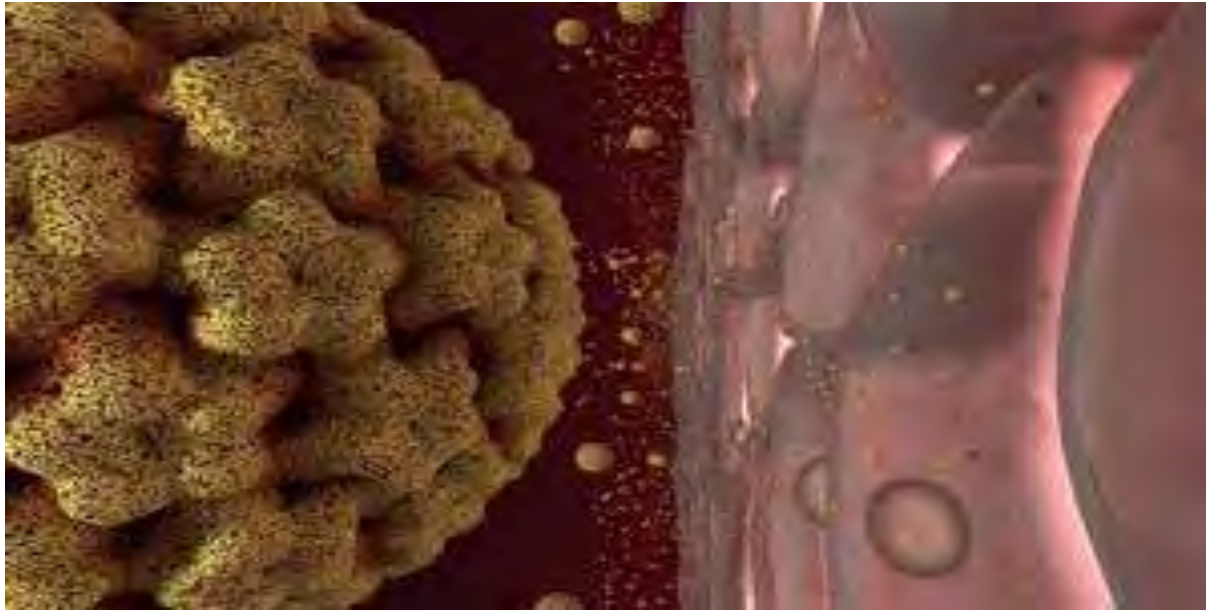




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

Φυλογενετική ανάλυση HPV-16 κλινικών στελεχών στη γενωμική περιοχή E4. Μεταλλάξεις στην ανωτέρω περιοχή συνδέονται με τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων; Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη συνδέονται περισσότερο με τις νεοπλασίες;



Μαρίνης Ανδρέας

Λάρισα 2012

Φυλογενετική ανάλυση HPV-16 κλινικών στελεχών στη γενωμική περιοχή E4. Μεταλλάξεις στην ανωτέρω περιοχή συνδέονται με τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων; Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη συνδέονται περισσότερο με τις νεοπλασίες;

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης - Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας.

Μόσιαλος Δημήτριος - Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας.

Κομιώτης Δημήτριος - Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας.

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Προλεγόμενα

Αποτελεί κομμάτι της φύσης του ανθρώπου να θέτει ερωτήματα ακόμη και για το πιο απλό των πραγμάτων που τον περιστοιχίζουν. Και το Σύμπαν χαίρεται να μας βάζει ολοένα και πιο δύσκολα αινίγματα, κάθε φορά που λύνουμε ένα έρχεται ένα άλλο δυσκολότερο και πολυπλοκότερο να πάρει τη θέση του. Εμείς όμως, δεν λυγίζουμε στιγμή. Το μόνο που αναζητάμε σαν πεισματάρικα νήπια μέσα στο πέρασμα των γενεών είναι ένα: η αλήθεια.

Ο καθένας ψάχνει να βιώσει, να αισθανθεί, να αφογκραστεί την αλήθεια χρησιμοποιώντας και διαφορετικό μέσο. Άλλος ψάχνει μέσα από τη θρησκεία, άλλος μέσα από το μεταφυσικό, άλλος μέσα από την επιστήμη. Το μονοπάτι της επιστήμης και του ορθολογισμού που επέλεξα και διαβαίνω τόσα χρόνια είναι δύσβατο και κακοτράχαλο. Είναι εύκολο να δελεαστείς. Να περάσεις στις διαδρομές της στείρας αποστήθισης και της εκπαίδευσης, ξεχνώντας το ιδανικό της παιδείας. Προσπάθησα και προσπαθώ να μείνω ακέραιος. Λίγοι τα έχουν καταφέρει. Οι υπόλοιποι χάθηκαν και μαζί έχασαν και την ουσία και ας τους διέπει μία ακατάσχετη κομπορρημοσύνη περί βαθμολογιών, θέσεων, κατορθωμάτων.

Όλοι εμείς οι πνευματικοί συνοδοιπόροι στον ειδικότερο τομέα των βιοεπιστημών, όπως και οι υπόλοιποι ομοϊδεάτες που δραστηριοποιούνται σε άλλους χώρους, έχουμε ως καθήκον και ως υποχρέωση να ενισχύσουμε τη γνώση που μας μεταλαμπαδεύτηκε από τις προηγούμενες γενεές και τώρα σιγοκαίει στο ανήσυχό μας κρανίο. Πρέπει να φουντώσουμε αυτή τη φωτιά μέσα από την επιστημονική μας έρευνα και να την παραδώσουμε δυνατότερη και πιο ζεστή στις επόμενες γενιές που θα μας διαδεχτούν. Και όλα αυτά με έναν απώτερο σκοπό, πέρα από την ικανοποίηση της περιέργειας που μας χαρακτηρίζει ως είδος, την εξύψωση της ανθρώπινης φύσης σε ανώτερες σφαίρες πνευματικότητας.

Η παρούσα διπλωματική ερευνητική διατριβή κινείται στο φάσμα της μοριακής ιολογίας. Ευελπιστώ πέρα από τον υποχρεωτικό της ρόλο για την απόκτηση του Μ.Δ.Ε. να παίξει και έναν επιπλέον ρόλο (έστω ασήμαντο) στα προαναφερθέντα. Να δώσει στοιχεία και επιπλέον γνώσεις σε όσους θελήσουν να την διαβάσουν είτε για δική τους ερευνητική εργασία είτε επειδή ο τίτλος τους κίνησε το ενδιαφέρον. Να γίνει δηλαδή πραγματικό κομμάτι του συνόλου της γνώσης που θα μας ωθήσει προς την αλήθεια.

Η παρούσα δουλειά δεν θα ήταν ποτέ εφικτή χωρίς τη συνδρομή και αμέριστη συμπαράσταση ορισμένων προσώπων.

- Ευχαριστώ πρωτίστως τον καθηγητή μου, κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση και επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Με τη στάση του, τη βοήθεια του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατάφερε να κερδίσει τον απεριόριστο σεβασμό μου προς το πρόσωπό του.
- Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Κομιώτη και κ. Μόσιαλο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας μου. Επίσης τους ευχαριστώ για τις επιστημονικές γνώσεις που μεταλαμπαδέυσαν από τους χώρους τις οργανικής χημείας και της μοριακής βακτηριολογίας αντίστοιχα.
- Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας. Χωρίς τις θεωρητικές τους διδαχές στα πλαίσια του Μ.Δ.Ε. η εργαστηριακή ανάπτυξη και κατανόηση των πειραμάτων που πραγματοποίησα θα ήταν ανέφικτες.

- Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τσακογιάννη για τις συμβουλές του και τη βοήθεια του για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου διατριβής, τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και σε θεωρητικό.
- Ευχαριστώ όλα τα άτομα που απαρτίζουν το εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας και Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για το ευχάριστο κλίμα εργασίας.
- Ευχαριστώ τους παλαιούς και νυν συμφοιτητές μου και πάνω από όλα φίλους μου: Γιάννη Ατσά, Στέφανο Εσκίογλου, Θανάση Καραβασίλη, Γρηγόρη Μιχάλη, Ειρήνη Παπαναστάση, Ελένη Ντούμου, Ανθή Τσιγγενέ, Νικολούλη Κατερίνα, Τίνα Καραπούλιου, Μαριλένα Γρηγορίου, Μάγδα Μπλέτσα γιατί μέσα από την εμπιστοσύνη τους σε εμένα μου έδειξαν ότι τίποτε δεν είναι ακατόρθωτο. Επίσης πιο πολύ τους ευχαριστώ γιατί με τιμούν με τη φιλία τους.
- Ευχαριστώ τους γονείς μου που με στηρίζουν τόσα χρόνια στον αγώνα των σπουδών μου.

Αφιερώνω τη μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία στους γονείς μου, Σωτήρη και Βασιλική και στην αδερφή μου, Κατερίνα.

A.M.

Λάρισα, Φεβρουάριος 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	8
1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)	10
1.1 Ετυμολογία	10
1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά	12
1.1.3 Ιστορικά στοιχεία	12
1.2 Επιδημιολογία HPV	14
1.2.1 HPV και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	16
1.2.2 Επιδημιολογικά στοιχεία καρκίνου της μήτρας	17
1.2.3 HPV και άλλες μορφές καρκίνου	20
1.3 Ταξινόμηση των Papilloma ιών	20
1.3.1 Alpha-papillomavirus	22
1.3.2 Beta-papillomavirus	23
1.3.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus	23
1.3.4 Οι HPV τύποι	26
1.4 Οι ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές (Variants)	26
1.4.1 Μη Ευρωπαϊκές ενδοτυπικές παραλλαγές του HPV16 και νεοπλασίες	28
1.4.2 Η εξέλιξη του ιού- Η δημιουργία των ενδοτυπικών παραλλαγών	30
2. Δομή των papilloma ιών (HPVs) του Ανθρώπου	33
2.1 Οργάνωση του γενόματος	33
2.2 Τα προϊόντα των ORFs	35
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E1	35
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E2	36
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E4	37
2.2.6 Μεταλλαγμένες E4 ικές πρωτεΐνες	39
2.2.7 Η ιική πρωτεΐνη E5	40
2.2.8 Η ιική πρωτεΐνη E6	40
2.2.9 Η ιική πρωτεΐνη E7	
3. Ο κύκλος ζωής των HPVs	49
3.1 Η μόλυνση με τον ιό	49
3.1.1 Τα στάδια της μόλυνσης με HPV	50
3.2.1 Αντιγραφή του ιικού γενόματος	52
3.2.2 Μεταγραφή του ιικού γενόματος	54

3.2.3 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	55
3.3 Πρόληψη	57
3.3.1 Εμβόλια	57
3.3.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις	58
4.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
4.1 Κλινικά Δείγματα	59
4.2 Προετοιμασία DNA	61
4.3 Εκκινητικά μόρια PCR για την ενίσχυση του E4 ORF	61
4.4 Ενίσχυση του E4 ORF με μεθόδους PCR	62
4.4.1 Απλή PCR	62
4.6 Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA που συλλέχθηκαν	64
4.6.1 AutoNested GoTaq PCR	64
4.6.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq PCR	66
4.6.3 Απομόνωση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης	66
4.6.4 Αντίδραση Λιγάσης	66
4.6.5 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων	67
4.6.6 Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων	68
4.6.7 Κλωνοποίηση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια	68
4.7 Απομόνωση των φορέων από τα πλασμίδια	69
4.8 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης	69
4.9 Αλληλούχιση των προϊόντων	70
4.10 Επεξεργασία των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής	70
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
6.1 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του E4 γονιδίου	71
6.2 Αποτελέσματα Κλωνοποίησης	72
6.3 Φυλογενετικό δέντρο	72
6.4 Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	75
7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomaviruses) είναι μικροί ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα και κατατάσσονται στη μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Προσβάλλουν και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά σε κερατινοκύτταρα (επιθηλιότροποι ιοί). Το γονιδιώμά τους αποτελείται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους 8000 βάσεων περίπου. Έχουν περιγραφεί πάνω από 120 διαφορετικοί γενότυποι HPV, οι οποίοι προσβάλλουν τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου του δέρματος και των βλεννογόνων. Ευθύνονται για την πρόκληση ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων οι οποίες είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε κακοήγη όγκο και στην εμφάνιση καρκίνου.

Οι τύποι του ιού οι οποίοι μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του γεννητικού συστήματος χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: υψηλού κινδύνου, μέσου και χαμηλού κινδύνου, σύμφωνα με το βαθμό αλλοίωσης που προκαλούν στον ιστό που προσβάλλουν. Οι τύποι υψηλού κινδύνου εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του γεννητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένου και του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι μολύνσεις από HPV χαμηλού κινδύνου προκαλούν μόνο καλοήγη γεννητικά θηλώματα. Οι κυριότεροι τύποι υψηλού κινδύνου είναι οι HPV-16, -18, -31, -33 και -45, ενώ οι κυριότεροι τύποι χαμηλού κινδύνου είναι οι HPV-6 και HPV-11. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος HPV που ευθύνεται για πάνω από το 50% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι ο HPV16.

