk) τα μέλη της οποίας σπάνια εντοπίζονται σε καρκινικές βλάβες, σχετίζονται όμως συχνά με τη δημιουργία κονδυλωμάτων (Munoz N. et al. 2003, πίνακας 1). Ο HPV-16 ανήκει στην ομάδα των ιών υψηλής επικινδυνότητας και πιο συγκεκριμένα η ενσωμάτωσή του στο DNA του ξενιστή αποτελεί δείκτη πιθανής τραχηλικής νεοπλασίας (Hugo Arias –Pulido et al. 2006). Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι οι ιοί HPV δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες. Η ανίχνευσή τους, λοιπόν, στηρίζεται στο συνδυασμό εξέτασης κυτταρολογικών επιχρισμάτων και μοριακών τεχνικών.

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)	
Χαμηλού κινδύνου (Low risk)	HPV-26,53,66 HPV-6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81

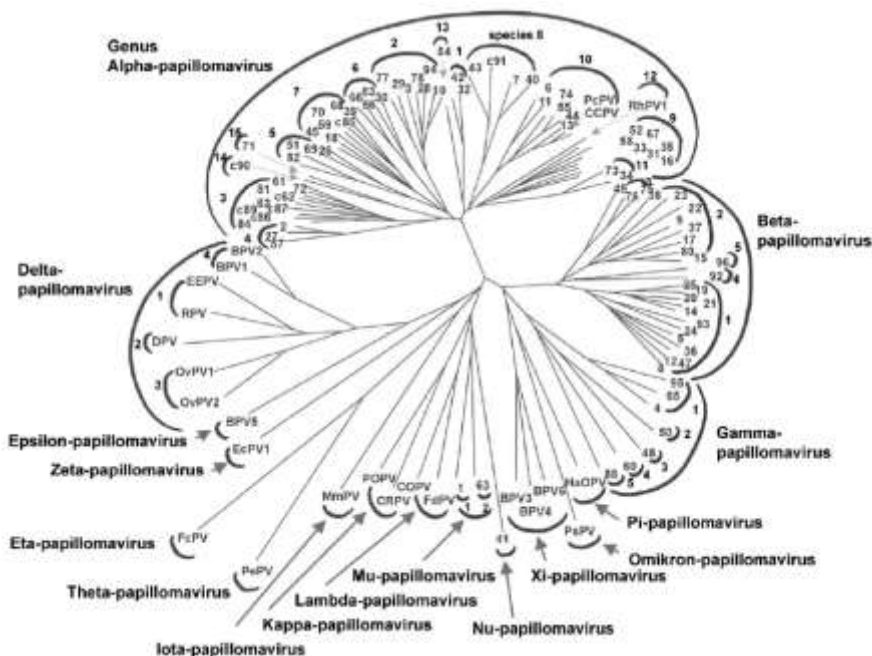
Πίνακας 1.1 Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

1.2 Ταξινόμηση των Papillomaviruses

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων σύμφωνα με τη διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) αποτελούν μια ξεχωριστή οικογένεια ιών με το όνομα Papillomaviridae. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε με βάση τις διαφορές στην οργάνωση, στο μέγεθος και στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ των papillomaviruses και των μελών της οικογένειας

Papovaviridae (de Villiers E.M. et al. 2004). Οι Papillomaviridae δεν κατηγοριοποιούνται σε οροτύπους. Χωρίζονται σε γένη, είδη, τύπους βασιζόμενοι στη γενετική τους ετερογένεια.

Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται, βάσει της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενομάτων (Shih – Yen Chan et al 1995). Οι Papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου. Έτσι έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu Papillomaviruses. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υποτύπους και διάφορες παραλλαγές (variants) βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του καμινδικού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον κατά 10% ενώ μεταξύ υποτύπων και variants 2-10% και 2% αντίστοιχα (de Villiers E. M et al 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α.) όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπισθεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Charles E. Et al 2007, A. Antonson et al 2006).



Εικόνα 1.2: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καμινδικού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers E.M. et al 2004).

1.2.1 Alpha – papillomavirus

Το γένος των alpha –papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Το γένος αυτό συμπεριλαμβάνει επίσης και τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος , όπως ο HPV -2 , που προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Στο γένος αυτό ανήκουν ιοί υψηλής επικινδυνότητας όπως είναι ο HPV -16 και ο HPV – 18. Οι τύποι αυτοί ενοχοποιούνται για την πρόκληση τραχηλικών αλλοιώσεων , που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90 % των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου ανευρίσκεται DNA από HPV και περίπου σε ποσοστό της τάξης του 50 % αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του HPV -16 (Bosch et al 2001). Στο γένος αυτό υπάρχουν και πολλές γενετικές παραλλαγές των ιών που ανήκουν σε αυτό . Η γενετική ετερογένεια στηρίζεται σε διαφορές στην αλληλουχία του γονιδιώματος οι οποίες επιδρούν στην εξέλιξη του κάθε ιού, στην παθογονικότητά του και στην προληπτική και θεραπευτική παρέμβαση (Chen Z. et al 2011).

Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται ως ενδιάμεσου και χαμηλού κινδύνου βάση 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).

1.2.2 Beta -papillomavirus

Το γένος αυτό αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά στελέχη. Προσβάλλουν συχνά το επιθήλιο του δέρματος χωρίς όμως να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί , ότι η μόλυνση από τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis) μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Pfister 2003). Κυρίως τα στελέχη HPV – 5 και HPV -8 εντοπίζονται στο 90 % αυτών των όγκων (Kremsdorf D. et al 1983).

1.2.3 Gamma , Nu , Mu papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV που προέρχονται από αυτά τα γένη προκαλούν δερματικά θηλώματα , τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο .

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

Εικόνα 1.3 Σύντομη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV

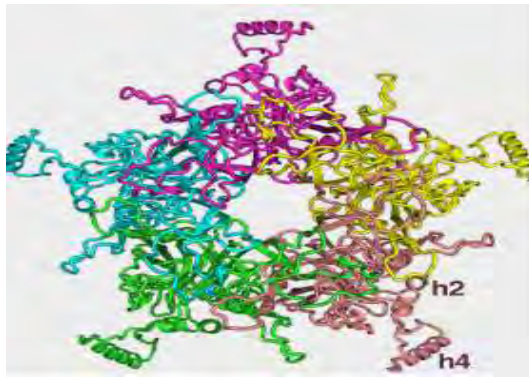
2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV)

2.1 Δομή καψιδίου

Οι papilloma ιοί , όπως , αναφέρθηκε είναι μια ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών μεγέθους 7900 bp . Η διάμετρός τους είναι της τάξης των 50 – 60 nm, ενώ δεν διαθέτουν εξωτερικό περίβλημα (Zhi- Ming Zheng et al 2006). Η εξωτερική επιφάνεια του ιϊκού σωματιδίου αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1, σχηματίζοντας εικοσαεδρικά καψίδια (Baker et al 1991). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας που συμβάλλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή (Yang R et al 2004). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L 2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της L 1 και έχει άγνωστο δομικό ρόλο . Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται μέσω μιας υδρόφοβης αμινοξικής αλληλουχίας κοντά στο C- τελικό άκρο της, με την L1 πρωτεΐνη. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 (Finnen R.L. et al 2003). Βασική της λειτουργία είναι η συμβολή της μαζί με την ιϊκή πρωτεΐνη E2 στο πακετάρισμα του ιϊκού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά καψίδια (Buck C.B. et al 2004). Οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γένωμα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA «μίνι χρωμόσωμα» εντός του καψιδίου L1 / L2 (Howley 1996).

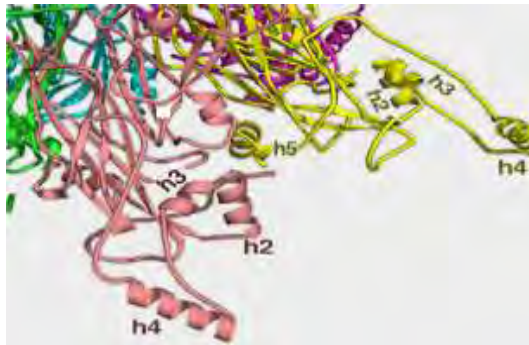
Το L1 πενταμερές περιέχει πέντε θηλιές που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές , οι οποίες αποτελούνται από 100 C- τελικά άκρα (εικ. 2.1,2.2,2.3). Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μία α- έλικα , η οποία είναι αγκιστρωμένη στο δομικό πυρήνα του L1 πενταμερούς δια μέσου δύο ελίκων, την έλικα 2 και την έλικα 3.

Τα πενταμερή είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς μεταξύ της έλικας 4 του ενός πενταμερούς με την έλικα 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C- τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της L1 για να σχηματίσουν την έλικα 5 (Brooke Bishop et al 2007).



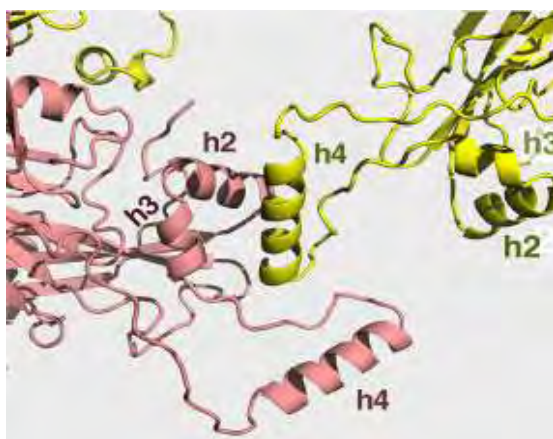
Εικόνα 2.1

Όψη ενός L1 πενταμερούς. Απεικονίζονται οι πλευρικές προεξοχές από κάθε ένα από τα πέντε μονομερή (το κάθε ένα με διαφορετικό χρώμα) (Brooke Bishop et al 2007)



Εικόνα 2.2

Πιο κοντινή όψη των πλευρικών προεξοχών δύο μονομερών δείχνοντας την ακριβή θέση των ελίκων- 2, 3, 4, 5, και του C-τελικού άκρου της L1 (Brooke Bishop et al 2007).

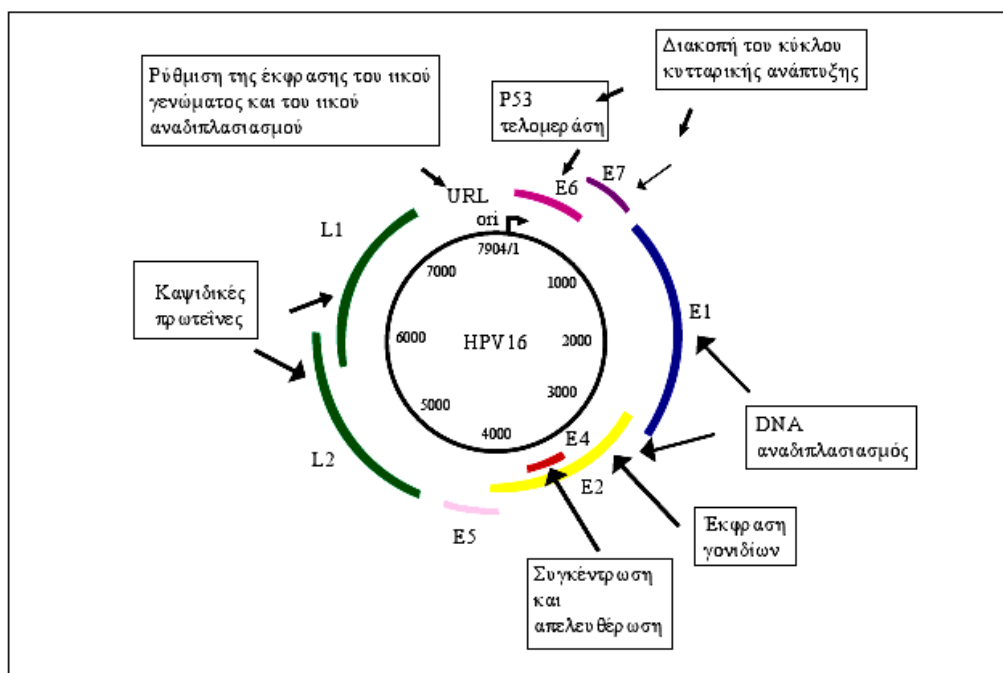


Εικόνα 2.3

Η δια-πενταμερής έλικα -έλικα αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πενταμερών στο T=1. Η έλικα 4 του ενός πενταμερούς (κίτρινο) αλληλεπιδρά με την έλικα 2 και 4 άλλου πενταμερούς. (Brooke Bishop et al 2007).

2. 2 Οργάνωση γενώματος

Το γονιδίωμα των papilloma ιών , όπως φαίνεται και στην εικόνα περιλαμβάνει 6 μη δομικά ιικά γονίδια E1 , E2 , E4 , E5 , E6 , E7 και δύο δομικά γονίδια L1, L2 (Zhi-Ming Zheng et al 2006).



Εικόνα 2.4 Παρουσίαση του γενώματος του HPV-16

Το γένωμα των papilloma ιών περιέχει οκτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) και διαχωρίζεται σε τρεις τομείς, βάση των λειτουργικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E= Early region), την όψιμη περιοχή (L= late region) και τη ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιϊκές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos O et al 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιϊκό καψίδιο, τις L1 και L2.

Η έκφραση του γενώματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Τον p97 υποκινητή που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (Smotkin et al 1986) και τον p670 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K et al 1996).

Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6. Ακόμα η LCR περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιϊκού DNA (Demeret et al 1995, Shyh-Han Tan et al 2002).

Η L1 δομική πρωτεΐνη του ιού χρησιμοποιείται για την παρασκευή του εμβολίου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας . Το εμβόλιο δημιουργεί υψηλό τίτλο εξουδετερωτικών αντισωμάτων . Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στελεχών HPV- 16 με πολυμορφισμούς άγνωστης βιολογικής δραστηριότητας στην αλληλουχία του L1 γονιδίου. Μελετώντας τέτοια στελέχη καταλήγουμε στην κατανόηση μηχανισμών του ιού που τον βοηθούν να διαφύγει του ανοσοποιητικού συστήματος (Fрати E et al 2011).