Η μόλυνση από HPV υψηλού κινδύνου δεν περιορίζεται μόνο στο γεννητικό σύστημα, περίπου το 20% των καρκίνων του στοματοφάρυγγα περιέχουν DNA από αυτούς τους τύπους HPV.

Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά μόλυνσης παραμένουν αρκετά υψηλά. Για τον λόγο αυτό έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην μελέτη τους και γίνεται εκτεταμένη προσπάθεια για την ανάπτυξη εμβολίων και κατάλληλων θεραπειών για την καταπολέμηση του ιού.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η φυλογενετική και γενωμική ανάλυση του ORF (γονιδίου) E4 σε στελέχη HPV-16 από κλινικά δείγματα υψηλής και χαμηλής αλλοίωσης (High Grade και Low Grade) και ο προσδιορισμός των ενδοτυπικών μοριακών παραλλαγών του ιού στα προαναφερθέντα δείγματα.

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν 28 κλινικά δείγματα υψηλής και χαμηλής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητικά μόρια που ενισχύουν το γονίδιο E4. Στη συνέχεια, τα δείγματα κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής για την εύρεση μεταλλάξεων (σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία για το γονίδιο E4 στελεχών HPV-16) και για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

Στόχος της μελέτης αποτέλεσε ο εντοπισμός μεταλλάξεων, ο χαρακτηρισμός τους και η συσχέτιση των μη Ευρωπαϊκών στελεχών του ιού με τις νεοπλασίες βάσει της συχνότητας εμφάνισής τους σε δείγματα υψηλής αλλοίωσης. Η πρωτεΐνη E4 είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς είναι σημαντική για την πορεία ωρίμανσης του ιού και παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο με την αλληλεπίδραση του ιού σχετικά με την έκβαση της πορείας του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων. Τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη του ιού είναι ύποπτα για διηθητικούς καρκίνους της μήτρας, η συσχέτιση τους με τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων είναι μίας άξιας αναφοράς ανακάλυψη για την επιβεβαίωση της συγκεκριμένης θεωρίας.

1. Η Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)

1.1 Ετυμολογία

Η ονομασία *papilloma* προέρχεται από την λατινική λέξη *papilla* που μεταφράζεται ως θηλή και την ελληνική κατάληξη *-oma*, που σημαίνει όγκος.

1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί συγκροτούν την μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα.

Γενικά εξαρτώνται από το κύτταρο για την αντιγραφή, η οποία λαμβάνει χώρα μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα και όχι σε άλλους τύπους κυττάρων (επιθηλιότροποι ιοί). (zur Hausen, 1996). Το DNA του ιού βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες και σχηματίζει σύμπλοκα παρόμοια με τη χρωματίνη.

Το γένωμα τους περιέχει περίπου 8 ORFs (ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια) τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται μόνο από τον ένα κλώνο DNA.

Οι papilloma ιοί εκτός από τον άνθρωπο προσβάλλουν επίσης ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών. Πτηνά, θηλαστικά της ξηράς, ερπετά ακόμη και θαλάσσια θηλαστικά έχει διαπιστωθεί ότι μπορούν να προσβληθούν από τους papilloma ιούς και να αναπτύξουν ανάλογες δερματικές αλλοιώσεις. Από τη στιγμή που κάθε papilloma ιός είναι ειδικός για τα είδη τα οποία προσβάλλει, υπάρχουν εκατοντάδες τύποι αυτών των ιών (Antonsson A et al 2003).

Ειδικότερα στον άνθρωπο οι ιοί HPV(Human Papillomaviruses), προσβάλλουν τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και των βλεννογόνων και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, οι οποίες εκτείνονται από τα κοινά θηλώματα μέχρι τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του πέους.

Μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής και παρουσιάζουν παγκόσμια κατανομή. Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά σε κερατινοκύτταρα.

Από τους 200 τύπους HPV, οι 40 προσβάλλουν τη γεννητική οδό και οι οποίοι εντοπίζονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε υψηλότερη αναλογία από ότι σε δείγματα μάρτυρες. Αυτοί οι τύποι χαρακτηρίζονται ως «υψηλής επικινδυνότητας» (high risk). Άλλοι τύποι HPV που έχουν ίδια ποσοστά σε όγκους και σε μάρτυρες χαρακτηρίζονται ως «χαμηλής επικινδυνότητας» (low risk). Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), ανήκουν τα μέλη που μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Σε μια παγκόσμια μελέτη περίπου 1000 δειγμάτων τραχήλου της μήτρας πάνω από το 90% των δειγμάτων περιείχαν HPV (Bosch FX et al 1995). Τέσσερις τύποι HPV (16,18,31,45) εκ των 20 τύπων που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι προκαλούν το 80% των HPV-θετικών καρκίνων. Ο επικρατέστερος τύπος ήταν ο HPV 16 ενώ οι τύποι χαμηλής επικινδυνότητας 6 και 11 βρέθηκαν σε 3 μόνο όγκους (Hoory et al, 2008). Εξαιτίας του τροπισμού τους, μπορούν να διαχωριστούν σε βλεννογονικούς και δερματικούς τύπους (Munoz N. et al., 2003).

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

Πίνακας 1: Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων

Δέρμα	
Εν τω βάθει μυρμηγκίες των πελμάτων	HPV-1
Κοινές μυρμηγκίες	HPV-2,4
Επίπεδες μυρμηγκίες	HPV-3,10
Βλεννογόνος	
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 – 6,11,40,42,43,44,5461, 70,72,81 CP6108
Αιδοϊκός καρκίνος	HPV-16
Πεϊκός καρκίνος	HPV-16
Στοματοφαρυγγικός καρκίνος	HPV-16
Αναπνευστικά θηλώματα	HPV-6,11

Πίνακας 2: Διάφοροι τύποι HPV και τα συμπτώματα που προκαλούν.

1.1.3 Ιστορικά στοιχεία

Η λοίμωξη της κατώτερης γενετικής οδού από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων αποτελεί ένα από τα πιο συνηθισμένα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. (Zur Hausen, 1976). Οι νεοπλασίες της γενετικής οδού έχουν καταγραφεί εδώ και περίπου 2.000 χρόνια. (Temkin O. 1956). Τα οξυτενή κονδυλώματα ήταν γνωστά από την αρχαία Ελλάδα και την αρχαία Ρώμη. Ο όρος «κονδύλωμα» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ανθοκραμβοειδείς εκβλαστήσεις που εντοπίζονται στην περιοχή των γεννητικών οργάνων και που μοιάζουν με όζους φυτών που προκαλούνται από τον HPV, καθώς και αλλοιώσεις που προκαλούνται από τη σύφιλη (Condyloma latum : Πλατύ κονδύλωμα ή συφιλιδική πλάκα). Οι δερματικές αλλοιώσεις και η σεξουαλικά μεταδιδόμενη παράμετρος της μετάδοσης του HPV ήταν ήδη γνωστές τόσο στην αρχαία Ελλάδα, όσο και στην αρχαία Ρώμη βέβαια τότε συσχετιζόντουσαν με άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα όπως η γονόρροια και η σύφιλη, άποψη που επικράτησε μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα παρατηρήθηκε η ομοιότητα μεταξύ των ακροχορδώνων του δέρματος και των γεννητικών κονδυλωμάτων έτσι αμφισβητήθηκε η καθαρά αφροδίσια φύση τους (zur Hausen, 1976).

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses – PVs) ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων. Στις αρχές του 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος μόλις είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, έπειτα από παρατηρήσεις που έκανε σε κουνέλια συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος (Danos O et al 1982,1983).



Francis Peyton Rous
(1879-1978)

Βραβείο Νόμπελ (1966) Φυσιολογίας ή Ιατρικής για την ανακάλυψη ογκογόνων ιών.

Η αφροδίσια φύση των κονδυλωμάτων επιβεβαιώθηκε όταν μετά την επιστροφή των στρατιωτών από τον πόλεμο της Κορέας σημειώθηκε ραγδαία αύξηση εμφάνισης κονδυλωμάτων του αιδοίου στις συζύγους των στρατιωτών καθώς και αύξηση τους στους άνδρες.

Στα τέλη της δεκαετίας του 60 αναγνωρίστηκαν τμήματα των ιών με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τόσο σε ακροχορδώνες του δέρματος, όσο και στα οξυτενή κονδυλώματα. Τελικά ο ιός που ενοχοποιήθηκε και για τους δύο τύπους αλλοιώσεων ήταν ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (zur Hausen, 1976).

Το 1970 πραγματοποιήθηκε η πρώτη κλωνοποίηση των papilloma ιών και έτσι φανερώθηκαν πολλές από τις ιδιότητές τους. Στην συνέχεια η αλληλούχηση και η αντίστροφη γενετική βοήθησαν στην αναγνώριση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) των ιικών γονιδίων και στον καθορισμό της λειτουργίας τους αντίστοιχα (Chen EY et al 1983). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 120 διαφορετικοί τύποι HPV, ενώ πολυάριθμοι θεωρητικά καινούργιοι τύποι έχουν χαρακτηριστεί (Zur Hausen, 2000).

Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν γνωστοί στο ευρύτερο κοινό στις αρχές της δεκαετίας του 80 καθώς ανακαλύφθηκε, ότι ορισμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papillomaviruses) συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως.

1.2 Επιδημιολογία HPV

Με βάση στοιχεία του 2005 του Centre of Disease Control των ΗΠΑ, περίπου 6,2 εκατομμύρια άτομα μολύνονται με HPV στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε έτος, και περίπου 15% του αμερικάνικου ενήλικου πληθυσμού (20 εκατομμύρια άνθρωποι) είναι θετικοί για HPV DNA στην πρωκτογεννητική περιοχή.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι παρατηρείται γεωγραφική και ειδική για κάθε χώρα μεταβλητότητα όσον αφορά στην διάδοση του κάθε τύπου ιού. Επιπλέον, έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι οι τύποι των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στην Δυτική Αφρική ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν με μεγαλύτερη συχνότητα οι HPV-39 και HPV-54 (Bosh et al 1995).

Μεγαλύτερα ποσοστά μολύνσεων εμφανίζονται σε νεαρές γυναίκες, κυρίως από χώρες της Αφρικής ή από Ισπανόφωνες περιοχές. Επιπλέον, γυναίκες με μεγάλο αριθμό σεξουαλικών συντρόφων ή γυναίκες με ιστορικό μόλυνσης από ερπητοϊούς στα γεννητικά όργανα έχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από HPV (Ho GY. et al 1998, Moscicki A.B. et al 2001, Giuliano A.R. et al 2002, Winer R.L. et al 2003, Sellors J.W. et al 2003).

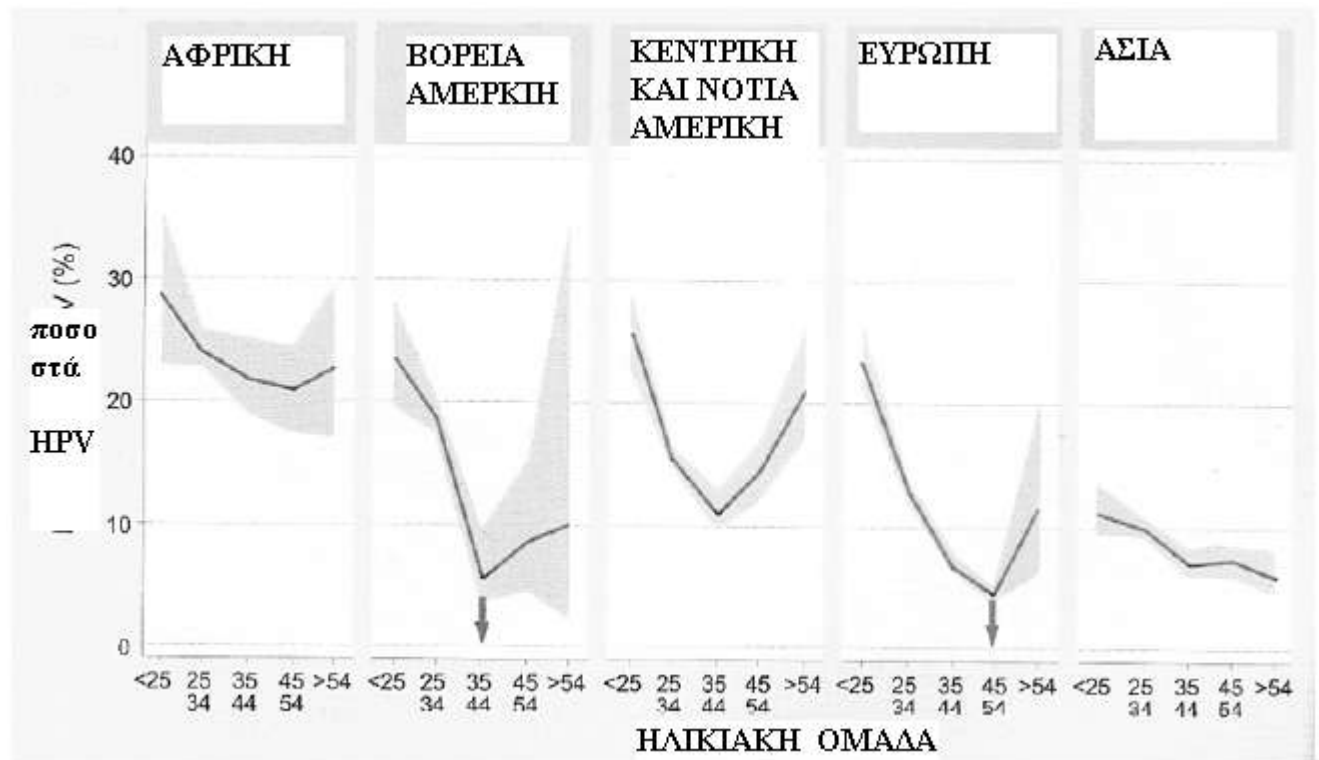
Συνοψίζοντας στοιχεία από προηγούμενες μελέτες προκύπτει ο παρακάτω πίνακας

Ηλικία 20-29	σχετικός κίνδυνος	4.8
Συνολικός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων >5	“	2.5
Αριθμός συντρόφων τα τελευταία 1-4 χρόνια >5	“	12.1
Συχνότητα σεξ. Επαφών >4/εβδομάδα	“	2.3
Κονδυλώματα στο σύντροφο	“	3.2
Κάπνισμα	“	2.0

Πίνακας 3: Προδιαθεσικοί παράγοντες για τη λοίμωξη με HPV

Έτσι η λοίμωξη από τον HPV βρέθηκε ότι σχετίζεται με διάφορους παράγοντες που έχουν να κάνουν με τη σεξουαλική συμπεριφορά του ατόμου και τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. Επίσης σημασία έχει η ηλικία, η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας, ο αριθμός των συντρόφων, το κάπνισμα, η κατάχρηση αλκοόλ, η κακή διατροφή, το κάπνισμα, η πλημμελής σωματική υγιεινή, η λήψη αντισυλληπτικών κτλ (Kataja et al. , 1993, Burk et al. ,1996, Svare et al. 1998).

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται διαγραμματικά η κατανομή του HPV σε διάφορες ηλικιακές ομάδες. Είναι φανερό η αυξημένη επίπτωσή του στις νέες γυναίκες, μία μείωση στις μεσαίες ηλικίες και μία επανάκαμψη της αύξησης στις περιεμμηνόπαυσιακές ομάδες.



Πίνακας 4 : Κατανομή του HPV σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, ανά ήπειρο (de Sanjose S. et al. ,2007).

1.2.1 HPV και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Σήμερα η συσχέτιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του HPV είναι αδιαμφισβήτητη (Walboomers et al. , 1999).

Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις του καρκίνου του τραχήλου αποδίδονται στον HPV (99%). Άλλοι τύποι καρκίνου που προκαλούνται από HPV είναι αυτοί του πρωκτού, του κόλπου και του πέους. Ακόμη υπάρχουν και καρκίνοι της μη γενετικής οδού όπως καρκίνοι του στόματος και του λάρυγγα (Hoory et al 2008, Fakhry C et al 2006, Hernandez BY et al 2005, Partridge JM et al 2007).

Οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου σχετίζονται με το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, από τις οποίες ο HPV-16 ευθύνεται για το 50%

αυτών ενώ ο HPV-18 για το 10-20% (Bosh et al 1995). Η μόλυνση βέβαια με τον ιό των θηλωμάτων αποτελεί απαραίτητη αλλά όχι ικανή συνθήκη για την πρόκληση καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας. Έτσι πολλά άτομα μολύνονται από τον ιό χωρίς να νοσούν, όπως και από τα άτομα που μολύνονται και εμφανίζουν ελαφρές κυτταρικές αλλοιώσεις ελάχιστα είναι αυτά που κινδυνεύουν να νοσήσουν από ενδοεπιθηλιακό ή διηθητικό καρκίνο. Κατά συνέπεια φαίνεται ότι υπάρχουν και άλλοι εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας. Έτσι παράγοντες που μειώνουν την αποτελεσματικότητα της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού στην ιογενούς τύπου προσβολή, όπως η συγγενής ή επίκτητη ανοσοανεπάρκεια, π.χ. λοίμωξη με HIV, σοβαρές αυτοάνοσες νόσοι, π.χ. ερυθματώδης λύκος, λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, το κάπνισμα, η πλημμελής διατροφή κ.α φαίνεται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας, ενώ παράλληλα διάφοροι κληρονομούμενοι γενετικοί παράγοντες όπως ιδιαίτεροι HLA γενότυποι και ορισμένοι πολυμορφισμοί σε ορισμένα γονίδια (p53, MTHFR, GST, CYP, TNF κ.α) διερευνώνται ως προς την αυξημένη εμφάνιση τους σε άτομα που εμφανίζουν νεοπλασματικές αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας (Agorastos et al., 2004, 2007).

1.2.2 Επιδημιολογικά στοιχεία καρκίνου της μήτρας

Ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί παγκοσμίως τη δεύτερη συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες. Σε ορισμένα μέρη του κόσμου μάλιστα, η συχνότητα του ξεπερνά αυτή του καρκίνου του μαστού (Υποσαχάρια Αφρική, Κεντρική Αμερική, Κεντρική – Νότια Ασία, Μελανησία). Η διακύμανσή του ποικίλει από 5 (Ισπανία) έως 45 (Κολομβία) περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες. Υπολογίζεται ότι περίπου κάθε χρόνο 500.000 γυναίκες προσβάλλονται και 275.000 πεθαίνουν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι περισσότερες από αυτές ζουν σε χώρες του τρίτου κόσμου. Αντίθετα, στις αναπτυγμένες χώρες του δυτικού πολιτισμού, χάρη στην εφαρμογή της δευτερογενούς πρόληψης, ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου δεν φαίνεται να είναι τόσο συχνός και υπολογίζεται ότι βρίσκεται στη δέκατη θέση

από άποψη συχνότητας, πίσω από τον καρκίνο του ενδομητρίου και τον καρκίνο των ωοθηκών. Παρόλα αυτά, στη Ευρώπη διαπιστώνονται ακόμη κατά την τελευταία δεκαετία περισσότερες από 25.000 περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του τραχήλου και περίπου 12.000 θάνατοι ετησίως (Arbyn et al. 2007).

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας προέρχεται ή καλύτερα αποτελεί εξέλιξη προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου. Υπάρχουν 3 συστήματα ταξινόμησης αυτών των αλλοιώσεων του τραχήλου (Adami et al. , 2002).

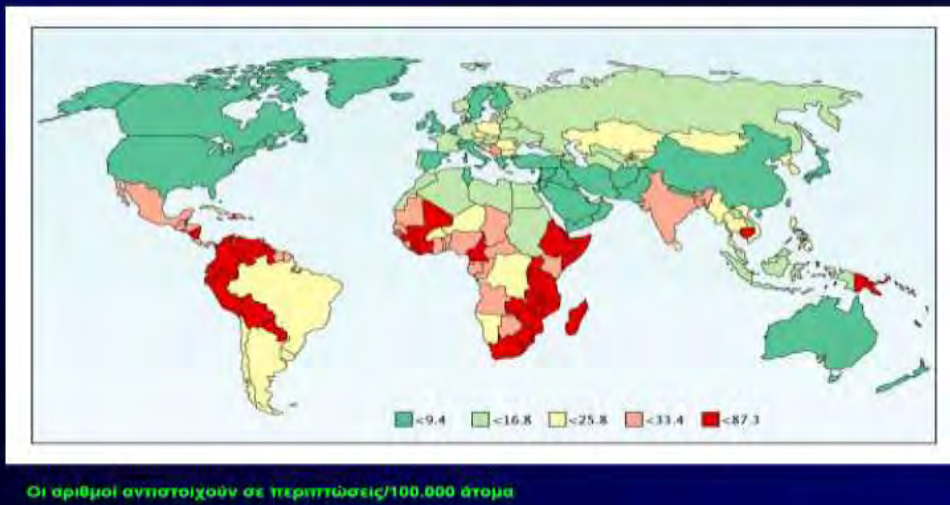
1. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας – World Health Organization, αυτές χωρίζονται σε ήπιες, μέτριες και σοβαρές καθώς και σε μία ξεχωριστή κατηγορία που αποτελεί το καρκίνωμα in situ (CIS).

2. Η ταξινόμηση σε CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) που προτάθηκε από τον Ritchart το 1990, όπου το CIN I αποτελεί την ήπια προς μέτρια αλλοίωση, το CIN II την ενδιάμεση αλλοίωση και το CIN III σοβαρή δυσπλασία συμπεριλαμβανομένου του CIS (Carcinoma In Situ).

3. Το σύστημα Bethesda (Bethesda 1998) όπου το αντίστοιχο του CIN1 είναι το LGSIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion), ενώ η υψηλόβαθμη αλλοίωση χαρακτηρίζεται HGSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion) και αντιστοιχεί στα CIN II και CIN III.

Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Εταιρεία Καρκίνου- American Cancer Society υπήρξαν περίπου 10.500 νέες υποθέσεις και 3.700 θάνατοι από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά το έτος 2005. Επίσης το ίδιο έτος στο Ηνωμένο Βασίλειο διαγνώστηκαν 2803 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου στον τράχηλο καθιστώντας τη νόσο αυτή τη δωδέκατη πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες και το 2% όλων των γυναικολογικών καρκίνων. Κατά το ίδιο έτος ο ρυθμός της ετήσιας επίπτωσης της νόσου στην Αγγλία ήταν 8,4/100.000 γυναίκες. Ο καρκίνος του τραχήλου είναι ο δεύτερος πιο συχνός, μετά από αυτόν του μαστού, στις γυναίκες κάτω των 35, με 651 νέες περιπτώσεις στην ίδια χώρα το συγκεκριμένο έτος.

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ - ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ



Εικόνα 1: Η παγκόσμια κατανομή του καρκίνου του τραχήλου.

1.2.3 HPV και άλλες μορφές καρκίνου

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας δεν είναι ο μόνος καρκίνος που αποδίδεται σε HPV, (Parkin et al. , 2008). Ο HPV συνδέεται με διάφορους άλλους καρκίνους και αποτελεί την αιτία του 5,2% όλων των καρκίνων συνολικά. Οι καρκίνοι που σχετίζονται με τον HPV περιλαμβάνουν επίσης (Handisurya et al. ,2009):

- 20% όλων των καρκίνων του στοματοφάρυγγα
- 85% όλων των καρκίνων του πρωκτού
- 10% όλων των καρκίνων του λάρυγγα και του οισοφάγου
- 50% όλων των καρκίνων του κόλπου και του αιδοίου
- 50% όλων των καρκίνων του πέους.