2.2.1 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μία πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70- 80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος (Ustav and Stenlund , 1991). Η πρωτεΐνη αυτή έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA , έχει δραστικότητα ελικάσης ,ATPάσης και τη δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και τη μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

Η E1 προσδένεται σε μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με τη βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo S et al 2003). Το σύμπλοκο E1- E2 αποτελείται από ένα διμερές και δύο μόρια E1 .Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν δομική μονάδα για τη συγκρότηση ενός μεγαλύτερου E1 εξαμερούς συμπλόκου , που έχει τη δυνατότητα να ξετυλίγει το DNA (Sedman J et al 1998). Η E2 επομένως λειτουργεί σαν παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσης της και επιπρόσθετα σαν παράγοντας που συναρμολογεί τα E1 μονομερή (Liu J. S.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 και παθογένεια (Peter W. White et al 2005)

2.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη έχει μέγεθος 50 kDa ,δρα σαν διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιϊκού DNA (Laimins et al 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: C- τελική περιοχή , η οποία κωδικοποιεί και σχηματίζει μια διμερή δομή β-

βαρελιού που προσδένεται στο DNA (Hegde et al 1992). Μια περιοχή – αρμός (hinge region) και την N- τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μια α- έλικα(Anston et al 2000). Η N- τελική και η C- τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPV ενώ η hinge περιοχή δείχνει μεγαλύτερη ετερογένεια (Francis et al 2000). Η E2 πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι μία πρωτεΐνη που συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al 1987). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (Bouvard V. et al 1994). Οι περιοχές αυτές είναι εντός της περιοχής του LCR του HPV- 16 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin et al 1986). Δύο από τις περιοχές αυτές βρίσκονται στο TATA Box ακριβώς ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni et al 1991, Tan et al 1992). Οι άλλες δύο θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham et al 1994).

Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για το αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται σε θέσεις που τοποθετούνται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger and Corbach, 1997). Όταν η συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή καταλαμβάνονται και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7 (Romanczuk et al 1990, Steger and Corbach 1997). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 (Bechtold et al 2003).

2.2.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 συντίθεται 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 της ζωής τους.

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 ιϊκών σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του (Roberts et al 1994).

Μία ακόμα 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 C.E. et al 2002).

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

2.2.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη που η λειτουργία της δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στη συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M et al 1993). Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της E5 αυξάνεται η

φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al 1993).

2.2.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη των ιών υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας αποτελείται περίπου από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι συντηρημένο μεταξύ των HPV και αποτελεί σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού (Cole and Danos ,1987). Η E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη αυτή από μόνη της είναι δυνατό να μετασχηματίσει NIH3T3 κύτταρα και να δημιουργήσει αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα (Band et al 1991 , Wazer et al 1995). Από μόνη της όμως η E6 δεν είναι ικανή να μετασχηματίσει κερατινοκύτταρα. Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Hawley – Nelson et al 1989).

Μια βασική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας καταστολέας όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης p21 (Ko L and C Prives. 1996). Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress , όπως βλάβη στο DNA , η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21 , η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο , δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει τη βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S. E et al 2005). Όσον αφορά στη σύνδεση του μονοπατιού αυτού με τον HPV έχει διαπιστωθεί ότι η E6 προσδένεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6AP (Huibregtse et al 1991). Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού οδηγεί στην ουβικουτινίωση της p53 και στην αποδόμησή της στο 26 s πρωτεάσωμα. Ακόμη η E6 μπορεί να αναστείλει τη δράση της p53 έμμεσα μέσω σύνδεσής της με την p300/CBP , που είναι συνενεργοποιητής της p53 (Huibregtse et al 1991).

Μια δεύτερη σημαντική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσής τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των

HPV υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας σε πειράματα με ποντίκια (Nguyen et al 2003).

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για τη δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης Htert (Klingelhutz et al 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια της δράσης της τελομεράσης επιδρά στη σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση οδηγώντας σταδιακά στη γήρανση των κυττάρων και τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Liu J.P 1999). Η E6 φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT μέσω συνδυαστικής δράσης στο c-myc και Sp1 (Kyo et al 2001). Αυτή η εκτεταμένη ενεργοποίηση της Htert έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντας την κυτταρική γήρανση με άμεση συνέπεια τα κύτταρα να γίνονται αθάνατα (Artandi S.E et al 2005).

2.2.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με τη δημιουργία αθάνατων κυττάρων καθώς επίσης και με την ιϊκή παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μέγεθος 100 αμινοξέων και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές, τη CR1, τη CR2 και τη CR3 (Barbosa M.S et al 1990, Dyson et al 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με το ρετινοβλάστωμα (Dyson et al 1992). Τέλος, η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτυλίων ψευδαργύρου. Η έκφραση μόνο της E7, απουσία της E6 μπορεί να δημιουργήσει αθάνατα NIH 3T3 κύτταρα και σε χαμηλό ποσοστό να δημιουργήσει αθάνατα κερατινοκύτταρα (Munger et al 1989). Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος περιλαμβάνει επίσης την p107 και p130 (Dyson et al 1989). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην κυτταρική απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με

αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με το μεταγραφικό παράγοντα E2F με συνέπεια να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά τη δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος (Berezhutskaya et al 1997, Wang et al 2001). Η πρόσδεση της E7 στην Rb έχει σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

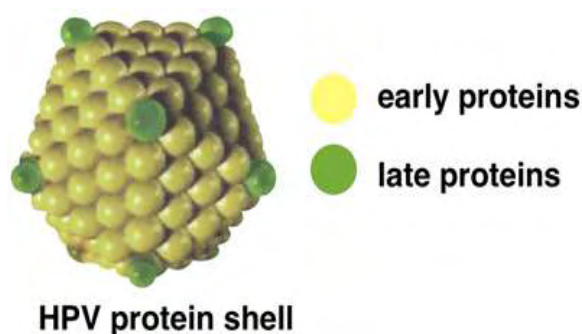
Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης και με τους αναστολείς των κυκλίνο- εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών τα οποία με τη σειρά τους μπλοκάρουν τη δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Funk J. O et al 1997).

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά με την E7 είναι η απακετυλάση των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο- ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν επιπρόσθετα να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί ότι η σύνδεση της E7 στην HDAC αναστέλλει τη σύνδεση της Rb-HDAC με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η λειτουργία της. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση της E7 στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F . Το τελευταίο συνεπάγεται την απορρύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDACs με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth M. S et al 2004 , Brehm A et al 1999). Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες όλων των πρωτεϊνών του ιού.

Πρωτεΐνες του ιού HPV

- L1 Μεγάλη δομική πρωτεΐνη, στόχος για εμβολιασμό
- L2 Μικρή δομική πρωτεΐνη
- E1 Έναρξη αντιγραφής του ιϊκού DNA
- E2 Ρύθμιση της μεταγραφής του ιού
- E4 Διάσπαση της κυτταροκερατίνης και διευκόλυνση της απελευθέρωσης του ιού
- E5 Αλληλεπίδραση με αυξητικούς παράγοντες

E6 Τροποποιητική πρωτεΐνη- στοχεύει στον εκφυλισμό του p53
E7 Τροποποιητική πρωτεΐνη – αλληλεπιδρά με το pRb
Η λειτουργία των πρωτεϊνών E3 και E8 δεν έχει διευκρινισθεί



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση των πρώιμων και όψιμων πρωτεϊνών του ιού.

2.3 Μορφή γενώματος

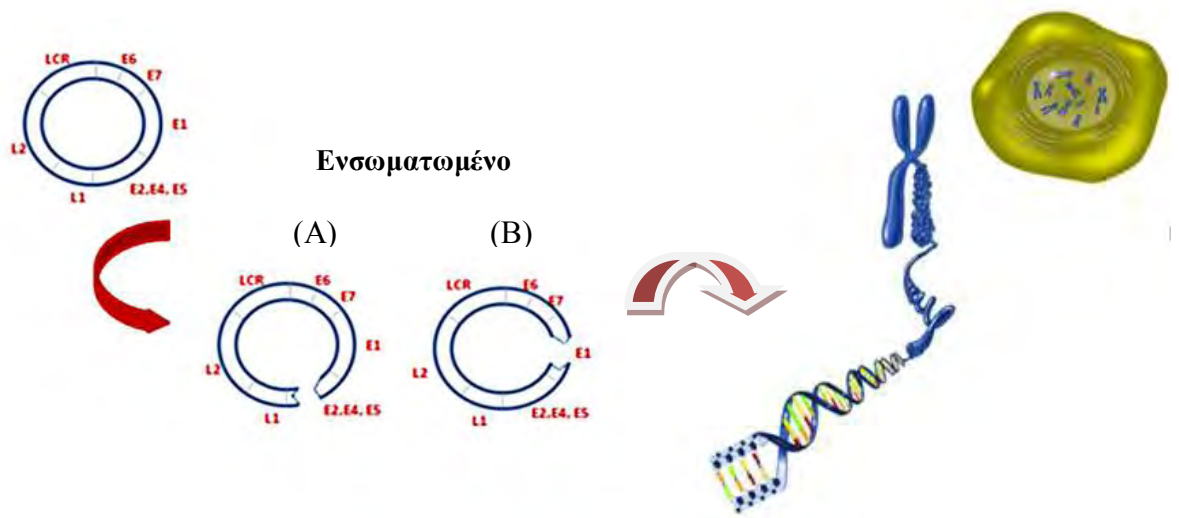
Το γονιδίωμα του ιού στο κύτταρο του ξενιστή μπορεί να βρίσκεται είτε με τη μορφή επισώματος, είτε ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου- ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Σε μολυσμένα κύτταρα στα οποία ο ιός έχει “εγκατασταθεί” διατηρεί το γονιδίωμα του υπό τη μορφή πλασμιδίου. Το γονιδίωμα του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

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

Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται συνήθως μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στη θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 και με μικρότερη συχνότητα στο γονίδιο E4 (Arias- Pulido H et al 2006, Klaes et al 1999). Η διάσπαση του E2 γονιδίου είναι ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς μετά τη μόλυνση του κυττάρου από τον ιό. Επιπλέον είναι ένα κρίσιμο σημείο για την έναρξη τραχηλικής νεοπλασίας και ένας πιθανός μοριακός δείκτης εξέλιξης της νόσου. Η θραύση των γονιδίων E2 και E1 απορυθμίζει τον έλεγχο της μεταγραφής των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα να μεταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακόμη τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων είναι πιο σταθερά καθώς περιλαμβάνουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες (Lehn H et al 1988, Couturier J et al 1991). Από όλα τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι τα τραχηλικά κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένα ιϊκά ογκογονίδια έχουν ένα ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα που τους δίνει μεγαλύτερη πιθανότητα να μετατραπούν σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα.

Επιπλέον σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται διάφορες κυτταρογενετικές αλλαγές , οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια ή κέρδος λειτουργίας πολλών κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του HPV με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών γονιδίων. Μερικά γονίδια γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου έχει παρατηρηθεί ότι διαρρηγνύονται λόγω ενσωμάτωσης του HPV. Μερικά από αυτά είναι τα MYC , TP63 , NR4A2 , APM-1 , FANCC , TNFAIP2 και Htert (Wentzensen N et al 2004). Πιο συγκεκριμένα η ενσωμάτωση του HPV -16 κοντά στο πρωτοογκογονίδιο c-myc , συναντάται στο 10% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση αυτού του πρωτοογκογονιδίου (Durst M et al 1987, Herrick J et al 2005, Wentzensen N 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.

Επίσωμα



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση της ρήξης των γονιδίων E1 και E2 και της ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα

3. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HPV

3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Πιστεύεται ότι τα ιϊκά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να διαπερνά το επιθήλιο και να φτάνει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Στη συνέχεια ο ιός εισέρχεται εντός των κυττάρων μέσω σύνδεσής του με τη θεική ηπαρίνη, η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S 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 του ξενιστή. Τέτοιοι συνυποδοχείς είναι οι α6-ιντεγκρίνες (Yoon Cs et al 2001). Πρόσφατα ένας ακόμα παράγοντας, η λαμινίνη-5, αποδείχθηκε ότι είναι ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp TD et al 2006).

Στη συνέχεια, μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα ο ιός εισέρχεται μέσα στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση σε κυστιδία κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έχει προταθεί ότι ο HPV-16 εισέρχεται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Bousarghin L et al 2003). Έπειτα τα ιϊκά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιϊκό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της καμινδιακής πρωτεΐνης L2 (Day P.M et al 2004).

3.2 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Οι papilloma ιοί αντιγράφουν το γένωμά τους σε διαφορετικές περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου της ζωής τους αλλά και με διαφορετική συχνότητα. Σε πρώτο επίπεδο έχει προταθεί ότι, όταν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολυνθούν από τον ιό παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιϊκού γενώματος μεταξύ 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο (Fields et al 1996). Στο σημείο αυτό το ιϊκό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιϊκού γενώματος συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής

στοιβάδας στη φάση S. Στη φάση αυτή το ιϊκό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιϊκού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιϊκού γενώματος με σκοπό τη σύνθεση ιϊκού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R et al 2006).

Τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται μετά τη μόλυνση είναι τα E1 και E2 που όπως έχουμε αναφέρει επάγουν την αντιγραφή του DNA, με την πρωτεΐνη E2 να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας τη δράση των γονιδίων E6 και E7.

Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιϊκού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) (Corden S.A et al 1999, Pett M.R et al 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου, οδηγώντας τελικά στην καρκινογένεση.

3.3 Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος

Οι papilloma ιοί προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση αυτή ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zhi – Ming Zheng et al 2006).

Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) από την πρόιμη περιοχή του ιϊκού γενώματος. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6, E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (ο p97 για τον HPV-16). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Από την άλλη πλευρά στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιϊκού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιϊκού

γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιϊκών γονιδίων (Grassmann K et al 1996).

3.4 Σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των papilloma ιών περιλαμβάνει την τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και τη σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης E2 (Day P.M et al 1998), η οποία όπως έχει παρατηρηθεί συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B et al 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος εντός του καψιδίου (Fay A et al 2004). Από την άλλη πλευρά η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι βασική δομική μονάδα του καψιδίου των HPV (Florin et al 2002).

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

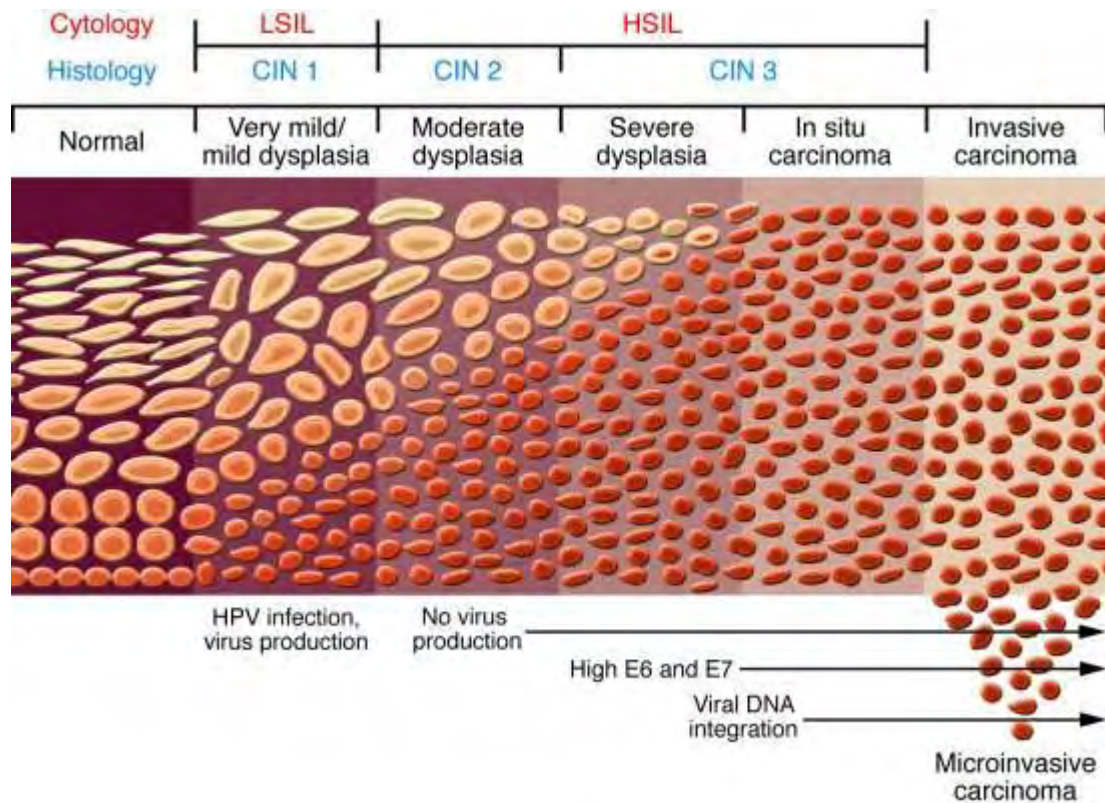
Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr E et al 2004). Στη διαδικασία αυτή μπορεί να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^{E4}. Η τελευταία αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια (Roberts S et al 1997).



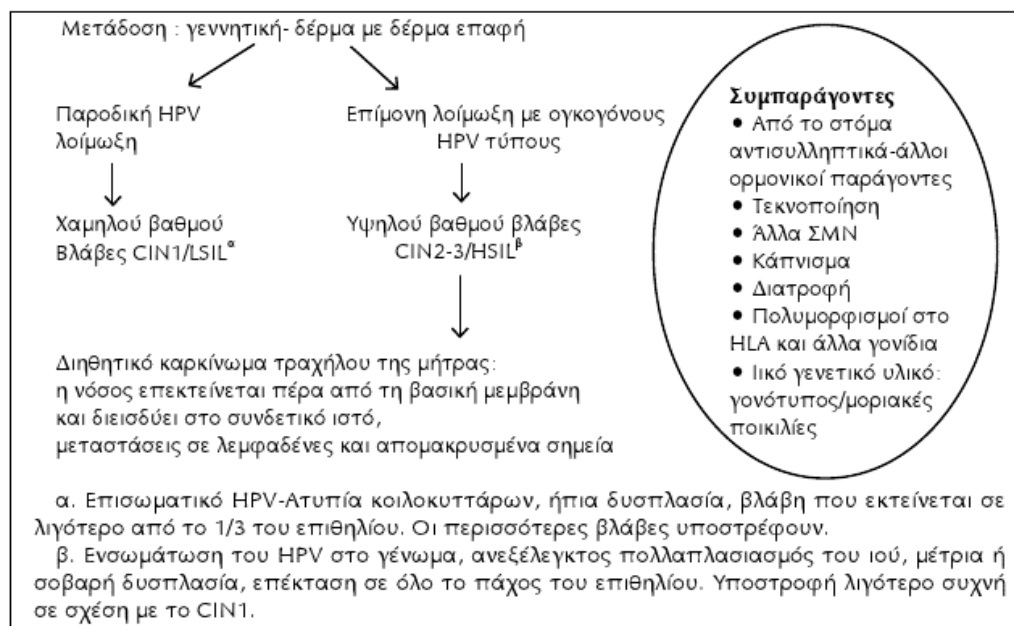
Εικόνα 3.1: Απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιϊκών σωματιδίων από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στα μολυσμένα κύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας

3.5 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 et al 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερο βαθμό δυσπλασίας (CIN2 , CIN3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιϊκού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου- ξενιστή , από μόνη της δεν αρκεί για κακοήθη εξαλλαγή. Η τελευταία είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες , μερικοί από τους οποίους είναι η έκφραση κυτταροκερατινών , γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A et al 2003).



Εικόνα 3.2 Απεικόνιση της ιστολογικής προόδου της νόσου



Εικόνα 3.3 Ιστολογικές αλλοιώσεις και παράγοντες που τις επιτείνουν

4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

4.1 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Η HPV λοίμωξη αποτελεί ένα πολύ συχνό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στους σεξουαλικά ενεργούς ενήλικες και εφήβους. Επηρεάζει περισσότερες από 400.000 γυναίκες ετησίως σε όλο τον κόσμο ενώ αντιπροσωπεύει τη δεύτερη πιο συχνή αιτία κακοήθειας στο γυναικείο πληθυσμό μετά τον καρκίνο του μαστού (Ferlay et al 2001). Στις ΗΠΑ ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στον τράχηλο έχει αυξηθεί κατά 80% τα τελευταία 50 χρόνια (Singer et al 1995). Μελέτες έχουν υπολογίσει ότι περίπου 6 εκατομμύρια νέες HPV μολύνσεις συμβαίνουν κάθε χρόνο μόνο στις ΗΠΑ και ένας στους πέντε ενήλικους αμερικάνους θα μολυνθεί από HPV. Προβλέπεται ότι στο γενικό πληθυσμό το 75% των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχουν ήδη μολυνθεί με HPV που προσβάλλουν το γενετικό σύστημα (Cates W Jr et al 1999).

Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι η ακριβής επίπτωση των λοιμώξεων αυτών δεν μπορεί να προσδιοριστεί σαφώς ,λόγω των διαγνωστικών περιορισμών που τίθενται από τη φύση της λοίμωξης που ως ιογενούς αιτιολογίας απαιτεί ειδικές διαγνωστικές προσεγγίσεις όπως η PCR. Επίσης, ο υποκλινικός χαρακτήρας της νόσου για πολλά χρόνια, καθιστά την αιτιολογική διάγνωσή της αντικείμενο της προληπτικής ιατρικής και επαφίεται στη συμμόρφωση και την τακτή προσέλευση των γυναικών για κυτταρολογικό ή ιολογικό έλεγχο. Σε πολλές ακόμα περιπτώσεις , συμβαίνουν επαναλαμβανόμενες ή υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, ενώ συχνές είναι και οι λοιμώξεις από περισσότερους του ενός τύπου HPV. Τέλος, παρατηρούνται αρκετές φορές αποκλίσεις στην τυποποίηση των ιών HPV μεταξύ των κλινικών εργαστηρίων, λόγω των ομοιοτήτων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των τύπων και της ανάγκης για διαγνωστικές δοκιμασίες υψηλής ειδικότητας.

Στις περισσότερες μελέτες η συνηθέστερη ηλικία λοίμωξης από HPV είναι μικρότερη των 25 ετών ενώ η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται στην ηλικία των 50 ετών (Muno Z et al 2004). Τέλος, η συχνότητα ενεργής νόσου από τους ιούς HPV μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, κυρίως λόγω της επίκτητης ανοσίας του

γεννητικού συστήματος και του μειωμένου κινδύνου από τη διαφοροποίηση της σεξουαλικής συμπεριφοράς.

Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ' επέκταση καρκίνο είναι οι HPV -16 και HPV -18 σε ποσοστό 50% και 23% αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8% και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τύποι 16 και 18 του ιού προκαλούν το 70% των περιστατικών καρκίνου του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως. Παρόλα αυτά παρατηρείται μια γεωγραφική και ειδική για κάθε χώρα μεταβλητότητα. Όπως για παράδειγμα στην υπό- Σαχάρια Αφρική και τη Λατινική Αμερική όπου οι τύποι 16 και 18 είναι υπεύθυνοι για το 65% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου. Επιπλέον έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι οι τύποι των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στη Δυτική Αφρική, ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν οι HPV 39 και 54 (Bosh et al 1995).

4.2 Τρόποι μετάδοσης

Η μετάδοση των ιών HPV γίνεται μέσω σεξουαλικής επαφής αλλά και μέσω δερματικής επαφής. Ο ιός μολύνει τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας που εκτίθεται στον ιό μέσω μικροτραυματισμών στο επιθήλιο. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι το προφυλακτικό δεν παρέχει πλήρη προστασία.

Ένας άλλος τρόπος μετάδοσης είναι η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια του τοκετού.

Οι HPV μολύνουν το πλακώδες, το μεταβατικό και το κυλινδρικό επιθήλιο. Μόλυνση με τους hr (high risk) HPV και πιο συγκεκριμένα με τους τύπους 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 και 68 μπορεί να προκαλέσουν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου (CIN), ενδοθηλιακή νεοπλασία του αιδίου (VIN) ,ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πέους (PIN) και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πρωκτού (AIN). Πρόκειται για προκαρκινικές δυσπλασίες που μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο.

4.3 Παράγοντες κινδύνου

Όσον αφορά στους παράγοντες κινδύνου, σημαντικότερο ρόλο παίζει ο αριθμός των πρόσφατων ερωτικών συντρόφων και ο συνολικός αριθμός αυτών, όπως επίσης και η συχνότητα των σεξουαλικών επαφών. Για το λόγο αυτό, η μεγαλύτερη επίπτωση της HPV λοίμωξης παρατηρείται στις νεαρές ηλικίες. Επίσης, παράγοντα κινδύνου αποτελούν τα χαρακτηριστικά του σεξουαλικού συντρόφου, όπως η παρουσία γεννητικών κονδυλωμάτων και ο αριθμός των ερωτικών του συντρόφων.

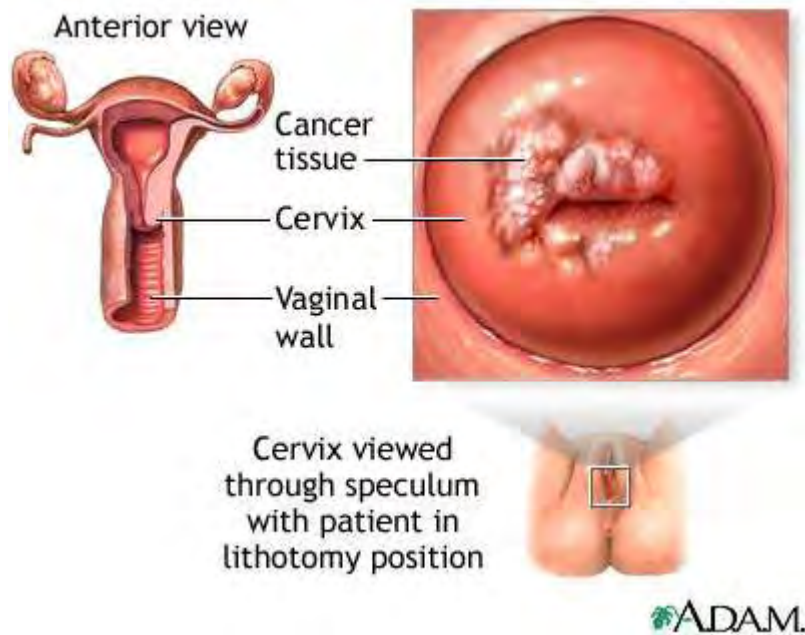
4.4 Κλινική εικόνα

Η HPV λοίμωξη είναι συνήθως υποκλινική και αφανής και για αυτό το λόγο γίνεται αντιληπτή μόνο αν βρεθεί σε προληπτικούς ελέγχους ή από τις απότερες επιπλοκές της. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι σε 70% των γυναικών ο ιός αποβάλλεται εντός 12 μηνών, ενώ >90% των γυναικών τον αποβάλλει 2 έτη μετά την απόκτησή του. Τα υψηλά αυτά ποσοστά αποβολής του ιού αφορούν κυρίως τις γυναίκες κάτω των 30 ετών. Για το λόγο αυτό, η Αμερικανική Εταιρεία Μαιευτικής-Γυναικολογίας προτείνει ο έλεγχος ρουτίνας για την ανίχνευση hr HPV να γίνεται κυρίως σε γυναίκες > 30 ετών.

Η παραμονή της λοίμωξης για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, έχει σχέση με το μεγάλο συνολικό αριθμό συντρόφων, τη μεγαλύτερη ηλικία της γυναίκας, την παρουσία πολλαπλών τύπων HPV, τη μόλυνση με υψηλού κινδύνου τύπο HPV και το μεγαλύτερο ιϊκό φορτίο.

Δέρμα	
Εν τω βάθει μυρμηγκιές των πελμάτων	HPV-1
Κοινές μυρμηγκιές	HPV-2,4
Επίπεδες μυρμηγκιές	HPV-3,10
Βλεννογόνο	
Γεννητικά κονδυλώματα	HPV-6,1
Καρκίνος τραχήλου μήτρας: Υψηλού κινδύνου (HR)	HPV-16,18,31,33,35,39, 45,51,52, 56,58,59,68,73,82
Χαμηλού κινδύνου (LR)	HPV 6,11,40,42,43,44,54,61, 70,72,81 CP6108
Αιδοϊκός καρκίνος	HPV-16
Πεϊκός καρκίνος	HPV-16
Στοματοφαρυγγικός καρκίνος	HPV-16
Αναπνευστικά θηλώματα	HPV-6,11

Πίνακας 3.1 Κλινικές εκδηλώσεις στο δέρμα και στο βλεννογόνο και τύποι HPV που τις προκαλούν



Εικόνα 4.1 Ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου

4.5 Διάγνωση των HPV λοιμώξεων

Για τη διάγνωση των HPV λοιμώξεων έχουν χρησιμοποιηθεί ορολογικές μέθοδοι, οι οποίες ανιχνεύουν αντισώματα έναντι των καψιδικών αντιγόνων L1 και L2. Οι μέθοδοι αυτές δεν έτυχαν ευρείας χρήσης, καθώς τα αντισώματα αυτά δεν ανιχνεύονται στην πρώιμη φάση της λοίμωξης και η παραμονή τους ποικίλλει για τους διάφορους τύπους HPV. Επίσης, τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται μόνο σε 50 – 80 % των γυναικών με θετικό HPV-DNA ή HPV αλλοιώσεις.