1.3 Ταξινόμηση των Papilloma ιών

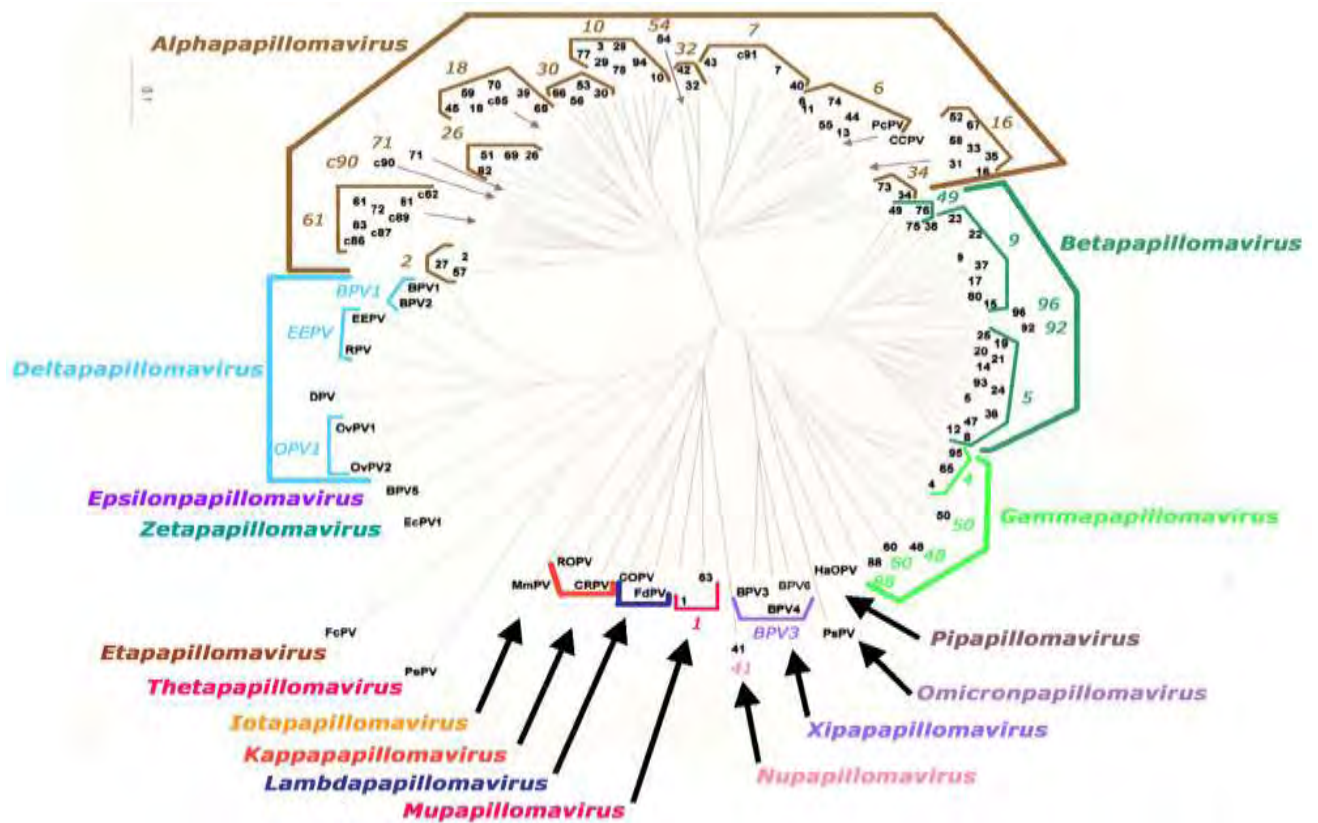
Αρχικά οι papilloma ιοί είχαν κατηγοριοποιηθεί μαζί με τους polyoma ιούς σε μία μεγάλη υπεροικογένεια, των Papovaviridae. Η συγκεκριμένη ομαδοποίηση βασιζόταν στην ύπαρξη παρόμοιων καψιδίων που στερούνται εξωτερικού περιβλήματος και στο παρόμοιο γένωμα κυκλικού δίκλωνου DNA. Αργότερα αποδείχθηκε ότι τα δύο είδη ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, τελείως διαφορετική οργάνωση γονιδιώματος και καμία σημαντική ομοιότητα νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών. Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι τα καψίδια των papillomaviruses είναι μεγαλύτερα από αυτά των polyoma ιών (Hoory et al 2008). Ο διαχωρισμός των Papovaviridae έγινε σχεδόν μία δεκαετία πριν και έτσι πλέον οι papilloma ιοί και οι polyoma ιοί αναγνωρίζονται ως δύο ξεχωριστές οικογένειες από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses – ICTV). Τα γενώματα των papilloma ιών και polyoma ιών μοιράζονται μόνο ένα κοινό ομόλογο τμήμα ανάμεσα στα E1 γονίδια των papilloma ιών και στα T-αντιγόνα των polyoma ιών που αντιστοιχούν σε μία ελικάση γεγονός που καταδεικνύει μία αρχαία κοινή καταγωγή στις πρωτεΐνες αντιγραφής των 2 ιών (Rebrikov et al.,2002). Αυτή η ανακάλυψη δεν έχει προς το παρόν κάποιο ταξινομικό αντίκτυπο.

Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε ότι 2 ιοί που προσβάλλουν μαρσιποφόρα παρουσιάζουν μια αξιοθαύμαστη οργάνωση στο γένωμα τους. Τα πρώιμα γονίδια ομοιάζουν με εκείνα των polyoma ιών και τα όψιμα γονίδια αντιστοίχως παρουσιάζουν ομοιότητα με τους papilloma ιούς. Αυτοί οι υβριδικοί ιοί κατά πάσα πιθανότητα έχουν προκύψει από ανασυνδυασμό και δεν αποτελούν κοινό πρόγονο των papilloma ιών και των polyoma ιών και δεν κατατάσσονται στην οικογένεια των Papillomaviridae (Hans-Ulrich Bernard et al. 2010).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, οι papilloma ιοί ταξινομούνται βάση των διαφορών που υπάρχουν στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Οι papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Έτσι, έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu papillomavirus για τα γένη που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 2 περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη

ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Hans-Ulrich Bernard et al. 2010, Charles E. et al., 2007, Antonson A. et al., 2006).

Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του καπιδιακού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον 10% ενώ μεταξύ υπότυπων και variants 2% - 10% και 2% αντίστοιχα (de Villiers E.M et al 2004).



Εικόνα 2 : Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καπιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών.

1.3.1 Alpha-papillomavirus

Το κλινικά πιο σημαντικό γένος αναφέρεται ως Άλφα-papillomaviruses και περιέχει όλους τους HPV τύπους που συνδέονται με βλάβες του βλεννογόνου και της γεννητικής περιοχής (de Villiers E.M. et al., 2004). Οι Alpha papillomaviruses περιλαμβάνουν επίσης δερματικούς ιούς όπως ο HPV2, οι οποίοι προκαλούν κοινές μυρμηγκιές και σπάνια συσχετίζονται με καρκίνο. Περισσότεροι από 40 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV ταξινομούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (High risk). Ο HPV-16 και ο HPV-18 είναι οι κύριοι παράγοντες 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 ιούς HPV και σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του HPV-16 (Bosch et al 2001). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται, ως ενδιάμεσου κινδύνου (Mediate risk) και χαμηλού κινδύνου (Low risk), βάση της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί χαμηλού κινδύνου εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου πολύ σπάνια, άλλα ερευνητικά και διαγνωστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος. (Doorbak. J 2006).

1.3.2 Beta-papillomavirus

Οι τύποι HPV που προσβάλουν το δέρμα διαχωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά γένη (Beta, Gamma, Mu και Nu-papillomaviruses). Οι ιοί αυτοί συχνά εντοπίζονται σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Ωστόσο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς αλλά και σε άτομα που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis-επιδερμιοδυσπλασία κονδυλωματώδης), μπορεί να προκληθεί μη μελανωματικός καρκίνος του δέρματος (Pfister 2003). Σε αυτή την περίπτωση δρουν συνεργητικά με την ασθένεια EV περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως UV ακτινοβολία και η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς (Hoory et al 2008). Κυρίως τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 εμπλέκονται στο 90% αυτών των όγκων (Kremsdorf D. et al., 1983).

1.3.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV προέρχονται από τρία άλλα γένη (Gamma, Mu and Nu) και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται σε καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu papillomavirus (Doorbar J. et al., 2006).

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

Πίνακας 2: Σύνοψη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

Genus	Species (common use)	Species (ICTV)
Alphapapillomavirus	Alpha-1	<i>Human Papillomavirus 32</i>
	Alpha-2	<i>Human Papillomavirus 10</i>
	Alpha-3	<i>Human Papillomavirus 61</i>
	Alpha-4	<i>Human Papillomavirus 2</i>
	Alpha-5	<i>Human Papillomavirus 26</i>
	Alpha-6	<i>Human Papillomavirus 53</i>
	Alpha-7	<i>Human Papillomavirus 18</i>
	Alpha-8	<i>Human Papillomavirus 7</i>
	Alpha-9	<i>Human Papillomavirus 16</i>
	Alpha-10	<i>Human Papillomavirus 6</i>
	Alpha-11	<i>Human Papillomavirus 34</i>
	Alpha-12	<i>Macaca mulata Papillomavirus 1</i>
	Alpha-13	<i>Human Papillomavirus 54</i>
	Alpha-14	<i>Human Papillomavirus 90</i>
Betapapillomavirus	Beta-1	<i>Human Papillomavirus 5</i>
	Beta-2	<i>Human Papillomavirus 9</i>
	Beta-3	<i>Human Papillomavirus 49</i>
	Beta-4	<i>Human Papillomavirus 92</i>
	Beta-5	<i>Human Papillomavirus 96</i>
	Beta-6	<i>Macaca fascicularis Papillomavirus 2</i>
Gammapapillomavirus	Gamma-1	<i>Human Papillomavirus 4</i>
	Gamma-2	<i>Human Papillomavirus 48</i>
	Gamma-3	<i>Human Papillomavirus 50</i>
	Gamma-4	<i>Human Papillomavirus 60</i>
	Gamma-5	<i>Human Papillomavirus 88</i>
	Gamma-6	<i>Human Papillomavirus 101</i>
	Gamma-7	<i>Human Papillomavirus 109</i>
	Gamma-8	<i>Human Papillomavirus 112</i>
	Gamma-9	<i>Human Papillomavirus 116</i>
	Gamma-10	<i>Human Papillomavirus 121</i>
Deltapapillomavirus	Delta-1	<i>Aces aces Papillomavirus 1</i>
	Delta-2	<i>Odocoileus virginianus Papillomavirus 1</i>
	Delta-3	<i>Ovis aries Papillomavirus 1</i>
	Delta-4	<i>Bos taurus Papillomavirus 1</i>
	Delta-5	<i>Capreolus capreolus Papillomavirus 1</i>
Epsilonpapillomavirus	Epsilon-1	<i>Bos taurus Papillomavirus 5</i>
Zetapapillomavirus	Zeta-1	<i>Equus caballus Papillomavirus 1</i>
Etapapillomavirus	Eta-1	<i>Fringilla coelebs Papillomavirus</i>
Thetapapillomavirus	Theta-1	<i>Psittacus erithacus Papillomavirus 1</i>
Iotapapillomavirus	Iota-1	<i>Mastomys natalensis Papillomavirus 1</i>
Kappapapillomavirus	Kappa-1	<i>Oryctolagus cuniculus Papillomavirus 1</i>
	Kappa-2	<i>Sylvilagus floridanus Papillomavirus 1</i>
Lambdapapillomavirus	Lambda-1	<i>Felis domesticus Papillomavirus 1</i>
	Lambda-2	<i>Canis familiaris Papillomavirus 1</i>
	Lambda-3	<i>Canis familiaris Papillomavirus 6</i>
	Lambda-4	<i>Procyon lotor Papillomavirus 1</i>
Mupapillomavirus	Mu-1	<i>Human Papillomavirus 1</i>
	Mu-2	<i>Human papillomavirus 63</i>
Nupapillomavirus	Nu-1	<i>Human papillomavirus 41</i>
Xipapillomavirus	Xi-1	<i>Bos taurus Papillomavirus 3</i>
Pipapillomavirus	Pi-1	<i>Mesocricetus auratus Papillomavirus 1</i>
	Pi-2	<i>Micromys minutus Papillomavirus 1</i>
Rhopapillomavirus	Rho-1	<i>Trichechus manatus latirostris Papillomavirus 1</i>
Sigmmapapillomavirus	Sigma-1	<i>Erethizon dorsatum Papillomavirus 1</i>
Taupapillomavirus	Tau-1	<i>Canis familiaris Papillomavirus 2</i>
Upsilonpapillomavirus	Upsilon-1	<i>Tursiops truncatus Papillomavirus 1</i>
	Upsilon-2	<i>Tursiops truncatus Papillomavirus 2</i>
Phipapillomavirus	Phi-1	<i>Capra hircus Papillomavirus 1</i>
Chipapillomavirus	Chi-1	<i>Canis familiaris Papillomavirus 3</i>
	Chi-2	<i>Canis familiaris Papillomavirus 4</i>
Psipapillomavirus	Psi-1	<i>Rousettus aegyptiacus Papillomavirus 1</i>
Omegapapillomavirus	Omega-1	<i>Ursus maritimus Papillomavirus 1</i>
Dyodeltapapillomavirus	Dyodelta-1	<i>Sus scrofa Papillomavirus 1</i>
Dyoepsilonpapillomavirus	Dyoepsilon-1	<i>Francoelinus leucocephus Papillomavirus 1</i>
Dyozetapapillomavirus	Dyozeta-1	<i>Caretta caretta Papillomavirus 1</i>
Dyoetapapillomavirus	Dyoeta-1	<i>Erinaceus europaeus Papillomavirus 1</i>
Dyothetapapillomavirus	Dyotheta-1	<i>Felis domesticus Papillomavirus 2</i>
Dyoiotapapillomavirus	Dyoiota-1	<i>Equus caballus Papillomavirus 2</i>

Πίνακας 3 : Γένη papilloma ιών και είδη

1.3.4 Οι HPV τύποι

Οι HPV έχουν αριθμηθεί με βάση τη χρονική σειρά της ταυτοποίησης του κάθε τύπου, έτσι ώστε ο HPV1 ήταν ο πρώτος που ταυτοποιήθηκε, ο HPV16 ο 16ος κτλ. Μέχρι σήμερα 100 και πλέον τύποι έχουν ταυτοποιηθεί (Sedlacek, 1999).

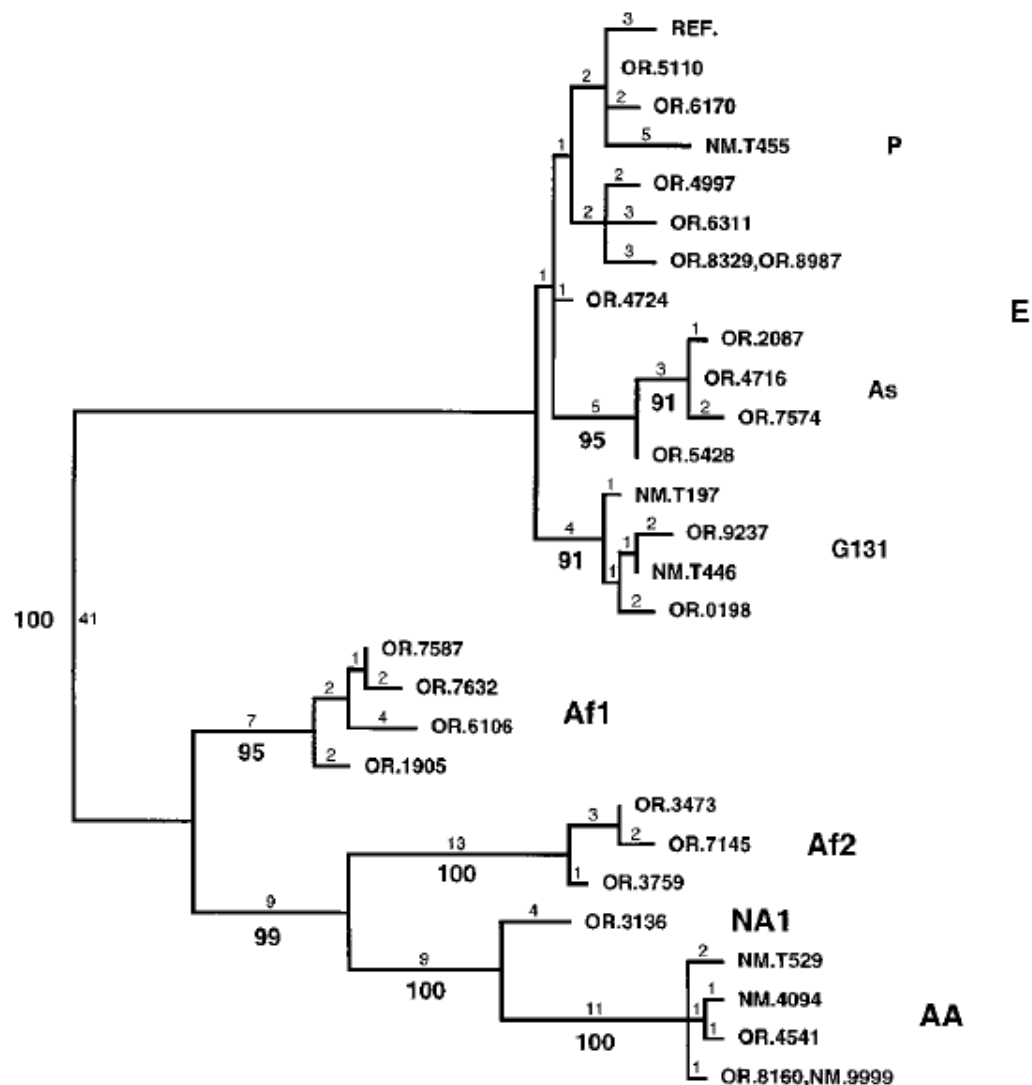
1.4 Οι ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές (Variants)

Ο HPV16 διακρίνεται σε ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές (variants) οι οποίες περιγράφονται σε φυλογενετικά κλαδιά (branches), η κατανομή των οποίων διαφέρει κατά γεωγραφική προσέγγιση. Το πρωτότυπο HPV16 γένωμα αναφοράς είναι ένα Γερμανικό στέλεχος και μέλος του Ευρωπαϊκού –European (E) κλαδιού (Seedorf et al 1985).

Τα υπόλοιπα κύρια κλαδιά των παραλλαγών που έχουν περιγραφεί είναι το Ασιατικό –(As), κυρίως στην Νότιο – Ανατολική Ασία, το Ασιατικό – Αμερικάνικο (AA), κυρίως στην Κεντρική και Νότια Αμερική, το Αφρικανικό 1 (AF1) και το Αφρικανικό 2 (AF2), κυρίως στην Αφρική, το Βόρειο – Αμερικάνικο (NA1) στην Αμερική (Ho et al., 1991) και ένα πρόσφατα χαρακτηρισμένο στέλεχος Japanese variant (Java) από την Ινδονησία (de Boer et al., 2004). Τα Ευρωπαϊκά variants βρίσκονται σε όλες τις περιοχές εκτός από την Αφρική. Σε φυλογενετική ανάλυση στη γενωμική περιοχή LCR τα κλαδιά E και As ήταν μεν ξεχωριστά αλλά πολύ συσχετιζόμενα. Έτσι τα E και As variant φαίνεται ότι είναι υποκατηγορίες των E. Τα AA, Af1, και Af2 κλαδιά ήταν καλά διαφοροποιημένα το ένα από το άλλο αλλά και από τα E και As (Yamada et al., 1997), (Yuping Wu et al 2006). Επιπροσθέτως, και δευτερεύοντα κλαδιά έχουν ταυτοποιηθεί και σχεδιαστεί όπως το E-G131 και AA-G183/AA-c (Yamada et al., 1995, 1997).

Στις μελέτες για τον καθορισμό και την περιγραφή των φυλογενετικών δέντρων συνήθως γίνονται φυλογενετικές μελέτες κυρίως στην ιική γενωμική περιοχή LCR,

μιας υπερμεταβλητής δηλαδή γενωμικής περιοχής, καθώς θεωρητικά επιτρέπει την ανίχνευση μεγαλύτερης ποικιλίας παραλλαγών από ότι θα συνέβαινε από την ανάλυση συντηρημένων γονιδίων (Bernard et al. , 1994). Επίσης, αναλύσεις συγκεκριμένων τμημάτων ιικών γονιδίων όπως τα E2,E5,E6, L1 και L2, υποδεικνύουν ουσιαστική διαφοροποίηση στις μοριακές ενδοτυπικές παραλλαγές του HPV-16 (Ericksson et al. , 1999, Icenogle et al. , 1991, Yamada et al. , 1995, Wheeler et al. , 1997). Ακόμη, έρευνες στις προαναφερθείσες γενωμικές περιοχές του HPV16 κατέδειξαν ότι ο ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών στελεχών είναι σπάνιος (Villa et al. , 2000, Yamada et al., 1995,1997).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο HPV16 ενδοτυπικών παραλλαγών. Συνδυασμένες αλληλουχίες από τις γενωμικές περιοχές E6,L2,L1 και την LCR από 30 στελέχη του ιού. (Yamada et al. 1995).

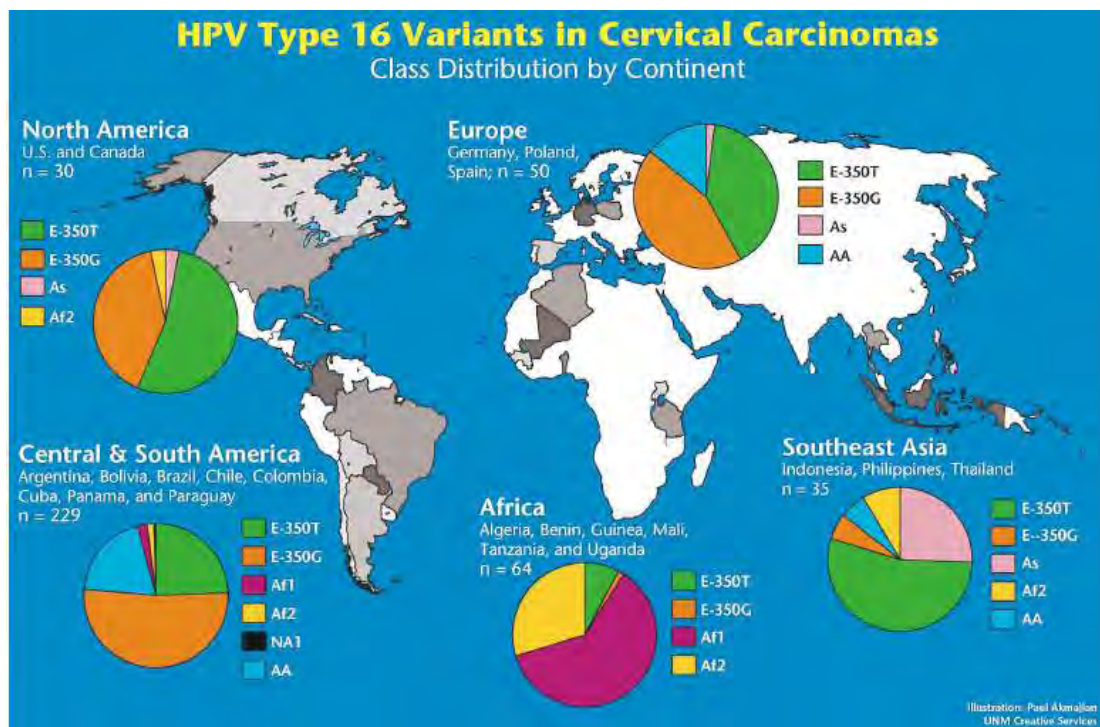
1.4.1 Μη Ευρωπαϊκές ενδοτυπικές παραλλαγές του HPV16 και νεοπλασίες

Μερικά variants πιστεύεται ότι είναι ύποπτα για μεγαλύτερα ποσοστά νεοπλασιών. Αυτό μπορεί να συνδεθεί με μία σειρά μεταλλάξεων στο γονιδίωμα των συγκεκριμένων παραλλαγών του ιού. Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι όσο απομακρύνεται μία μοριακή ενδοτυπική παραλλαγή του ιού από το αρχικό δηλ.την πρωτότυπη αλληλουχία αναφοράς (π.χ.Ευρωπαϊκή) τόσο αυξάνεται και η σοβαρότητα της νεοπλασίας. Σε κλινικό επίπεδο ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι πολύ πιο συχνός στις Νοτιοαμερικάνικες και στις Αφρικανικές χώρες από ότι στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική. Πέρα από τις διαφορές σε βιωτικό επίπεδο, σε επίπεδα πρόληψης και ιατρικής φροντίδας στις προαναφερθείσες περιοχές που είναι φυσικό να ανεβάζουν τα ποσοστά του καρκίνου της μήτρας, τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη του ιού παίζουν και αυτά πρωταγωνιστικό ρόλο (Villa et al. , 2000).

Έτσι έγιναν (και γίνονται) διάφορες έρευνες όπου επεξεργάζονταν οι αλληλουχίες HPV16 ιών που απομονώθηκαν από καρκινικούς ιστούς μήτρας και ταξινομήθηκαν ανάλογα με την αλληλουχία τους σε φυλογενετικά δέντρα. Παράλληλα έλαβαν χώρα πολλές στατιστικές – επιδημιολογικές μελέτες.

Σε παρόμοια έρευνα παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες με HPV16 AA ή με άλλες μη Ευρωπαϊκές ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές του ιού παρουσίαζαν 4,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο στο να αναπτύξουν υψηλού βαθμού τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες σε σχέση με γυναίκες προσβεβλημένες από Ευρωπαϊκά στελέχη του ιού. Στο Μεξικό βρέθηκε ότι ο HPV16 AA παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά καρκινογένεσης σε σχέση με τον HPV16 E, καθώς οι μισοί καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας στη χώρα οφείλονται στην AA ενδοτυπική μοριακή παραλλαγή του ιού (Berumen et al.2001).

Σε παγκόσμια μελέτη αλληλούχησης των ενδοτυπικών μοριακών παραλλαγών του ιού που βρέθηκαν σε καρκίνους της μήτρας, συλλέχθηκαν δείγματα από 22 χώρες στις 5 ηπείρους και οι γενωμικές περιοχές που αναλύθηκαν ήταν τα ORFs E6, L1 και η μη κωδική περιοχή LCR (Yamada et al. , 1997). Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην κατωτέρω εικόνα.



Εικόνα 4 : Παρουσιάζονται οι κύριες HPV16 παραλλαγές κατανεμημένες σε E, As, Af-1, Af-2 και AA. Το Ευρωπαϊκό πρωτότυπο (E) διαιρέθηκε σε παραλλαγές βάσει μιας νουκλεοτιδικής παραλλαγής στην Ε6 κωδική περιοχή στην νουκλεοτιδική θέση 350. Αυτή η διαφοροποίηση της Ευρωπαϊκής τάξης αντιπροσωπεύεται από τις E-350T και E-350G κατηγορίες αποκλείοντας τις As ενδοτυπικές παραλλαγές. Τα δείγματα του HPV16 προήλθαν από τις χώρες με σκιαγράφιση.