4.6 Κλινική και κολποσκοπική εξέταση

Με την κλινική και κολποσκοπική εξέταση, είναι οπτικά ορατές μόνο οι μεγάλες θηλωματώδεις αλλοιώσεις, ενώ η πλειονότητα των λοιμώξεων είναι μακροσκοπικά μη ορατή. Έχει χρησιμοποιηθεί η κολποσκόπηση με τη χρήση ακετοξεϊκού οξέος στο τραχηλικό επιθήλιο.

4.7 Μικροσκοπική Εξέταση κυτταρολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων (PAP- TEST)

Το Pap – test ανιχνεύει μόνο το 15 – 50 % των hr HPV λοιμώξεων , καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα μετά την HPV λοίμωξη παρουσιάζουν μια ποικιλία μορφολογικών αλλοιώσεων (κοιλοκύτταρα , μεταβολές στο μέγεθος και στο σχήμα του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα). Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι αν και ο κυτταρολογικός έλεγχος έχει σχετικά χαμηλή ευαισθησία, όταν γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα προσφέρει ικανοποιητική προστασία από διηθητικό καρκίνο του τραχήλου, αφού το 60 % των περιστατικών παρατηρούνται σε γυναίκες με ελλιπή ή καθόλου κυτταρολογικό έλεγχο. Οι κυριότεροι περιορισμοί της κυτταρολογικής εξέτασης είναι ότι προϋποθέτει κολποσκοπική εξέταση, η οποία προκαλεί δυσφορία στην ασθενή, είναι χρονοβόρα, απαιτεί επιδεξιότητα και περικλείει κίνδυνο αποβολής και πρόωρου τοκετού σε εγκύους. Επίσης, είναι δύσκολη η πρόσβαση στην κολποσκοπική εξέταση στις υποανάπτυκτες χώρες. Όλα αυτά αποτελούν μειονεκτήματα της κυτταρολογικής εξέτασης και οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων για τη διάγνωση υψηλού κινδύνου HPV λοιμώξεων, για την πρόληψη των κυτταρικών αλλοιώσεων από τους ιούς αυτούς, που οδηγούν στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται κυρίως στη μοριακή ανίχνευση του hr HPV – DNA. Σε σύγκριση με τον κυτταρολογικό έλεγχο, οι μοριακές τεχνικές αναζήτησης γενικά παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία για προχωρημένες βλάβες > CIN3 και αρνητική προγνωστική αξία που προσεγγίζει το 100%.

4.8 Μοριακή διάγνωση της HPV λοίμωξης

Τα τελευταία χρόνια, επιδιώκεται ολοένα και περισσότερο η ανίχνευση της HPV λοίμωξης με μοριακές τεχνικές. Πριν αναφέρουμε τις τεχνικές αυτές θα πρέπει να σημειωθεί το εξής επειδή οι χαμηλού κινδύνου τύποι HPV δεν προκαλούν κακοήθη εξαλλαγή παρά μόνο καλοήθεις βλάβες , δεν αρκεί η απλή αναζήτηση HPV λοίμωξης αλλά είναι απαραίτητη η ανίχνευση των υψηλού κινδύνου τύπων με ακριβή τυποποίηση των hrHPV ιών.

Για τη μοριακή διάγνωση έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα. Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής :

Η τεχνική Hybrid Capture (HCII) HPV test της εταιρείας Digene, που περιλαμβάνει υβριδισμό του DNA στόχου με ένα "κοκτέιλ" ειδικών για κάθε HPV τύπο RNA- ανιχνευτών, που ακολουθείται από σύνδεση των DNA/RNA υβριδίων σε μία στερεή φάση. Έπειτα, η ενίσχυση του σήματος για να ανιχνευθεί γίνεται με τη σύνδεση των υβριδίων με μείγμα πολλαπλών αντισωμάτων, συνδεδεμένων με σύμπλοκο, που αναγνωρίζουν ειδικά το κάθε DNA/RNA υβρίδιο.

Έχουν αναπτυχθεί ακόμη δοκιμασίες PCR που περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό ενός τμήματος που είναι συντηρημένο σε πολλούς τύπους HPV (συνήθως εντός του γονιδίου της πρωτεΐνης L1) (consensus PCR) οι οποίοι μετέπειτα διακρίνονται μεταξύ τους με τη χρήση ειδικών DNA ανιχνευτών.

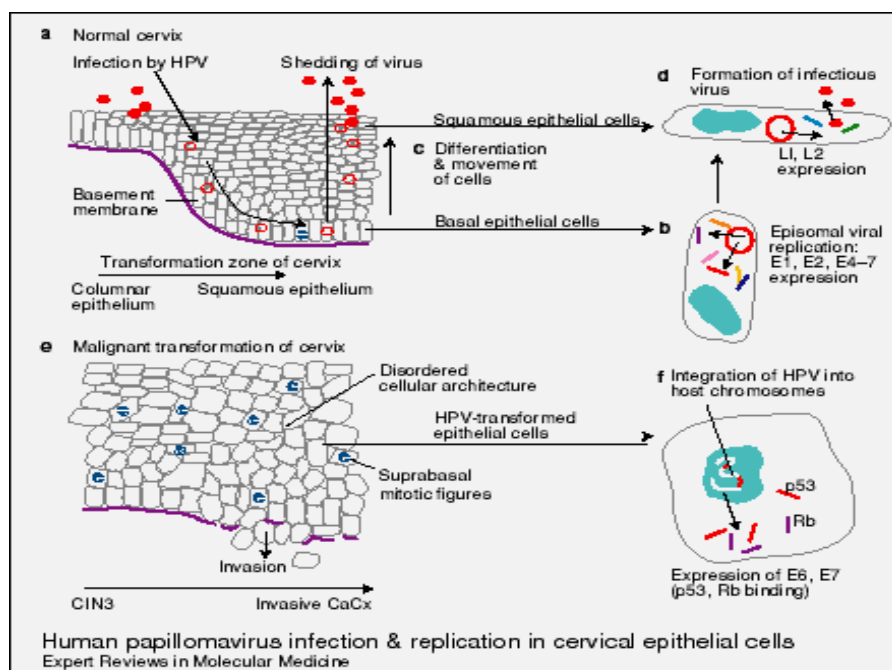
Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές τεχνικές PCR με ειδικούς εκκινητές (primers) για κάθε τύπο υψηλού κινδύνου σε μονή (single) για κάθε τύπο ξεχωριστά ή πολυπλεκτική (multiplex) αντίδραση. Υπάρχουν ποικίλα in house πρωτόκολλα με διάφορα primer sets που έχουν ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα αλλά και ποικίλα εμπορικά kit.

Τέλος, σε αυτό που θα αναφερθούμε περισσότερο και παρακάτω είναι η τεχνική της real- time PCR με διάφορα εμπορικά kit για την ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου.

4.9 Μέτρηση του ιϊκού φορτίου και ενσωμάτωση του HPV – 16 στο γονιδίωμα του ξενιστή

Η ενσωμάτωση του HPV 16 στο DNA του κυττάρου ξενιστή, έχει προταθεί, ως ένας πιθανός δείκτης που μας δείχνει την πρόοδο της τραχηλικής νεοπλασίας. Με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR (real – time) μπορούμε να μετρήσουμε το ιϊκό φορτίο στα τραχηλικά δείγματα. Η ενσωμάτωση είναι ένα γεγονός που συμβαίνει αρκετά νωρίς με την έναρξη της καρκινογένεσης και αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για την μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά. Το γονιδίωμα του HPV ενσωματώνεται, συνήθως, διακόπτοντας το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του E2 γονιδίου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια του E2 γονιδίου που δρα ως μεταγραφικός καταστολέας στην έκφραση των γονιδίων E6 και E7. Το τελευταίο συνεπάγεται την υπερέκφραση των γονιδίων E6 και E7. Τα ογκογόνα στελέχη των HPV όπως είναι ο 16 μπορεί να βρίσκονται σε μορφή επισώματος ή ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα του ξενιστή (Krzystof Lukaszuk et al 2002).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του E2, E6 και E7 γονιδίου. Αυτό γίνεται για να υπολογίσουμε στη συνέχεια το λόγο E2/E6. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού γίνεται μέσω ρήξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) του E2 γονιδίου προσδιορίσαμε μέσω real-time PCR το ιικό φορτίο μέσω των γονιδίων E2 ,E6 και E7. Ο υπολογισμός του λόγου είναι σημαντικός δείκτης ώστε να προσδιορίσουμε τη μορφή του γονιδιώματος του ιού. Το γονίδιο E2 θεωρείται ως μια μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος του ιού διότι η ενσωμάτωσή του συνεπάγεται ρήξη εντός του E2. Αντίθετα τα γονίδια E6 και E7 αποτελούν σταθερές περιοχές του γονιδιώματος. Άρα ο λόγος που θα χρησιμοποιήσουμε περιέχει μία σταθερή και μία μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος. Τα δείγματα που εξετάσαμε έχουν ποικίλες ιστολογικές αλλοιώσεις. Θα προσπαθήσουμε να αποδείξουμε ότι ο λόγος E2/E6 είναι υψηλότερος σε καρκίνωμα in situ και χαμηλότερος σε προχωρημένα κλινικά στάδια καρκίνου. Ο υπολογισμός αυτού του λόγου θα μπορούσε να αποτελέσει μια απλή μέθοδο επιλογής ασθενών με υψηλό κίνδυνο για κακή πρόγνωση.



Εικόνα 4.2 Σχηματική απεικόνιση της ενσωμάτωσης του ιού στα κύτταρα του ξενιστή

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά εικοσιοκτώ (28) κλινικά δείγματα, εκ των οποίων τα δεκαοκτώ (18) είχαν χαμηλού βαθμού τραχηλική ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση , τα οκτώ (8) είχαν υψηλού βαθμού τραχηλική ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση και τα δύο (2) είχαν διηθητικό καρκίνο. Τα τραχηλικά επιχρίσματα συλλέχθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και στο Αττικό Νοσοκομείο Αθηνών.

Ο προσδιορισμός της αλλοίωσης έγινε με τη μέθοδο test – pap στα εργαστήρια κυτταρολογίας των αντίστοιχων νοσοκομείων ενώ η ταυτοποίηση των δειγμάτων ως HPV-16 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας- Μικροβιολογίας με τη μέθοδο της Nested – Multiplex PCR σύμφωνα με τη δημοσίευση K. Sotlar et al 2004. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων με βάση το βαθμό της τραχηλικής αλλοίωσης παρουσιάζεται στους πίνακες 5.1 και 5.2.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ High Grade (HG)	
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ΑΤΤ 9	HG
ΠΝΛ 4	CIN III
ΠΝΛ 5	CIN III
ΠΝΛ 6	CIN II- CIN III
ΠΝΛ 7	Ca in situ
ΠΝΛ 8	CIN II
ΠΝΛ 10	CIN III
ΠΝΛ 11	CIN III
ΠΝΛ 15	CIN I , CIN III
ΠΝΛ 16	Invasive cancer

Πίνακας 5.1 Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων με υψηλού βαθμού τραχηλική δυσπλασία.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ Low Grade (LG)	
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ATT 8	Low grade
ΠΝΛ2	CIN I
ATT 10	LG
ATT 12	LG
ATT 18	LG
ATT 21	LG
ATT 22	LG
ATT 24	LG
796	LG
858	LG
868	LG
2279	LG
ATT 6	LG
ATT 45	LG
ATT 51	LG
ATT 78	LG
ATT 91	LG
ATT 98	LG

Πίνακας 5.2 Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων με χαμηλού βαθμού τραχηλική δυσπλασία.

ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η εκχύλιση του DNA έγινε από τραχηλικά δείγματα που η λήψη τους έγινε με τη μέθοδο thin – prep. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I et al , 1996. Κάνουμε ανάμειξη του διαλύματος

που βρίσκεται το δείγμα με γλυκογόνο 20 µg/ tube και Lysis Buffer 600 µl (GuSCN 4M, N-lauroyl sacrosine 0,5% , Dithiotreitol 1mM , sodium citrate 25Mm) , το μείγμα επώαζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου . Στη συνέχεια προστέθηκαν 400µl παγωμένης ισοπροπανόλης (- 20 °C), καλή ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 20 min στους +4 °C . Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf , στους +4 °C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 500 µl 70% παγωμένης αιθανόλης. Έπειτα ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους +4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα , το οποίο περιέχει το εκχυλισμένο κυτταρικό και ιϊκό DNA, επαναδιαλύθηκε σε 100 µl dH₂O (RNase, Dnase free , Sigma Aldrich Inc , St Louis USA). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους - 20 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.3 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GAPDH (glyceraldehyde – 3-phosphate dehydrogenase)

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA και για τη διαπίστωση ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς της PCR πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH ενός housekeeping γονιδίου. Για τη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια GAPDH F/R : GAPDH F (5-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3) GAPDH R (5- TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3).

Στην συνέχεια όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του παραπάνω γονιδίου με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50µl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 µl DNA από κάθε δείγμα, 2 µl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5µl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 5 µl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (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 . Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 50sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 20sec. 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.

5.4 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε2 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Με τη διαδικασία της απλής PCR ενισχύουμε το γονίδιο Ε2 για να προχωρήσουμε στη συνέχεια στην κλωνοποίησή του. Το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκε ενισχύει ένα μέρος του γονιδίου Ε2, και συγκεκριμένα 190 βάσεις του γονιδίου. Η αλληλουχία των primers είναι η εξής: 5' - CTA AGT TGT TGC ACA GAG ACT CA-3' (Ε2 F13), (Ε2R13) 5'- GAC GAC ACT GCA GTA TAC AAT GTA C-3' . Στη συνέχεια όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR , για την ενίσχυση του Ε2 γονιδίου ώστε στη συνέχεια να προσδιορίσουμε το φορτίο του ιού μέσω του γονιδίου αυτού. Όπως προαναφέραμε το Ε2 υφίσταται συχνά ρήξη σε περίπτωση ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου- ξενιστή. Στην περίπτωση αυτή θα υπολογίσουμε λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου με την ποσοτική PCR διότι οι εκκινητές λόγω της ρήξης δεν θα προσδεθούν στα σημεία που πρέπει.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μείγμα αυτό περιείχε : 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol , 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10× (Pac reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10Mm (dNTPs), 2.5 UPaq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50 μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Robocycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 20sec. 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.

5.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε6 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Με τη μέθοδο της απλής PCR ενισχύσαμε μέρος του Ε6 γονιδίου μεγέθους 352 βάσεων . Ο σκοπός της ενίσχυσης του Ε6 γονιδίου ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιού. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το εξής : 5'-GCA

CAG AGC TGC AAA CAA CT-3' (HPV 16 1) και (HPV 16 353) 5'- GGT CCA CCG ACC CCT TAT ATT-3' .

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μία ακόμη PCR για την ενίσχυση του E6 γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω εκκινητικά ζεύγη και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3μl DNA από κάθε δείγμα , 2μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol , 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X (Paq reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) , 2,5 U Paq DNA πολυμεράσης(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 στο θερμικό κυκλοποιητή Robocycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν όμοιες με αυτές που εφαρμόσαμε στην PCR για το γονίδιο E2.

5.6 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ Ε7 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Το E7 γονίδιο είναι το τελευταίο που πρέπει να ενισχύσουμε στην παρούσα εργασία. Και σε αυτή την περίπτωση ενισχύσαμε μέρος του γονιδίου μεγέθους 138 βάσεων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν οι εξής : (HPV16/700) 5' - CGG ACA GAG CCC ATT ACA ATA-3' και (HPV16/838) 5'-TGG GGC ACA CAA TTC CTA GT-3'.

Το πρωτόκολλο αυτής της PCR είναι όμοιο με τα παραπάνω που αναφέραμε για τα γονίδια E2 και E6. Το ίδιο ισχύει και για της συνθήκες της αντίδρασης. Την εφαρμόσαμε και αυτή για όλα τα δείγματα.

Σκοπός της ενίσχυσης και του E7 γονιδίου ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιού. Τα δύο τελευταία γονίδια , E6 και E7 αποτελούν σταθερές περιοχές του γονιδιώματος και αυτό έχει ως συνέπεια η μέτρησή τους να αντικατοπτρίζει τα ιϊκά αντίγραφα.

5.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Από το προϊόν κάθε PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 200V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK). Η παραπάνω διαδικασία έγινε και για τα τέσσερα προηγούμενα γονίδια E2, E6, E7 και GAPDH.

5.8 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΘΗΚΑΝ

Τα προϊόντα των αντιδράσεων των τεσσάρων PCR που πραγματοποιήθηκαν αντιπροσωπεύουν τμήματα των γονιδίων που ενισχύθηκαν ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε. Τα τμήματα αυτά του DNA που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR για να καταστούν ικανά να κλωνοποιηθούν τα επεξεργαστήκαμε έτσι ώστε να μπορούν να εισαχθούν σε φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια), επιτυχώς. Κατόπιν, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα (βακτήρια) τα οποία προηγουμένως είχαν επεξεργασθεί κατάλληλα με σκοπό να γίνουν δεκτικά προς τους φορείς και να καταστεί δυνατός ο τελικός μετασχηματισμός τους. Έπειτα, ακολούθησε καλλιέργεια και επώαση των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε συνθήκες κατάλληλες για την κλωνοποίησή τους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συλλογή των επιθυμητών αποικιών - κλώνων και η απομόνωση των φορέων από τα βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, για τον έλεγχο και την επιβεβαίωση της επιτυχίας της διαδικασίας εκτελούμε πέψη των πλασμιδιακών φορέων με ένζυμα περιορισμού.

AutoNested Go Taq PCR

- Το πρώτο βήμα στη διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν η επεξεργασία των τμημάτων DNA που είχαμε ενισχύσει με PCR με

σκοπό την εισαγωγή poly (A) μονόκλωνων άκρων στα 3' και 5' άκρα των ενισχυμένων τμημάτων. Τα μονόκλιωνα αυτά άκρα είναι συμπληρωματικά προς την πολυδύναμη θέση ένθεσης των πλασμιδιακών φορέων. Η εισαγωγή αυτή επιτυγχάνεται με την πραγματοποίηση μιας ειδικής AutoNested PCR που κάνει χρήση του ενζύμου Go Taq Flexi DNA polymerase Promega. Το ένζυμο αυτό προσθέτει poly (A) ουρές στα άκρα των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα με τελικό όγκο 50 μl. Το μείγμα σε κάθε σωληνάριο της PCR περιείχε : 2μl DNA που προέκυψε από την τελευταία αντίδραση PCR, 2 μl από το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών συγκέντρωσης 50pmol, 6 μl dNTPs συγκέντρωσης 10 mM, 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος Colorless GoTaq Flexi Buffer 5x , διάλυμα MgCl₂ συγκέντρωσης 25 mM, 1,25 units/tube ενζύμου GoTaq DNA πολυμεράση, απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50μl.

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

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

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

} 25 Κύκλοι

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

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 2μl H₂O (αντί των 2μl προϊόντος DNA) ελεύθερου από DNAses και RNAses. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης αξιολογήθηκαν

μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

5.8.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ AUTONESTED GO TAQ PCR ΑΠΟ ΤΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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

5.8.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

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

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

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

5.8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αναγκαία για τη διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν η παραγωγή δεκτικών κυττάρων ώστε να δεχθούν τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E. Coli DH5a, τα οποία τα επεξεργαστήκαμε με κατάλληλη χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο – CaCl₂).

Τα βακτηριακά κύτταρα τα συντηρούμε μέσα σε γλυκερόλη στους -80°C. Από το απόθεμα αυτό συλλέξαμε και μεταφέραμε υπό άσηπτες συνθήκες βακτηριακά κύτταρα σε 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολούθησε επώαση του θρεπτικού ζωμού για 16 ώρες (overnight) στους 37°C σε 210 στροφές / λεπτό. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50 ml θρεπτικού ζωμού LB Broth και ακολούθησε επώαση για δύο ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, για να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση του διαλύματος του ζωμού πραγματοποιήθηκαν τακτικές λήψεις 1ml από το ζωμό σε OD₆₀₀. Όταν τα βακτήρια βρεθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή σε επίπεδα οπτικής απορρόφησης A= 0,450 – 0,550, θα διακοπεί η κυτταρική τους ανάπτυξη. Για τη διακοπή της ανάπτυξης τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 min ώστε να αδρανοποιηθούν. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 4000 rpm για 10 min στους 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα που απέμεινε διαλύθηκε σε 10 ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C. Στο τέλος και αυτής της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται ξανά σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M (0,55g CaCl₂, Sigma, USA). Στο τελευταίο διάλυμα προσθέτουμε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 ml.

5.8.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στη συνέχεια θα πρέπει να μετασχηματίσουμε τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για την κάθε αλληλουχία μεταφέρουμε σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes), 200 μl από το απόθεμα των δεκτικών κυττάρων και 5μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Κάνουμε ήπια ανάδευση και τοποθετούμε τα μικροσωληνάρια στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, τα μεταφέρουμε σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec

ακριβώς και αμέσως μετά τοποθετούνται ξανά στον πάγο για δύο λεπτά (heat shock). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από τις οποίες είναι δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Εν συνεχεία, μεταφέρουμε όλη την ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα μικροσωληνάρια σε αντίστοιχα falcon που περιείχαν 800μl θρεπτικού ζωμού LB Broth. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα (επιπλέον κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων - “επούλωση”).

5.8.5 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

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

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

5.8.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Για να καταστεί δυνατή η αλληλούχιση των ενθεμάτων απαιτείται απομόνωση των φορέων κλωνοποίησης από τα βακτηριακά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε

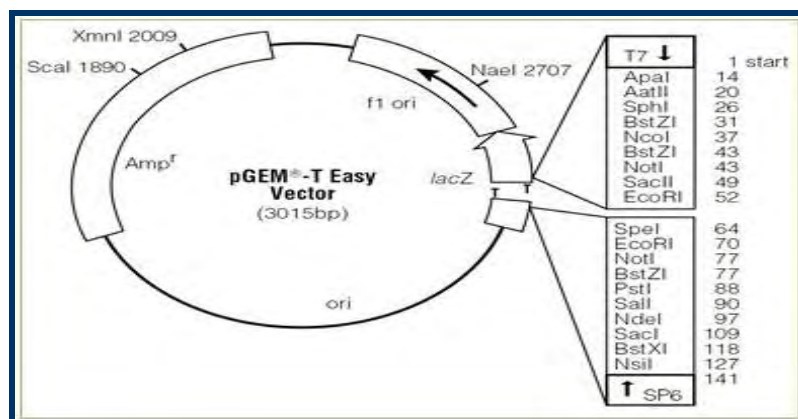
εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin® Plasmid extraction kit (Macherey-Nagel, Germany).

5.8.7 ΠΕΨΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

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

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

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



Η διαδικασία της κλωνοποίησης έλαβε χώρα και για τα τέσσερα γονίδια που αναφέραμε παραπάνω, E2 , E6 ,E7 και GAPDH. Με τον τρόπο αυτό λάβαμε τα τέσσερα γονίδια σε καθαρή μορφή για να συνεχίσουμε τη διαδικασία της κανονικοποίησης της real – time PCR.

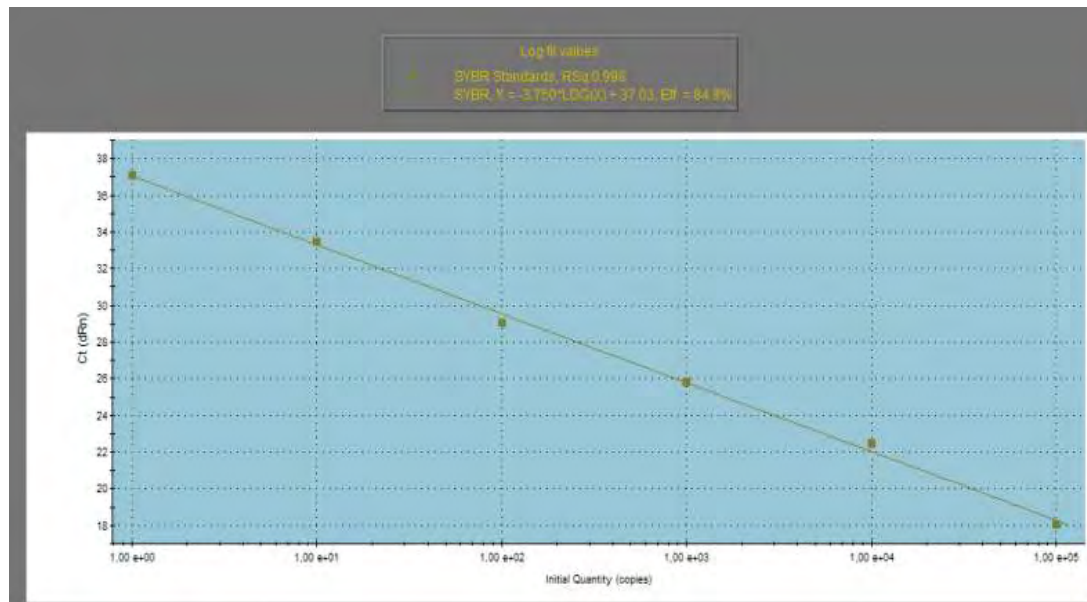
5.9 ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ REAL-TIME PCR

Η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια των πλασμιδίων που περιέχουν το γονίδιο GAPDH και της real - time PCR. Από την εκχύλιση του πλασμιδιακού φορέα απομονώθηκε ένας συγκεκριμένος όγκος πλασμιδίων και πραγματοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις με στόχο να κατασκευάσουμε την πρότυπη καμπύλη (Standard curve) της real time PCR . Στην συνέχεια όλες οι αραιώσεις υποβλήθηκαν σε real time PCR και η μικρότερη αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης επεξεργάστηκε περαιτέρω έτσι ώστε να εντοπίσουμε το ένα αντίγραφο του γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα η υποδεκαπλάσια αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης στην αντίδραση υποβλήθηκε σε διαδοχικές υποδιπλάσιες τώρα αραιώσεις (1/2, 1/4, 1/8, 1/16). Οι αραιώσεις αυτές υποβλήθηκαν ξανά σε real time PCR με στόχο να βρούμε την μέγιστη αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης. Η αραιώση αυτή θεωρήθηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα για το γονίδιο GAPDH θεωρήθηκε ότι το ένα αντίγραφο του γονιδίου εμπεριέχεται σε αραιώση $X 10^{-10}$. Με βάση την πληροφορία αυτή κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη στην real time PCR και προσδιορίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου GAPDH στα δείγματα που επεξεργάστηκαν στην παρούσα εργασία. Στην συνέχεια τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του κυτταρικού γονιδιώματος πάνω στην οποία θα προσδιοριστεί το υικό φορτίο με βάση τα γονίδια E2, E6 και E7. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση κυττάρων 100 κύτταρα/μl.

Η διαδικασία της real time PCR πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του εμπορικού σκευάσματος GoTaq q PCR Master Mix Promega. Το master mix της εμπορικής συσκευασίας περιέχει όλα τα συστατικά για την αντίδραση της PCR εκτός από το DNA , τους εκκινητές και το νερό. Το παραπάνω master mix περιέχει : χρωστική που προσδένεται σε δίκλωνο DNA , χρωστική αναφοράς CXR (carboxy – X- rhodamine) , GoTaq Hot Start Polymerase , $MgCl_2$, dNTPs και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό

διάλυμα. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25μl. Το DNA του δείγματος ήταν 3μl, τα εκκινητικά μόρια σε ποσότητα 2μl (το ζεύγος των εκκινητικών μορίων ήταν το αντίστοιχο με το γονίδιο που θέλαμε να μετρήσουμε) 10pmol, το master mix της αντίδρασης ήταν 12,5μl για το κάθε δείγμα και τέλος το H₂O ελεύθερο νουκλεασών 7,5μl. Το ζεύγος των εκκινητικών μορίων ήταν το εξής : GAPDH F (5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3') και GAPDH R (5'- TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3').