Από την παραπάνω έρευνα διαπιστώνουμε την ύπαρξη των μη Ευρωπαϊκών στελεχών σε υψηλή συχνότητα σε καρκινικά δείγματα. Ένα άλλο στοιχείο που πρέπει να κρατήσουμε από την έρευνα είναι η εμφάνιση της καρκινογόνου δυναμικής των υποτάξεων του E variant E-350T και E-350-G. Η αντικατάσταση στη νουκλεοτιδική θέση 350 (T→G) στο E6 γονίδιο οδηγεί σε μία αντικατάσταση του αμινοξέος 83 από βαλίνη σε λευκίνη. Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε σοβαρότητα των αλλοιώσεων.

Σε βιοψίες επιθηλιακών καρκινωμάτων και αδενοκαρκινωμάτων στις ΗΠΑ διαπιστώθηκε ότι ο HPV16 AA σχετίζεται περισσότερο με τα αδενοκαρκινώματα τα οποία έχουν πιο επιθετική φύση. Σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς σε κακοήθειες συναντάμε συνήθως την υπόταξη E350-G.

Όσον αφορά τον HPV16 AA η αυξημένη του ογκογονικότητα οφείλεται κυρίως στην E6 πρωτεΐνη. Η E6 πρωτεΐνη από μία AA ενδοτυπική παραλλαγή διεγείρει περισσότερο την αποδόμηση του p53 από την αντίστοιχη πρωτεΐνη μιας ευρωπαϊκής ενδοτυπικής παραλλαγής. Ακόμα, βρέθηκε ότι και η E2 παίζει σημαντικό ρόλο. Οι παραλλαγές της E2 στα AA variants ίσως υποβοηθούν ένα μηχανισμό αύξησης της

μεταγραφής των πρώιμων ογκογονιδίων. Επίσης, η αντιγραφική ικανότητα των AA variants είναι αυξημένη σε σχέση με τα ευρωπαϊκά. (Sichero et al, 2007)

Συμπερασματικά φαίνεται ότι κάποιες ενδοτυπικές μοριακές παραλλαγές του ιού παρουσιάζουν μεγαλύτερη ογκογονικότητα. Η παγκόσμια κατανομή τους έχει να κάνει τόσο με γεωγραφικές συνισταμένες όσο με εθνολογικές. Δηλαδή, οι πληθυσμοί που έχουν ευρωπαϊκή καταγωγή και νοσούν από νεοπλασίες που οφείλονται στον HPV16 τότε κατά πάσα πιθανότητα ο ιός θα κατατάσσεται σε Ευρωπαϊκή ενδοτυπική μοριακή παραλλαγή, με πιο πιθανή την E-350G. Από την άλλη οι πληθυσμοί από την κεντρική και νότια Αμερική θα έχουν τον ιό που θα κατατάσσεται στο AA variant κ.ο.κ . Από άποψης σοβαρότητας των αλλοιώσεων ο HPV16 AA είναι ξεκάθαρο ότι προκαλεί ευκολότερα νεοπλασίες λόγω των μεταλλάξεων που φέρει στα γονίδια E6 και E2.

1.4.2 Η εξέλιξη του ιού- Η δημιουργία των ενδοτυπικών παραλλαγών

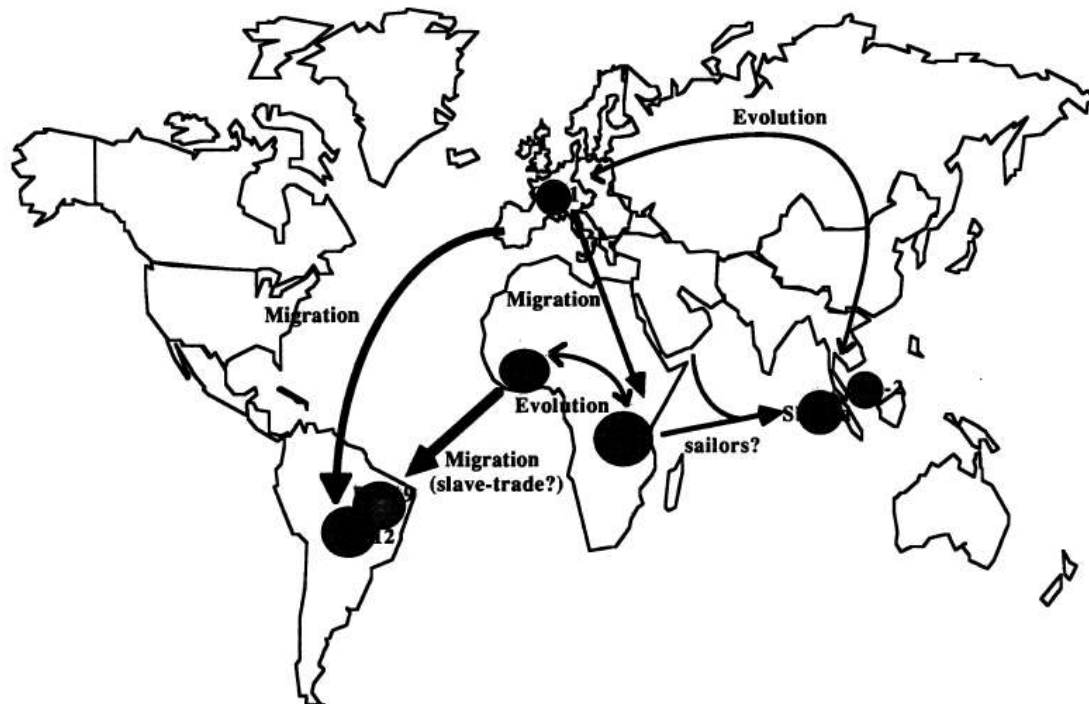
Οι PVs όπως όλοι οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και προσβάλουν μια μεγάλη ποικιλία ειδών. Η ακριβής εξελικτική ιστορία αυτής της οικογένειας ιών, καθώς και η συσχέτιση της με τόσους διαφορετικούς ξενιστές δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Οι διαφορές στο γονιδίωμα στους διάφορους PVs έφερε τη θεωρία της συνεξέλιξης ιού-ξενιστή. (Chan et al. 1992). Σύμφωνα λοιπόν με αυτή την άποψη οι PVs εξελίσσονται μαζί με τους ξενιστές τους εδώ και 300 εκατομμύρια χρόνια. (Shah et al., 2010).

Ο HPV-16 και οι υπόλοιποι γενετικά συσχετιζόμενοι papilloma ιοί ίσως να ήταν παρόντες σε όλη την ανθρώπινη καταγεγραμμένη ιστορία, αν όχι καθ'όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης.

Αυτή η εκδοχή θα πρέπει να συγκριθεί με την άλλη θεωρία η οποία λέει ότι το μεγαλύτερο μέρος της εξέλιξης του ιού έλαβε χώρα στα ζώα και πρόσφατα μεταφέρθηκε στον άνθρωπο. Κάποιοι ιοί έχουν την ικανότητα συχνά να περνάνε από είδος σε είδος. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει και τη δημιουργία καινούργιων γενοτύπων, όπως ακριβώς συμβαίνει και στους ιούς της γρίπης. Κάποιοι ιοί το κάνουν συχνά και κάποιοι σπάνια η μόνο μία φορά. Ο HPV ίσως κάποτε έκανε αυτό το «ταξίδι».

Η σύγκριση των γενωμικών αλληλουχιών έχει γίνει ένα πανίσχυρο επιδημιολογικό και φυλογενετικό εργαλείο. Με βάση αυτό διαπιστώθηκε ότι οι τύποι του ιού που προσβάλλουν τον ίδιο ή παρόμοιο επιθηλιακό υπότυπο, σχετίζονται περισσότερο μεταξύ τους από αυτούς που προσβάλλουν διαφορετικούς ιστούς. Έτσι η εξέλιξη του ιού δεν έχει σχέση μόνο με την συνεξέλιξή του με τον ξενιστή αλλά και με τον ιστό στον οποίο στοχεύει. Έτσι, ο HPV-16 έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον HPV-18 παρά με τον HPV-1 (Chan et al., 1992).

Σε φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε πάνω στη γενωμική περιοχή LCR σε κλινικά στελέχη του HPV-16 από δείγματα που προέρχονταν από τη Σιγκαπούρη, Βραζιλία, Γερμανία και Τανζανία συμπεραίνεται ότι ο ιός εξελίχθηκε ξεχωριστά για μεγάλο χρονικό διάστημα σε δύο περιοχές της Αφρικής και στην Ευρασία. Οι διασπορά των διαφόρων παραλλαγών έγινε κατά την έλευση των αποίκων στον Νέο Κόσμο, κατά τα ταξίδια των Αράβων ιστιοπλόων στην Άπω ανατολή και κατά το δουλεμπόριο σκλάβων από την Αφρική. Έτσι φαίνεται ότι υπήρξε μία πανδημία του ιού στον Νέο Κόσμο τους προηγούμενους αιώνες. Ένα ακόμη συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι ο HPV-16 είναι ένας πολύ καλά ορισμένος τύπος ιού, αφού όλες οι παραλλαγές του παρουσιάζουν μέγιστη γενωμική απόκλιση περίπου 5%. Η φυλογενετική ανάλυση καθενός γονιδίου του ιού ξεχωριστά φαίνεται να δίνει διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα γεγονός το οποίο υποδεικνύει διαφορετική εξελικτική ιστορία για το κάθε γονίδιο (Chen et al., 2011, Chan et al. 1992).



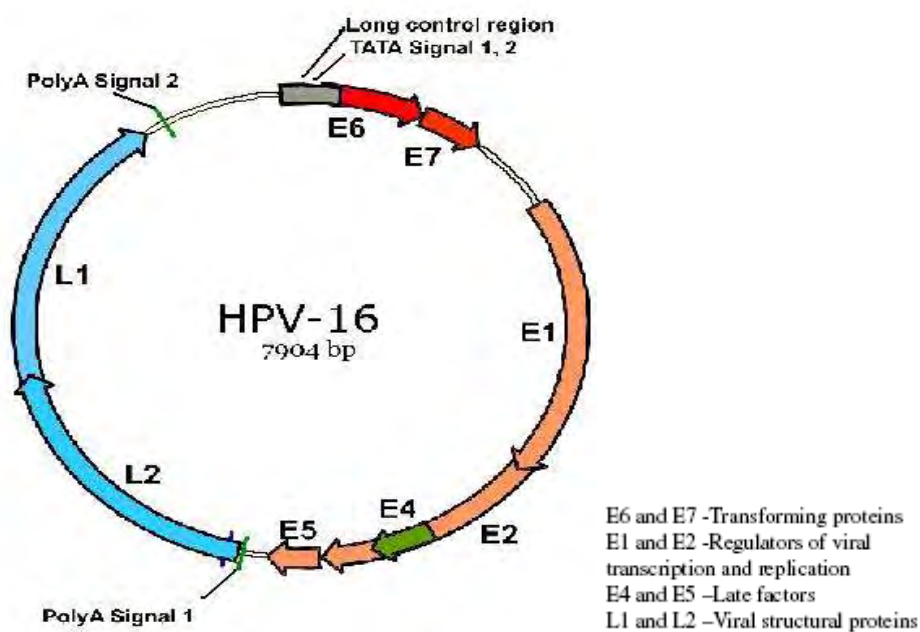
Εικόνα 5: Μοριακή εξέλιξη και αποδημητική διασπορά των παραλλαγών του HPV-16. Οι Αφρικάνικες και Ευρασιατικές παραλλαγές του ιού αναπαριστώνται στις διαφορετικές περιοχές εξέλιξης τους ύστερα από την άγνωστη κοινή τους καταγωγή. Επίσης, αναπαριστάται η διάδοση των παραλλαγών αυτών στον Νέο Κόσμο.