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR έλαβε χώρα στο θερμοκυκλοποιητή STRATAGENE. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής : αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 20sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 20sec και επιμήκυνσης στους 60°C για 30sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο melting curve από τους 60 - 95°C. Το τελευταίο αυτό στάδιο μας δείχνει αν το προϊόν που πήραμε είναι ειδικό, συγκρίνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 5.3 Πρότυπη καμπύλη γονιδίου GAPDH

5. 10 REAL- TIME PCR για E2, E6 και E7 ΓΟΝΙΔΙΑ

Για τα γονίδια αυτά εφαρμόστηκε η παραπάνω μεθοδολογία ώστε να δημιουργηθούν οι πρότυπες καμπύλες για τη Real-time PCR. Ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία των αραιώσεων με σκοπό να βρούμε τη μεγαλύτερη αραιώση που δίνει σήμα ενίσχυσης στην Real-time PCR με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω ενότητα. Στη συνέχεια με την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών για τα γονίδια E2, E6, E7 ξεχωριστά ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιγράφων των γονιδίων έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σε όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάσαμε στην παρούσα εργασία.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι για το E2 γονίδιο η μεγαλύτερη αραιώση που πήραμε σήμα ενίσχυσης ήταν $X10^{-6}$, για το E7 $X10^{-6}$ και για το E6 στην αραιώση $X10^{-9}$.

Η διαδικασία της real time PCR πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του εμπορικού σκευάσματος GoTaq q PCR Master Mix Promega. Το master mix της εμπορικής συσκευασίας περιέχει όλα τα συστατικά για την αντίδραση της PCR εκτός από το DNA, τους εκκινητές και το νερό. Το παραπάνω master mix περιέχει: χρωστική που προσδένεται σε δίκλωνο DNA, χρωστική αναφοράς CXR (carboxy-X-rhodamine), GoTaq Hot Start Polymerase, $MgCl_2$, dNTPs και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25μl. Το DNA του δείγματος ήταν 3μl, τα εκκινητικά μόρια σε ποσότητα 2μl (το ζεύγος των εκκινητικών μορίων ήταν το αντίστοιχο με το γονίδιο που θέλαμε να μετρήσουμε) 10pmol, το master mix της αντίδρασης ήταν 12,5μl για το κάθε δείγμα και τέλος το H_2O ελεύθερο νουκλεασών 7,5μl.

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR έλαβε χώρα στο θερμοκυκλοποιητή STRATAGENE. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: αποδιάταξη του DNA στους $95^{\circ}C$ για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους $95^{\circ}C$ για 20sec, υβριδοποίησης στους $60^{\circ}C$ για 20sec και επιμήκυνσης στους $60^{\circ}C$ για 30sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο melting curve ανάλυσης από τους $60 - 95^{\circ}C$. Το τελευταίο αυτό στάδιο μας δείχνει αν το προϊόν που πήραμε είναι ειδικό, συγκρίνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης για όλα τα δείγματα.

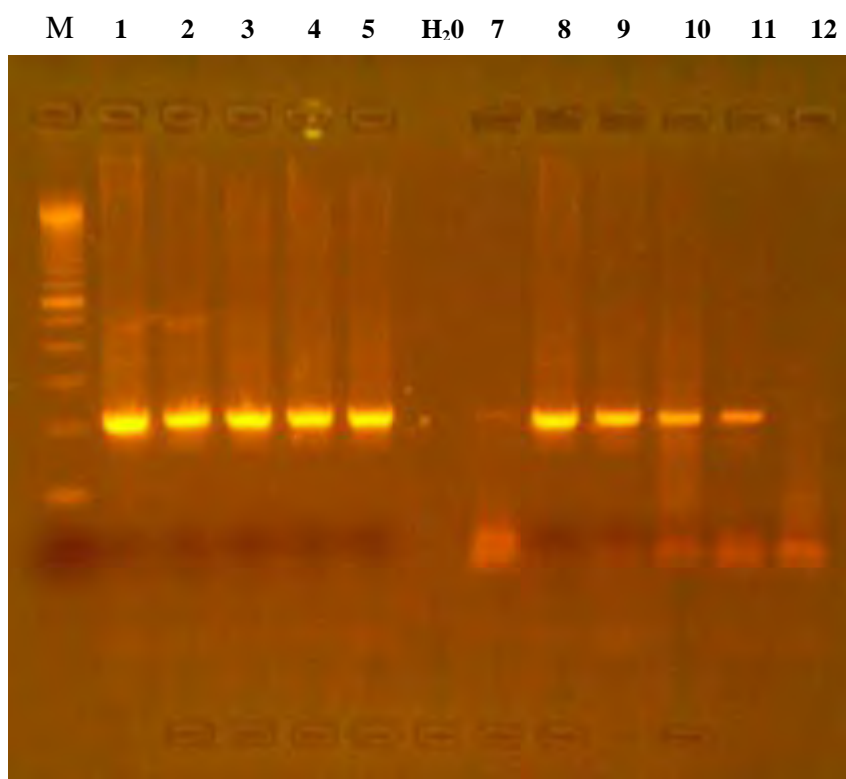
Γονίδιο	Εκκινητικά μόρια	Μέγεθος προϊόντος PCR
GAPDH F	5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3'	250 bp
GAPDH R	5'- TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3'	250 bp
E2 F13	5'- CTA AGT TGT TGC ACA GAG ACT CA- 3'	190 bp
E2 R13	5'- GAC GAC ACT GCA GTA TAC AAT GTA C-3'	190 bp
E6 1	5'-GCA CAG AGC TGC AAA CAA CT-3'	352 bp
E6 353	5'- GGT CCA CCG ACC CCT TAT ATT-3'	352 bp
E7 700	5'- CGG ACA GAG CCC ATT ACA ATA-3'	138 bp
E7 838	5'- TGG GGC ACA CAA TTC CTA GT 3'	138 bp

Πίνακας 5.2 Εκκινητικά μόρια για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Real –time PCR

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αποτελέσματα PCR για το γονίδιο GAPDH

Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH δέκα (10) κλινικών δειγμάτων . Όλα τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν σε αυτή τη διαδικασία για τον έλεγχο της ύπαρξης DNA καθώς επίσης και για τον έλεγχο της ποιότητας κυτταρικού DNA.



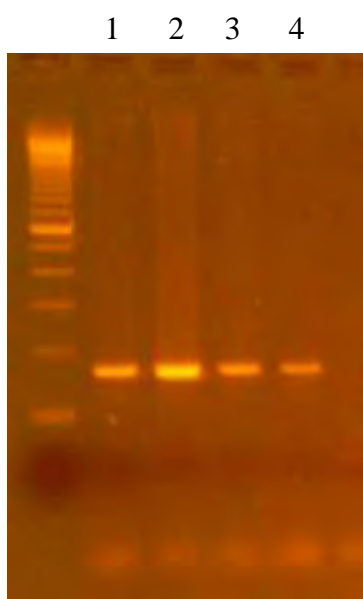
Εικόνα 6.1 Αποτελέσματα απλής PCR για το γονίδιο GAPDH. Στις θέσεις 1-5 και 7-11 παρουσιάζονται τα θετικά δείγματα, ενώ στις θέσεις 6 και 12 ο αρνητικός μάρτυρας.

Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι τα κλινικά δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς όλες οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο σωστό ύψος των 250 βάσεων (bp) σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους των 100bp της εταιρίας Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους της Invitrogen δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Στις θέσεις 1-5 και 7-11 έχουν ηλεκτροφορηθεί

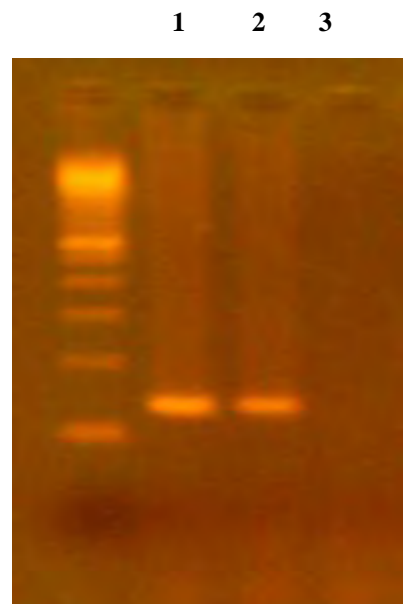
κλινικά δείγματα , ενώ στις θέσεις 6 και 12 είναι ο αρνητικός μάρτυρας που είναι το H₂O. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

6.2 PCR ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ E2 , E6 ΚΑΙ E7

Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν έδωσαν θετικό σήμα ενίσχυσης για το γονίδιο GAPDH. Επιπλέον, όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία ενισχύθηκαν για τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων E2 (190 bp), E6 (352bp) και E7 (197bp). Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έδωσαν θετικό σήμα ενίσχυσης και για τους τρεις γενετικούς τόπους με την μέθοδο της PCR. Στις παρακάτω φωτογραφίες παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από την ενίσχυση των τριών γονιδίων.

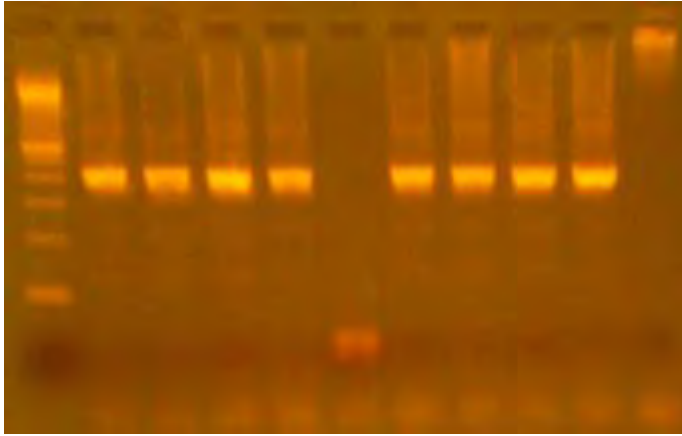


Εικόνα 6.2 Αποτελέσματα PCR του γονιδίου E2. Θετικά δείγματα 1-4 , Δείγμα 5 αρνητικός μάρτυρας (H₂O)



Εικόνα 6.3 Αποτελέσματα PCR για το γονίδιο E7. Θέσεις 1-2 θετικά δείγματα

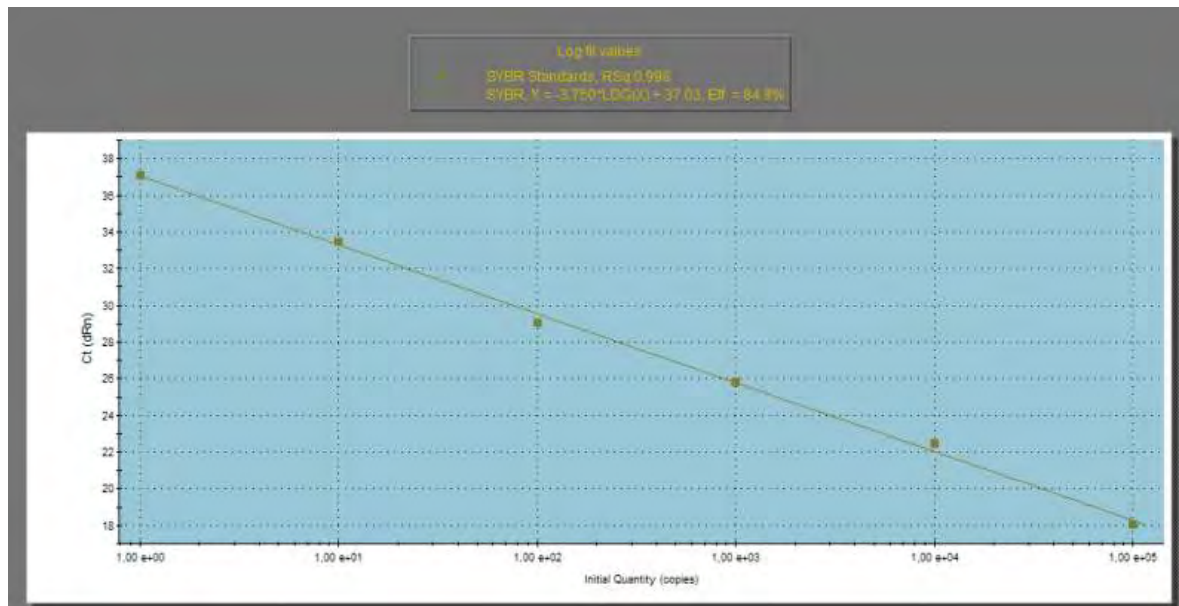
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



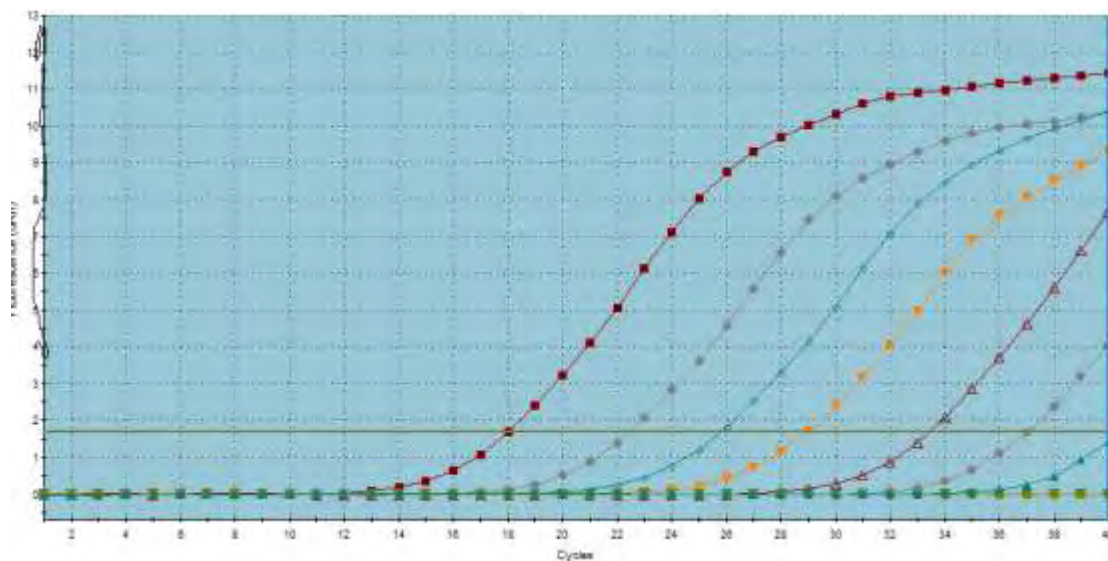
Εικόνα 6.3 Αποτελέσματα PCR για το E6 γονίδιο. Θετικά δείγματα 1-4 και 6-9. Θέση 5 αρνητικός μάρτυρας.