2. Δομή των papilloma ιών (HPVs) του Ανθρώπου

2.1 Οργάνωση του γενόματος

Το γονιδίωμα των HPV αποτελείται από δίκλωνο DNA (dsDNA) σε κυκλική διάταξη, μεγέθους περίπου 8 kb και μοριακού βάρους περίπου $5,2 \times 10^6$ daltons. Το γενετικό τους υλικό εξωτερικά περιβάλλεται από ιστόνες κυτταρικής προέλευσης και συναρμολογείται σε νουκλεοσώματα που του δίνουν τη μορφή μικρού χρωμοσώματος, (zur Hausen 2000) . Τα ιικά γενόματα έχουν 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται από μια μόνο αλυσίδα DNA. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) διακρίνονται σε πρώιμες E (Early) και καθυστερημένες L (Late) περιοχές καθώς και την ρυθμιστική περιοχή LCR (ή URR). Οι πρωτεΐνες E1-E2 και E4-E5-E6-E7 περιέχουν την πληροφορία για τον διπλασιασμό του ιού καθώς και για τον καρκινικό μετασχηματισμό του κυττάρου (Danos O et al 1982). Οι περιοχές L1-L2 κωδικοποιούν για τα δομικά πολυπεπίδια του καψιδίου του ιού. Οι 3 περιοχές σε όλους τους papillomaviruses (E, L, LCR) διαχωρίζονται από 2 περιοχές πολυαδενυλίωσης (pA): πρώιμες (early) pA (AE) και όψιμες (late) pA (AL) περιοχές (Zheng, Baker, 2006). Στους ιούς HPV υψηλής επικινδυνότητας τα μετάγραφα προκύπτουν από 2 βασικούς υποκινητές. Ο 1ος βρίσκεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της E6 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (είναι ο p97 στους HPV-16 και 31 ενώ ονομάζεται p105 στους HPV-18) (Smotkin et al 1986). Ο 2ος υποκινητής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων, στον HPV-31 ονομάζεται p742 (Hummel N. et al., 1992). Στον HPV-16 ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann

K et al 1996). Η περιοχή LCR έχει μέγεθος περίπου 850bp και βρίσκεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της E6. Σε αυτή την περιοχή συνδέονται μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν τον πρώιμο υποκινητή. Η LCR δεν έχει κωδική λειτουργία και αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής. Επίσης φέρει σημαντικές θέσεις δέσμησης για τη ρύθμιση της RNA πολυμεράσης 2, η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφής τόσο από τους πρώιμους όσο και από τους όψιμους προαγωγείς (Zheng, Baker, 2006).



Εικόνα 6: Οργάνωση του γονιδιώματος των HPV

2.2 Τα προϊόντα των ORFs

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η E1 πρωτεΐνη διαθέτει το πιο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ανάμεσα στους ιούς papilloma. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυ-λειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενόματος (Ustav and Stenlund, 1991). Η E1 πρωτεΐνη έχει 2 ιδιότητες: λειτουργεί ως ATPάση και ως 3' - 5' ελικάση (Hughes et al 1993, Seo et al 1993, Yang et al 1993). Κατά αυτόν τον τρόπο η E1 πρωτεΐνη έχει διπλή λειτουργία. Ως ATPάση αναγνωρίζει πλούσιες σε A και T περιοχές της θέσης έναρξης της αντιγραφής, προσδένεται στην LCR προκαλώντας δομικές αλλαγές (Frattini et al 1994, Muller et al, 1997) Χρησιμοποιεί τη δραστικότητα της 3'-5' ελικάσης για να ξεδιπλώσει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρήσει η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et al., 1995). Η E1 αποτελείται από μια N-τελική περιοχή, μια ενδιάμεση περιοχή και μια C-τελική περιοχή, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ATPάσες και ελικάσες. Η ενδιάμεση περιοχή μπορεί να δεσμεύει το DNA (Van G et al 2002).

Η δραστικότητα της ATPάσης τοποθετείται στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της E1 του HPV-11 συμβάλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές (Thorner LK et al. 1993). Αυτή η περιοχή της E1 είναι επίσης υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του ξενιστή (Masterson J. et al 1998).

Η E1 προσδένεται αδύναμα στην θέση έναρξης της αντιγραφής όμως αυτή η πρόσδεση ισχυροποιείται όταν σχηματίζει σύμπλοκο με την E2 (Frattini et al 1994, Dixon et al 2000, Lu et al 1993, Sun et al 1996). Οι θέσεις πρόσδεσης της E2 γειτνιάζουν με τις θέσεις αναγνώρισης της E1. Ως εκ τούτου η E2 βοηθάει στην προσέγγιση της θέσης έναρξης της αντιγραφής από την E1. Η E1 πρωτεΐνη δημιουργεί εξαμερείς δακτυλίους τους οποίους διαπερνά το DNA και κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το DNA ξεδιπλώνεται (Sedman et al 1998, Liu et al 1998). Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης γίνεται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών (chaperone proteins). Η περιοχή δέσμευσης DNA της E1 είναι χαρακτηριστική και αποτελείται από μια εκτεταμένη θηλιά και μια α -έλικα. . Ακόμα η δραστικότητα της

E1 ρυθμίζεται και από την αλληλεπίδρασή της με τις κυκλίνες A και E. Παράλληλα 4 περιοχές φωσφορυλίωσης των κυκλινικών κινασών (cdks) βρίσκονται στην E1 και πιθανή μετάλλαξη τους μειώνει την αντιγραφική ικανότητα της E1 (Ma et al 1999).

Η E1 φαίνεται να είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (White et al.2005).

2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2, μεγέθους περίπου 50 kDa, δημιουργεί διμερή και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού DNA και την μεταγραφική ρύθμιση (Laimins et al 1998). Οι λειτουργικές περιοχές C και N έχουν κρυσταλλοποιηθεί με την C περιοχή να κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης του DNA και να σχηματίζει διμερή δομή β-βαρελίου που προσδέεται στο DNA (Hegde et al, 1992). Η N περιοχή σχηματίζει μια α έλικα η οποία είναι πλούσια σε γλουταμίνες ανάμεσα σε ένα πλαίσιο β-sheet (Antson et al 2000). Τα διμερή της E2 προσδέονται σε παλινδρομικές αλληλουχίες (ACCN6GGT) που ονομάζονται E2BSs (Laimins et al, 1998). Υπάρχουν 4 από αυτές τις αλληλουχίες εντός της περιοχής LCR (Howley et al,1996), μία εκ των οποίων βρίσκεται γειτονικά της ιικής περιοχής της αντιγραφής. Η δέσμευση της E2 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση της E1 ελικάσης στην ιική περιοχή, η οποία δεσμεύει στην συνέχεια κυτταρικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA, συμπεριλαμβανομένου της RPA (replication protein A) και την πριμάση της DNA πολυμεράσης α (Loo et al 2004, Masterson et al 1998, Conger et al 1999, Han et al 1999). Κατά τη μόλυνση στο στάδιο της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδέονται στις περιοχές E2BSs (Steger et al, 1997). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις E2, προάγεται η έκφραση των πρώιμων γονιδίων ενώ σε υψηλές οι μεταγραφικοί παράγοντες TFIID και Sp1 εκτοπίζονται από τις E2BSs έτσι ώστε η E2 να δρα ως καταστολέας και να εμποδίζει την μετάφραση των πρώιμων γονιδίων (Demeret et al 1997, Dostatni et al 1991). Συγκεκριμένα, η E2 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και μπορεί να ρυθμίσει τον ικό πρώιμο υποκινητή (p97 στον HPV16) και ελέγχει την έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ σε υψηλά επίπεδα η E2 καταστέλλει την έκφραση των ογκογονιδίων εκτοπίζοντας τον

μεταγραφικό ενεργοποιητή SP1 από μια γειτονική περιοχή στον πρώιμο υποκινητή (Doorbar et al 2006).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E4

Ένας όψιμος υποκινητής που εντοπίζεται στην LCR περιοχή είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρωτεϊνών του E4 ORF. Έτσι, αν και βρίσκεται στην πρώιμη περιοχή εκφράζει όψιμες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του εκφράζονται στα διαφοροποιημένα κύτταρα του επιθηλίου, σε κύτταρα στα οποία εξελίσσεται η παραγωγική αντιγραφή του ιού (Doorbar J., et al. 1991).

Οι πρώτες γνώσεις που αποκομίσαμε για την E4 πρωτεΐνη του HPV, προέρχονταν από μελέτες πάνω στην E4 του HPV 1 (Roberts et al., 1994).

Η πρωτεΐνη E4 του ιού HPV εκφράζεται κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης ζωής του ιού ως το τρίτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης σε πολυκιστρονικά μετάγραφα (Remm et al 1999). Την συναντάμε κυρίως στο κυτταρόπλασμα και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται από ματισμένα μετάγραφα τα οποία περιλαμβάνουν τα 5 πρώτα αμινοξέα της E1 έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι ενωμένες οι πρωτεΐνες E1^{E4}, κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 δεν διαθέτει το κωδικόνιο έναρξης AUG και χρησιμοποιεί την E1 για να ξεκινήσει τη μετάφραση (Howley P.M 1996).

Η ιική πρωτεΐνη E1-E4 εκφράζεται σε αφθονία κατά τη διάρκεια παραγωγικών μολύνσεων με τον ιό και συμπίπτει με την έναρξη της ενίσχυσης του ιικού γενώματος (Wang et al., 2009).

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). Στα στελέχη υψηλής επικινδυνότητας ιών HPV, η έκφραση της E1^{E4} μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση του δικτύου των κερατινοκυττάρων στα κύτταρα, υποδεικνύοντας το ρόλο της E1^{E4} στην έξοδο των ιικών σωματιδίων (Doorbar et al 1991). 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 το οποίο απαιτείται για την καταστροφή των ινιδίων κερατίνης, σχετίζεται επίσης με τον πολυμερισμό της E4 (Wang et al., 2009). Έτσι η πρωτεΐνη E4 διαταράσσει την ακεραιότητα της κερατίνης (Doorbar, 1991, Wang et al. 2009) συνεισφέροντας άμεσα στην ανάδυση του ιού στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα.

Επιπλέον η E4 πρωτεΐνη εμπλέκεται και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθώς αλληλεπιδρά με την E4-DBD, μια RNA ελικάση που εμπλέκεται στο μάτισμα του mRNA, στη μεταφορά καθώς και στην έναρξη της μετάφρασης (Yoshioka et al 2000).

Γενικότερα, οι Papilloma ιοί διαμορφώνουν τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό να δημιουργήσουν ένα κυτταρικό περιβάλλον που θα επιτρέπει την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων (Davy et al. 2002).

Στους HPV 1, HPV 18, HPV 16 και HPV 11 η E1^{E4} σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2, αντισταθμίζοντας την επίδραση της E7, η οποία ωθεί τα κύτταρα στην φάση S (Wang et al., 2009). Συγκεκριμένα η E4 του HPV-16 μπορεί να εμποδίσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καθώς αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B/Cdk1 και κυκλίνη A/Cdk2 κατά τη φάση G2 και αυτό οδηγεί στην παύση του κυτταρικού κύκλου στο όριο G2/M απομονώνοντας αυτές τις πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα (Davy et al 2005). Επίσης η HPV 16 E1^{E4} φωσφορυλιώνεται από τις CDK1, CDK2, ERK, PKA, PKC α, με τις CDK1/2 σερίνη 32 και ERK θρεονίνη 57 φωσφορυλιώσεις να αντιπροσωπεύουν τα δύο πρωταρχικά γεγονότα στον κυτταρικό κύκλο. Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 57(T57), πυροδοτεί μία δομική αλλαγή στην E1^{E4} στην κεντρική αναδιπλωμένη περιοχή, οδηγώντας σε μία αύξηση στη σταθερότητα και γενικά στην αφθονία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο κύτταρο. Η συνέκφραση με την ιική πρωτεΐνη E5 και η ενεργοποίηση της ERK αυξάνει την T57 φωσφορυλίωση υποδεικνύοντας έτσι μία πιθανή συνεργασία E1^{E4}-E5 in vivo. Η E5 η οποία διεγείρει την ERK και κωδικοποιείται από το E1^{E4}-E5 τρανσκρίπτωμα ίσως καθορίζει τη δράση της E1^{E4} (Wang et al., 2009).

Η E5 δεν είναι η μοναδική πρωτεΐνη του ιού που πιστεύεται ότι έχει σχέση με την E4. Η E2 είναι μία ακόμη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά μαζί της. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η E2 και η E4 έχουν αλληλεπικαλυπτόμενα ORFs, χωρίς όμως να εκφράζονται ταυτόχρονα. Αυτό το γεγονός κίνησε το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς ήταν αρκετά πιθανό οι λειτουργίες των δύο πρωτεϊνών να συσχετιζόνταν. Έτσι,

αποδείχθηκε ότι η E4, όχι μόνο έχει την ικανότητα να προσδένεται στον εαυτό της, αλλά και στην E2 γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό της E2 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Καμία άλλη ιική πρωτεΐνη δεν συνδέεται με την E4. Επίσης, βρέθηκε ότι η E2 αυξάνει τα επίπεδα της E1^{E4} καθώς και ότι η E1^{E4} σταθεροποιεί τα επίπεδα της E2 (Davy et al. , 2009). Ακόμη, η E1^{E4} πρωτεΐνη του HPV-16 έχει την δυνατότητα να επάγει την απόπτωση καθώς έχει μελετηθεί η σύνδεση και αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια (Raj et al., 1994).