6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GAPDH

Με τη διαδικασία των διαδοχικών 10X αραιώσεων που περιγράφηκε παραπάνω προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης κατά την real time PCR και ορίστηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου/μλ. Με βάση την πληροφορία αυτή οι αραιώσεις των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της real time PCR για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Η πρότυπη καμπύλη παρουσιάζεται στην εικόνα 6.5. Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 6.6) παρουσιάζεται η γραφική παράσταση (amplification plot) όπως προέκυψε από την ενίσχυση των διαδοχικών 10X αραιώσεων των GAPDH πλασμιδίων. Στον άξονα χ έχουν τοποθετηθεί τα αντίγραφα των γονιδίων, που εδώ αντικατοπτρίζουν τον αριθμό των κυττάρων, και στον άξονα ψ τοποθετήθηκε ο κύκλος που δίνει σήμα η PCR. Από την γραφική παράσταση είδαμε ότι η τελευταία αραιώση 10^{-10} είναι αυτή που δίνει το τελευταίο σήμα ενίσχυσης (ct=37, κύκλο). Από τις υποδιπλάσιες αραιώσεις δεν είχαμε σήμα ενίσχυσης μετά την εφαρμογή της real time PCR. Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αραιώση 10^{-10} περιέχει 1 αντίγραφο γονιδίου GAPDH/μλ. Στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή της real time PCR σε όλα τα κλινικά δείγματα που μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τις διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων 10X για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου με βάση τα γονίδια E2, E6 και E7 έγινε σε τελική συγκέντρωση κυττάρων 100 αντίγραφα/μλ.

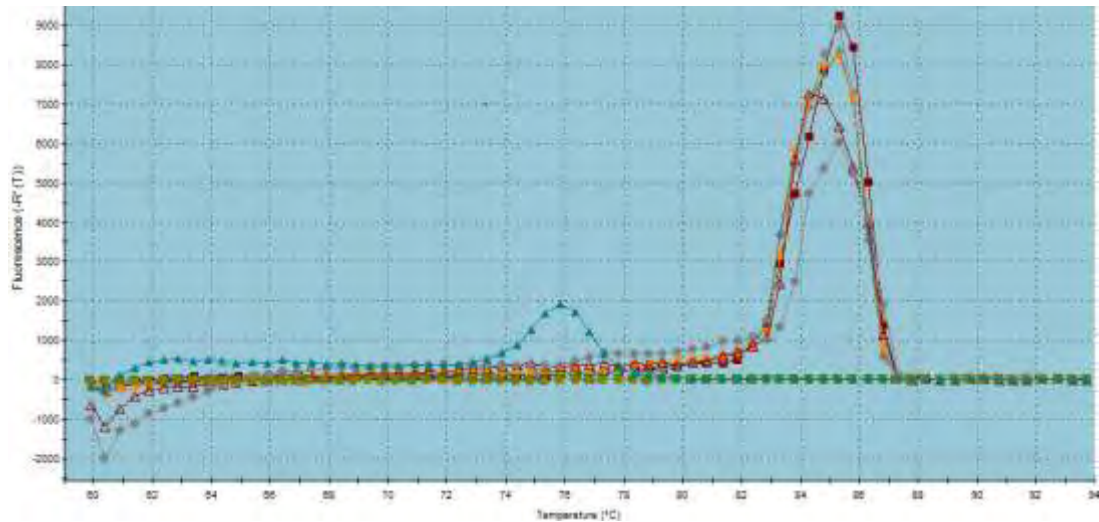


Εικόνα 6.5 Πρότυπη καμπύλη γονιδίου GAPDH



Εικόνα 6.6 Καμπύλες ενίσχυσης του προϊόντος (amplification plots).

Τέλος, στην καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve) στο κατωτέρω σχήμα της εικόνας 6.7 διαπιστώνουμε την ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης. Όταν μία αντίδραση PCR μας δίνει μόνο τα ειδικά προϊόντα που αναζητούμε τότε όλα τα τελευταία αποδιατάσσονται, σύμφωνα με τις συνθήκες της αντίδρασης, σε μία προκαθορισμένη θερμοκρασία. Κατά συνέπεια όλες οι καμπύλες αποδιάταξης τοποθετούνται γύρω από την ίδια θερμοκρασία, όπως φαίνεται και στο σχήμα της εικόνας 6.7.



Εικόνα 6.7 Καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων (dissociation curve)

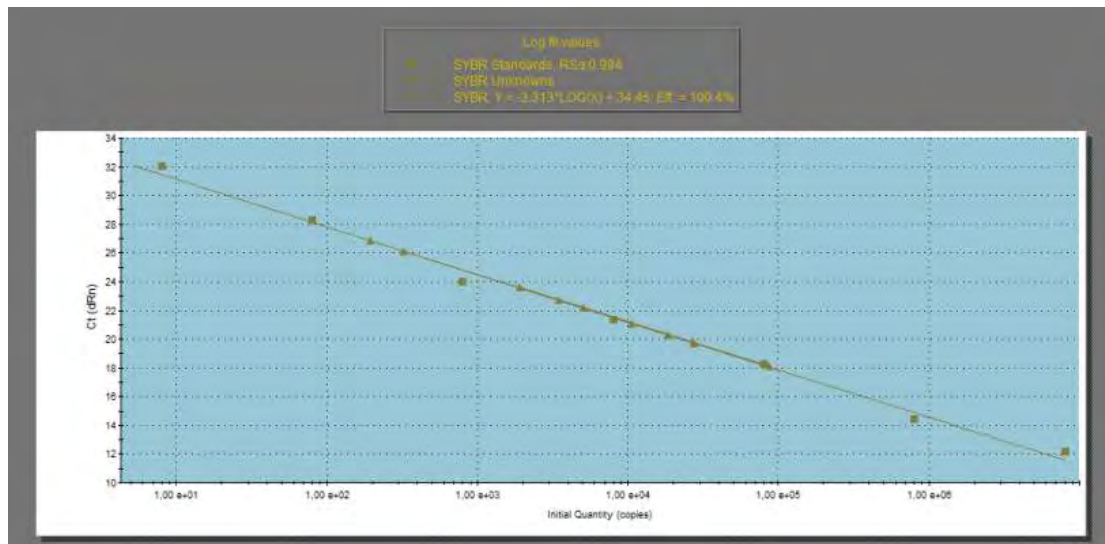
Η μέτρηση του γονιδίου GAPDH για τα δείγματα που εξετάσαμε έδωσε τα αποτελέσματα που βλέπουμε στον κατωτέρω πίνακα. Με βάση αυτά, όλα τα δείγματα κανονοποιήθηκαν στα 100 κύτταρα στον προς εξέταση όγκο.

Δείγμα	Γονίδιο GAPDH	Δείγμα	Γονίδιο GAPDH	Δείγμα	Γονίδιο GAPDH	Δείγμα	Γονίδιο GAPDH
ΠΝΛ 2	43,57 /3μl	ΠΝΛ 11	239,9	ΑΤΤ 18	43	2279	85
ΠΝΛ 4	37,88	ΠΝΛ 15	77,02	ΑΤΤ 21	190	ΑΤΤ 6	130
ΠΝΛ 5	436,7	ΠΝΛ 16	423,4	ΑΤΤ 22	110	ΑΤΤ 45	170
ΠΝΛ 6	351	ΑΤΤ 8	699	ΑΤΤ 24	211	ΑΤΤ 51	1894
ΠΝΛ 7	442	ΑΤΤ 9	750	796	15	ΑΤΤ 78	29
ΠΝΛ 8	17,83	ΑΤΤ 10	83	858	24	ΑΤΤ 91	360
ΠΝΛ 10	360,1	ΑΤΤ 12	179	868	77	ΑΤΤ 98	103

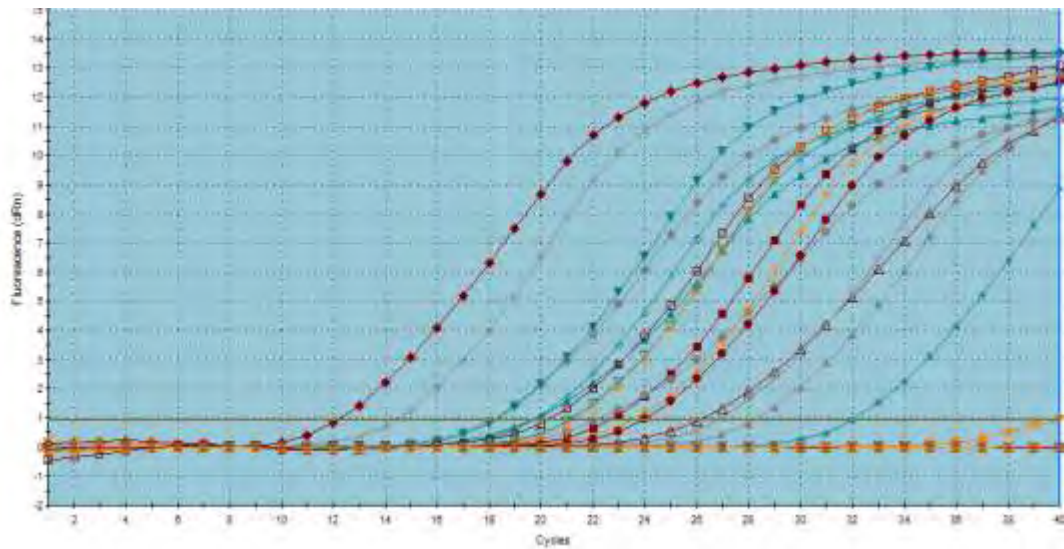
Πίνακας 6.1 Αποτελέσματα Real-time PCR για το γονίδιο GAPDH

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ E2, E6, E7

Η διαδικασία για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με βάση το γονίδιο E2 έγινε όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Με βάση την πρότυπη καμπύλη και σε συγκέντρωση 100αντίγραφα κυττάρων/μl ακολούθησε η real time PCR για τον προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου με βάση την «μεταβλητή» περιοχή E2. Επιπλέον ακολούθησε κατασκευή πρότυπης καμπύλης και προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου με βάση τα «σταθερά» γονίδια E6 και E7 αντίστοιχα. Σε τέσσερα κλινικά δείγματα προσδιορίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου E7 έτσι ώστε να διαπιστωθεί η συμφωνία των τιμών αυτών με τον αριθμό των αντιγράφων του E6 γονιδίου. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτικά η πρότυπη καμπύλη με για την ενίσχυση του E6 γονιδίου πάνω στην οποία τοποθετούνται οι τιμές των αντιγράφων του γονιδίου E6 για τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν. Με βάση τις πληροφορίες αυτές προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του HPV16 φορτίου για τα γονίδια E2, E6 και E7 .



Εικόνα 6.8 Πρότυπη καμπύλη του γονιδίου E6.



Εικόνα 6.9 Καμπύλες ενίσχυσης προϊόντων γονιδίου E6.

6.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ E2/E6 ΚΑΙ E2/E7

Στον παρακάτω πίνακα βλέπουμε συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που πήραμε από τη real-time PCR για τα αντίγραφα των γονιδίων E2, E6, E7 για κάθε κλινικό δείγμα ξεχωριστά. Στη συνέχεια με βάση το γεγονός ότι η συνηθέστερη θέση ρήξης για την ενσωμάτωση του ιού είναι η περιοχή του γονιδίου E2 ενώ τα γονίδια E6 και E7 παραμένουν άρρηκτα κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης, ακολούθησε ο προσδιορισμός του λόγου των τιμών E2/E6 και E2/E7 σε όλα τα δείγματα.

	GAPDH	E2	E6	E7	Τραχηλική αλλοίωση	E2/E6	E2/E7
ATT8	699	4,6	20	-	LG	0,24	-
ATT9	750	2	21	50	HG	0,095	0,04
ATT10	83	3	40	-	LG	0,075	-
ATT12	179	15	138	-	LG	0,1	-
ATT18	43	2	60	44	HG	0,03	0,04
ATT21	190	1,4	5	-	LG	0,28	-
ATT22	110	14,7	492	-	LG	0,29	-
ATT24	211	1,6	12	16	LG	0,13	0,1
796	15	12,5	13	-	LG	0,96	-
858	24	21,5	28	-	LG	0,76	-
868	77	190	3063	-	LG	0,06	-
2279	85	31,5	41	-	LG	0,67	-
ATT6	130	45,4	46	-	LG	0,98	-
ATT45	170	5	39	-	LG	0,12	-
ATT51	1894	16,2	415	-	LG	0,039	-
ATT78	29	10	11	-	LG	0,9	-
ATT91	360	0,2	2	-	LG	0,1	-
ATT98	103	1	22	-	LG	0,045	-
ΠΝΛ 2	43,57	122,3	1895	-	δυσπλασία τραχήλου/ CIN1	0,06	-
ΠΝΛ 4	37,88	169,5	5082	-	CIN III	0,03	-
ΠΝΛ 5	436,7	96,2	3481	-	CIN III	0,027	-
ΠΝΛ 6	351	312,9	18260	-	CINII-CIN III	0,017	-
ΠΝΛ 7	442	10	10690	402	ca in situ	0	0,024
ΠΝΛ 8	17,83	27,6	325	-	CIN II	0,08	-
ΠΝΛ 10	360,1	32,3	719	-	CIN III	0,044	-
ΠΝΛ 11	239,9	512,8	27370	-	CIN III	0,018	-
ΠΝΛ 15	77,02	441,1	27370	-	CIN I CINIII	0,016	-
ΠΝΛ 16	423,4	582,7	86370	-	Inv. Cancer	0,006	-

Πίνακας 6.2 Αποτελέσματα Real-time PCR των κλινικών δειγμάτων

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι βλάβες με σοβαρού βαθμού δυσπλασία εμφανίζουν λόγο E2/E6 κοντά στο μηδέν. Αντίθετα στις περιπτώσεις με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας ο λόγος παρουσιάζει τιμές πάνω από 0,1. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι υπάρχουν και περιπτώσεις με υψηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις που όμως παρουσιάζουν τιμή του λόγου E2/E6 μεγαλύτερη από 0,1. Στις περιπτώσεις αυτές ο ιός βρίσκεται και στις δύο μορφές, επισωματική και ενσωματωμένη ή μπορεί να πρόκειται και για μικτή λοίμωξη από περισσότερους από έναν ιό. Στην προηγούμενη περίπτωση μπορεί να έχουμε κάποιο σπάνιο πολυμορφισμό στο E2 γονίδιο που εμποδίζει τους εκκινητές να προσδεθούν πλήρως και κατά συνέπεια δεν παίρνουμε σήμα ενίσχυσης από αυτό το γονίδιο.

Από τις παραπάνω τιμές προκύπτει ότι στις δύο περιπτώσεις καρκίνου (PINΛ7, PINΛ16) ο λόγος E2/E6=0. Αντίθετα στις δύο περιπτώσεις χαμηλής αλλοίωσης ΑΤΤ6, ΑΤΤ78 ο λόγος E2/E6 ισούται με 0,9 και 0,98 αντίστοιχα. Επιπλέον σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα χαμηλής και υψηλής αλλοίωσης ο λόγος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,016-0,76. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά βλέπουμε ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός αλλοίωσης τόσο μειώνεται ο λόγος E2/E6, ενώ σε περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου ισούται με 0. Επιπλέον χαμηλές τιμές του λόγου E2/E6 παρατηρήθηκαν και σε πέντε δείγματα χαμηλής αλλοίωσης (ΑΤΤ10, ΑΤΤ18, ΑΤΤ51, ΑΤΤ98 και 868). Στις περιπτώσεις αυτές ο ιός ίσως να εντοπίζεται και στις δύο μορφές εντός του κυττάρου ξενιστή αποτελώντας ένδειξη για την εξέλιξη της χαμηλής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση υψηλότερου βαθμού.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όταν ο λόγος των τιμών E2/E6=0 ο ιός βρίσκεται μόνο σε ενσωματωμένη μορφή. Πιο συγκεκριμένα θεωρήσαμε ένδειξη ενσωμάτωσης όταν δεν ενισχύεται το γονίδιο E2 αλλά το δείγμα ήταν θετικό για την ενίσχυση του GAPDH και του E6 γονιδίου. Επιπλέον σε τιμές 0,016-0,76 ο ιός βρίσκεται και στις δύο μορφές ενώ σε τιμές κοντά στο 1 ο ιός βρίσκεται μόνο σε επισωματική μορφή (E2=E6). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι καθώς αυξάνεται ο βαθμός δυσπλασίας ο ιός βρίσκεται με μεγαλύτερη συχνότητα ενσωματωμένος εντός του γονιδιώματος του κυττάρου ξενιστή. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 σχετίζεται με την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε διηθητικό καρκίνο μπορούμε να πούμε ότι ο λόγος E2/E6 και E2/E7 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο μοριακό δείκτη για την πρόγνωση της εξέλιξης της αλλοίωσης από CINI, II, III και διηθητικό καρκίνο.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HPV-16 είναι ο συχνότερα απαντώμενος τύπος HPV μεταξύ γυναικών που παρουσιάζουν σοβαρού βαθμού τραχηλική δυσπλασία (zur Hausen et al 1991). Οι γυναίκες που έχουν μολυνθεί με τον HPV- 16 παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN cervical intraepithelial neoplasias) (Schiffman et al 1993). Λόγω της στενής συσχέτισης της μόλυνσης με τον ιό και της καρκινογένεσης η ανίχνευση του HPV DNA καθίσταται επιβεβλημένη ακόμα και σαν εξέταση ελέγχου στον πληθυσμό (screening test) σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση. Σύμφωνα με μελέτες το ιϊκό φορτίο αυξάνεται σημαντικά στις βλάβες υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας σε σχέση με τις χαμηλού βαθμού βλάβες (Cricca et al 2007). Θα πρέπει εδώ να αναφέρουμε ότι η ενσωμάτωση του ιού συμβαίνει συνήθως μέσω της ρήξης του γονιδίου E2. Κατά συνέπεια η πρωτεΐνη E2 που δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7 παύει να δρα οπότε έχουμε την υπερέκφραση των δύο αυτών ογκογονιδίων. Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων στα κύτταρα που ο ιός έχει ενσωματωθεί τα οδηγεί σε ένα επιλεκτικό αναπτυξιακό πλεονέκτημα. Η ογκογόνος αυτή έκφραση του ιού ξεκινά από τα αρχικά στάδια της δυσπλασίας προκαλεί γενωμική αστάθεια και βοηθά περαιτέρω την ενσωμάτωση του HPV-16. Το γονίδιο E2 καθίσταται με αυτόν τον τρόπο μεταβλητό, αφού διαρρηγνύεται κατά την ενσωμάτωση του ιού, και παρατηρείται διαφορά στο φορτίο του ιού και στην ποσότητα του E2 γονιδίου. Αντίθετα, τα γονίδια E6 και E7 αποτελούν σταθερές περιοχές του γονιδιώματος , αφού παραμένουν άρρηκτες κατά την ενσωμάτωση του ιού και κατά συνέπεια το ποσό τους αντικατοπτρίζει και το φορτίο του ιού.

Με την εφαρμογή PCR για τον εντοπισμό θέσεων ρήξης εντός του E2 γονιδίου δεν μπορούμε σε όλες τις περιπτώσεις να εκτιμήσουμε την μορφή του γονιδιώματος του ιού και την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου. Χρειαζόμαστε πιο ευαίσθητους μοριακούς δείκτες για να εντοπίζουμε με ακρίβεια την μορφή του γονιδιώματος του HPV16 (Cricca et al 2007). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αναπτύξουμε μια real- time PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων E2, E6 και E7 του HPV- 16. Ο προσδιορισμός των ιϊκών αντιγράφων με βάση τα γονίδια E2 E6 και E7 και ο προσδιορισμός του λόγου των τιμών E2/E6, E2/E7 μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την μορφή του γονιδιώματος του ιού σε διάφορες μορφές ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας. Για τον σκοπό αυτό εξετάσαμε εικοσιοκτώ (28) κλινικά δείγματα υψηλού

και χαμηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις, στα οποία εφαρμόστηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των γονιδίων E2, E6 και E7. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε προσδένονταν σε συντηρημένες περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων. Το τελευταίο είναι σημαντικό λόγω του πολυμορφισμού του γονιδιώματος του HPV-16 (Azizi et al 2008).

Σε δύο από τα κλινικά δείγματα που εξετάσαμε και ιστολογικά χαρακτηρίστηκαν σαν καρκίνος ο λόγος $E2/E6 = 0$ (μηδέν) . Στις περιπτώσεις αυτές υπάρχει αποκλειστικά και μόνο η ενσωματωμένη μορφή του ιού. Σε δύο περιπτώσεις χαμηλής αλλοίωσης στα δείγματα ATT6 και ATT78 ο λόγος $E2/E6$ είναι ίσος με 0,9 και 0,98 αντίστοιχα. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα χαμηλής και υψηλής αλλοίωσης ο λόγος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,016-0,76. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά βλέπουμε ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός της τραχηλικής αλλοίωσης τόσο μειώνεται ο λόγος $E2/E6$ μέχρι που καταλήγει να ισούται με μηδέν στις περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου. Υπάρχουν και περιπτώσεις με χαμηλή τιμή του λόγου $E2/E6$ στα δείγματα ATT10, ATT18, ATT51, ATT98 και 868. Στα πέντε αυτά δείγματα παρατηρείται χαμηλού βαθμού αλλοίωση παρά το γεγονός ότι ο λόγος είναι χαμηλός. Στις περιπτώσεις αυτές ο ιός ίσως να εντοπίζεται και στις δύο μορφές, επισωματική και ενσωματωμένη.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όταν ο λόγος $E2/E6$ έχει τιμή ίση με το μηδέν, ο ιός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή. Σε τιμές του λόγου $E2/E6$ από 0,1-0,8 θεωρήσαμε ότι ο ιός βρίσκεται και στις δύο μορφές ,επισωματική και ενσωματωμένη. Τέλος όταν ο λόγος $E2/E6$ είναι ίσος με τη μονάδα τότε θεωρούμε ότι $E2=E6$ και άρα ο ιός βρίσκεται μόνο σε επισωματική μορφή. Σε τέσσερα δείγματα από τα εικοσιοκτώ μετρήσαμε την ποσότητα του γονιδίου E7. Τα δείγματα αυτά ήταν ΠΝΛ 7, ATT9, ATT18 ,ATT24. Στη συνέχεια υπολογίσαμε το λόγο $E2/E7$ που ήταν 0,024, 0,04,0,04 και 0,1 αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές συμπίπτουν με τις τιμές του λόγου $E2/E6$ για τα ίδια δείγματα και έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και οι δύο λόγοι δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Βάση όμως της τρέχουσας βιβλιογραφίας , που χρησιμοποιήσαμε, τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα μας τα στηρίξαμε στο λόγο $E2/E6$.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 σχετίζεται με την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε διηθητικό καρκίνο μπορούμε να πούμε ότι ο λόγος $E2/E6$ και $E2/E7$ θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο μοριακό δείκτη για την πρόγνωση της εξέλιξης της αλλοίωσης από CINI, II, III και διηθητικό καρκίνο. Εκτός λοιπόν από τους κλασσικούς δείκτες που χρησιμοποιούμε για τη διάγνωση της HPV

λοιμώξης , όπως είναι η απλή ανίχνευση της παρουσίας του ιού, η μέτρηση του ιικού φορτίου και η τυποποίηση του ιού , θα μπορούσε ο δείκτης της ενσωμάτωσης όπως αυτός εκφράζεται μέσω του λόγου E2/E6 να αποτελέσει έναν αξιόπιστο μοριακό δείκτη κυρίως για την πρόγνωση και την εξέλιξη της νόσου.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Antonsson A, McMillan NA, 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM, 2006 . Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer *J Clin Microbiol.*(5):1755-62.
- Artandi SE, Attardi LD, 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*(3):881-90.
- Baker T.S., Newcomb,W.W., Olson,N.H., Cowser,L.M., Olson,C. and Brown,J.C. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60:, 1445–1456.
- Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R, 1991. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol.* 12):6671-6.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT, 1991. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential *J Virol.* (1):292-8.
- 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.
- Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 8:1277-1286.
- 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
- Bosch, FX 1995.Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst;* 87:796-802.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes *EMBO J.*(22):5451-9.
- Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18:2449-2458.

- Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen, 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virology* 4: 3.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT, 2004 Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol.* (2):751-7.
- 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.
- Cole ST, Danos O., 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol.* 4):599-608.
- Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel., 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67:6170-6178.
- Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG , 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* (5):275-82.
- Couturier J., Sastre-Garau X., Schneider-Maunoury S., Labib A., Orth G.1991 Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J. Virol.*, 65: 4534-4538, 1991.
- Monica Crica, Simona Ventruoli, Elisa Leo, Silvano Costa, Monica Musiani, Marialuisa Zerbini. (2009) Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods* 158 180-183.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT., 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol.* (1):142-50.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hauzen H., 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27.
- 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.
- Von Knebel Doeberitz, M.,Bauknecht, T.,Bartsch, D., and Zur Hauzen, H. 1991.Influence of chromosomal inegrationon glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88: 1411-1415.
- Doorbar J, 2006 Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541).
- 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.
- Dyson N. Guida P, Münger K, Harlow E. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins *J Virol.* Dec;66(12):6893-902.
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937.
- 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.
- Ferlay, J., F. Bray, P. Pisani, and D. M. Parkin., 2001. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC Press, Lyon, France.
- Fields, B. N., D. Knipe, and P. M. Howley (ed.), 1996. *Fields virology*, 3rd ed., p. 2060. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* (8):4818-26.
- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. 2002 .Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* (19):10009-14.

- Francis DA, Schmid SI, Howley PM, 2000. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol.*(6):2679-86.
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090-2100.
- Howley P.M, 1996 *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication.* Raven Press, New York, NY.
- Gillison, 2001. *J. National Cancer inst.*
- 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.
- Ham J, Steger G, Yaniv M., 1994. Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.*(1):147-57.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT, 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*(12):3905-10.
- 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.
- Heise A., 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* (10):8-19.
- Herrick J, Conti C, Teissier S, et al.2006. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65.
- 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.
- Howley, P. M., 1996. *Papillomaviridae: the viruses and their replication*, p. 947-978. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.). *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley., 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10:4129-4135.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al.1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59.

- Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall., 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82.
- Ko, L., and C. Prives. ,1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072.
- Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Itoh, M. Yutsudo, H. Ariga, and M. Inoue. ,2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28:669-677.
- 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.
- Lehn H., Villa L. L., Marziona F., Hilgarth M., Hillemans H. G., Sauer G. 1988. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J. Gen. Virol.*, 69: 187-196.
- Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D., 2004. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol.* (3):478-83.
- 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.
- Longworth, M. S., and L. A. Laimins., 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541.
- Mahdavi A, Monk BJ. ,2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.
- Munger, K., B. Werness, N. Dyson, W. Phelps, E. Harlow, and P. Howley., 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099-4105.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Pfister, H., 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 52–56.
- 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.
- 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.
- Romanczuk H, Thierry F, Howley PM, 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol.* Jun;64(6):2849-59.
- Shafti-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.* (24):13125-35.
- 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.
- 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.
- Smotkin D and F O Wettstein, 1986 Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(13): 4680–4684.
- Sotlar K, 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.
- 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.
- 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.

- Tan SH, Baker CC, Stükel 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.
- Tan SH, Gloss B, Bernard HU, 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.*(2):251-6.
- 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.
- 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.
- Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi., 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749.
- Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V., 1995. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(9):3687-91.
- 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
- 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.
- 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.
- Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
- Zur Hausen, H, 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.*1288(2):F55-78.
- Zur Hausen, H, 2000 *J. National Cancer inst.*
- Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.
- Leonora Casas¹, Silvia C. Galvan^{1,2}, Rosa M. Ordoñez¹, Nora Lopez^{1,3}, Miriam Guido and Jaime Berumen,1999. Asian-american variants of human

papillomavirus type 16 have extensive mutations in the *e2* gene and are highly amplified in cervical carcinomas

- Monica Cricca a, Antonio Maria Morselli-Labate b, Simona Venturoli a, Simone Ambretti a, Giovanna Angela Gentilomi a, Giorgio Gallinella a, Silvano Costa c, Monica Musiani a, Marialuisa Zerbini 2007. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions a Department of Clinical and Experimental Medicine, Microbiology Section, University of Bologna, Italy.
- Burd EM . 2003. Human papilomavirus and cervical cancer. *Clin.Microbiol.Rev.*16, pp. 1-17.
- Meisels A. 1983. The story of a cell : the George N. Papanicolaou Award Lecture 23. *Acta Cytol.* 27, pp. 584-596.
- Swan D., Tucker RA , Tortolero-Luna G., Mitchell MF, Wideroff L., Unger ER et al. 1999. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin.Microbiol.* 37,pp. 1030-1034.
- Jo L. K. Cheung, Keith W.K. Lo, Tak-Hong Cheung, Julian W.Tang, and Paul K. S. Chan.2006. Viral load, E2 gene disruption status and lineage of Human Papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *The Journal of Infectious Diseases* 194: 1706-12.
- Michelle S. Longworth and Laimonis A. Laimins ,2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ,p. 362-372.
- Gaëlle A.V. Boulet, Ina H. Benoy, Christophe E. Depuydt, et al.2009. Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ³² in a Liquid-Based Cytology Setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2992-2999.