2.2.6 Μεταλλαγμένες E4 ιικές πρωτεΐνες

Έρευνες μεταλλαξογέννησης αποκαλύπτουν μία περιοχή πλούσια σε προλίνη ανάμεσα στα αμινοξέα 17 και 45 της HPV16 E1^{E4} ως μία περιοχή σημαντική για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Μετάλλαξη σε αυτή την περιοχή, έστω και σημειακή, έχει ως αποτέλεσμα την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου.

Ο συντονισμός του κυτταρικού κύκλου από την πρωτεΐνη E1^{E4} υποδεικνύεται και από το γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα γενώματα του ιού που είναι ανίκανα να παράγουν ολόκληρη την πρωτεΐνη, παρατηρείται αύξηση της διαφοροποίησης των κυττάρων σε λοιμώξεις από τους συγκεκριμένους μεταλλαγμένους ιούς σε σχέση με τις λοιμώξεις με αγρίου τύπου DNA ιούς. (Davy et al. , 2002).

Σε περιπτώσεις όπου έχουμε ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και κατά συνέπεια η πρωτεΐνη δεν μεταφραστεί ολόκληρη, σε αρκετούς τύπους υψηλού κινδύνου HPV και στον papilloma ιό ενός είδους λαγού (cottontail rabbit), έχουμε χαμηλά επίπεδα ενίσχυσης του ιικού γενώματος πράγμα που φανερώνει τον σημαντικό ρόλο της E1^{E4} πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια του παραγωγικού σταδίου του κύκλου ζωής του HPV (Nakahara, et al, 2005, Peh, et al. 2004 , Wilson, et al. , 2005, Wilson, et al 2007.) Τα ανωτέρω συμπεράσματα έχουν βασισθεί κυρίως στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, SiHa, Saos-2 και άλλες (Davy et al. , 2002, Roberts et al. 1994).

2.2.7 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης ζωής του ιού ως το τέταρτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης σε πολυκιστρονικά μετάγραφα (Remm et al 1999). Η E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη χωρίς πλήρως καθορισμένη λειτουργία. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στα συστήματα Golgi και περιστασιακά σε κυτταρικές μεμβράνες (Conrad et al. , 1993). Στους βόειους papilloma ιούς (BPVs), εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό των κυττάρων και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et al 1986).

Η μικρή ομολογία της E5 του HPV με την αντίστοιχη περιοχή του BPV, υποδεικνύει ένα διαφορετικό τρόπο δράσης για την E5 του HPV, η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα EGF. Έτσι, η υπερέκφραση της E5 του HPV, επάγει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα EGF, αποτρέποντας την αποδόμησή του (Conrad et al 1993, Rodriguez et al 2004, Straight et al 1993/1995).

Η E5 πρωτεΐνη του HPV εκφράζεται κυρίως στη όψιμη φάση του κύκλου του ιού σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Στο γένωμα του HPV 31, η E5 επηρέασε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα.

Επιπλέον, η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται όντως στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Fehrmann et al 2003). Η E5 είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει στην έναρξη της καρκινογένεσης ή στην παθογένιση της HPV μόλυνσης. Πράγματι, ορισμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η E5 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του αντιγόνου του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II (Zhang B et al 2003).

2.2.8 Η ιική πρωτεΐνη E6

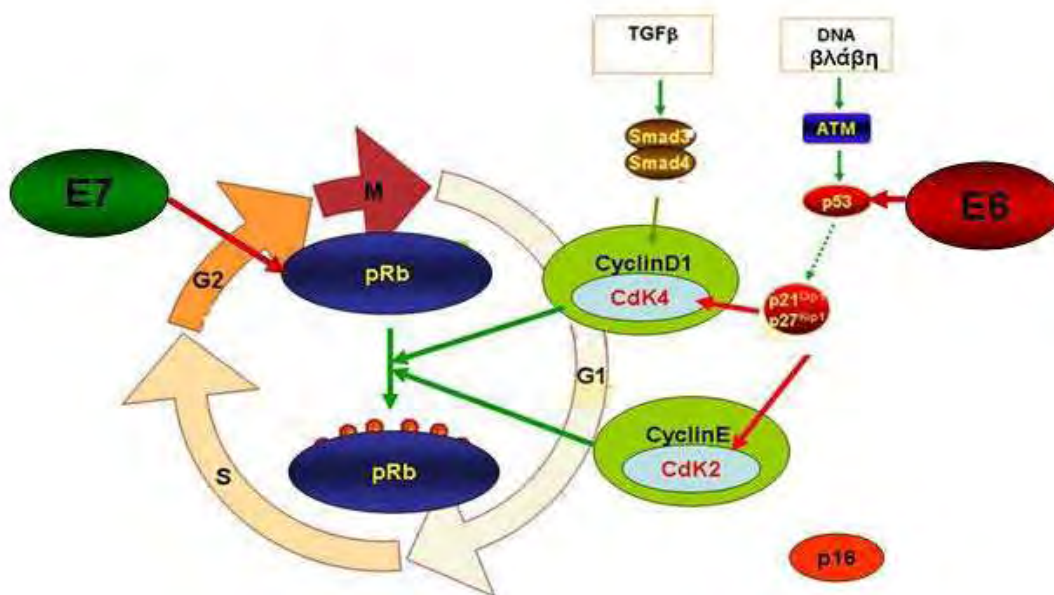
Η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 151 αμινοξέα και περιέχει δύο περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου αποτελούμενες από τέσσερα μοτίβα CXXC, (εικόνα 7) (Barbosa MS et al. ,1989, Cole ST et al. , 1987).



Εικόνα 7 : Σχηματική απεικόνιση της ογκοπρωτεΐνης HPV16 E6. Η αλληλουχία περιέχει δύο μοτίβα σύνδεσης ιόντων ψευδαργύρου, (μπλε). Το E6 καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα μοτίβο σύνδεσης πρωτεΐνης PDZ (κίτρινο).

Η πρωτεΐνη E6 παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού HPV καθώς και στην κυτταρική αθανатоποίηση και μετασχηματισμό. Η αλληλεπίδραση της E6 με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη TP53 είναι από τους μηχανισμούς ογκογένεσης της E6 που μελετήθηκαν πρώτοι και επίσης ο καλύτερα χαρακτηρισμένος. Ο μεταγραφικός παράγοντας *p53* είναι το πιο συχνά απενεργοποιούμενο ογκοκατασταλτικό γονίδιο στους καρκίνους του ανθρώπου και σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες stress (Oren M, 2003, Vousden, 2002, Volgestein et al. , 2002).

Η απενεργοποίηση του *p53* από την E6 επηρεάζει πολλές λειτουργίες που σχετίζονται με την απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, τη γήρανση (senescence) και τη διαφοροποίηση. Η απενεργοποίηση του *p53* από την πρωτεΐνη E6 ξεκινά με τη δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ της E6 και της TP53 (E6-TP53) το οποίο ακολούθως σημαίνεται με το ένζυμο E6AP (E6 associated protein) που δρα ως λιγάση ουβικιτίνης. Αποτέλεσμα της σήμανσης είναι η μεταφορά του συμπλόκου στο χώρο διάσπασης των πρωτεϊνών (πρωτεάσωμα) και η αποδόμησή του (διάσπαση σε πεπτίδια), (Werness et al, 1990, Li X. et al, 1996). Η επαγόμενη από την E6 αποδόμηση της TP53, η οποία είναι ειδική για τους ιούς HPV υψηλού κινδύνου, έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι εφικτοί οι κύριοι ελεγκτικοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχει η TP53, με πολλαπλά ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως: απώλεια ελέγχου της έναρξης της φάσης S, απώλεια ελέγχου του μηχανισμού της απόπτωσης (Nguyen et al. , 2007).



Εικόνα 8: Επίδραση των ογκοπρωτεϊνών HPV E6 και E7 στην είσοδο του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η μείωση των επιπέδων της TP53 από την E6 οδηγεί σε μη ελεγχόμενη λειτουργία του p21CIP1 και συνεπώς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 2 και 4, πρωτεϊνών κλειδιά στην ενεργοποίηση της pRb. Παράλληλα, η ογκοπρωτεΐνη E7 του ιού δεσμεύει την πρωτεΐνη pRb, υπεύθυνη για την είσοδο στη φάση S. Η ταυτόχρονη διαταραχή του ελέγχου των κυκλινών και η δέσμευση της πρωτεΐνης pRb οδηγούν σε έξοδο από τη φάση G1 και είσοδο στη φάση S, δηλαδή σε διπλασιασμό του DNA.

Σε πολλά αθανатоποιημένα και καρκινικά κύτταρα η ενεργότητα της τελομεράσης είναι αυξημένη, ενώ απεναντίας είναι απύσχα στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης (Kim et al. , 1994, Meyerson M et al. , 1997) .Η τελομεράση είναι υπεύθυνη για την προστασία του γονιδιώματος μέσω της επιδιόρθωσης και προστασίας των άκρων του, δηλαδή των τελομερών. Όταν η τελομεράση είναι ανενεργή, η μείωση του μήκους των τελομερών εισάγει το κύτταρο στη φάση του κυτταρικού θανάτου (Wang et al. 2007, Veldman et al. 2001) . Η ενεργοποίηση της τελομεράσης από την E6 επιτυγχάνεται μέσω της υπερέκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT του ενζύμου (Nguyen et al. , 2007, Veldman et al. 2001) .

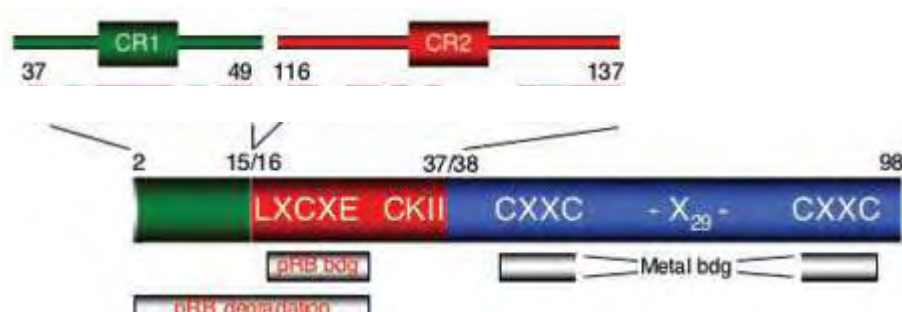
Έχουν περιγραφεί δύο διακριτοί μηχανισμοί, ανεξάρτητοι του p53, σχετικά με την υπερέκφραση της hTERT από την E6 (Klingelutz et al. ,1996) :

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

β. έμμεση ενεργοποίηση του ίδιου προαγωγέα μέσω αποδόμησης στο πρωτεάσωμα του NFX1-91, ενός καταστολέα του προαγωγέα της hTERT (Gewin, 2001, Gewin et al. , 2004, James et al. ,2006)

2.2.9 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου αποτελείται από 98 αμινοξέα και περιέχει τρεις συντηρημένες, στους διάφορους τύπους περιοχές, οι οποίες αναφέρονται ως CR1, CR2 και CR3 (conserved regions, CR) και είναι σημαντικές για την ογκογόνο δράση του ιού. Η περιοχή CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE και μεσολαβεί στη σύνδεση των πρωτεϊνών της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Datto et al., 1995, Dyson et al., 1989, Munger et al.,1989). Στο καρβοξυτελικό άκρο της E7 βρίσκεται η περιοχή CR3 που περιλαμβάνει μια περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου καθώς περιέχει ένα μοτίβο CXXC. Στην περιοχή αυτή συνδέονται διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της E2F (Munger et al. , 1992), των p21CIP1 και p27KIP1 καθώς και των αποακετυλασών των ιστονών τάξης I (histone deacetylases, HDACs) (Brehm et al. ,1999) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της ογκοπρωτεΐνης HPV16 E7.

Η βασική λειτουργία της E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb, p107, p130), οι οποίες λειτουργούν ως καταστολείς όγκων (Dyson N. et al., 1989). Η E7 διαθέτει θέσεις φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα σερίνης 31 και 32 (Howley 2006). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με

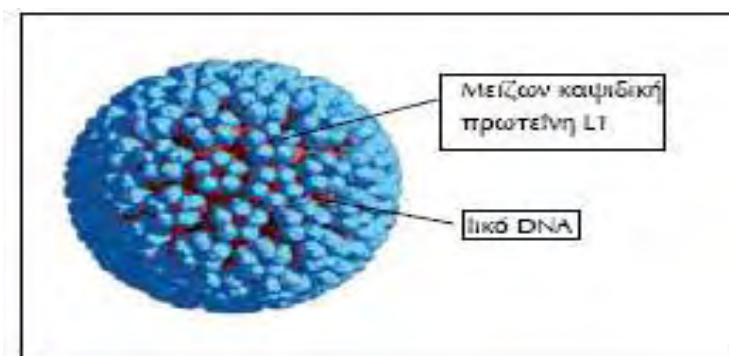
τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1 με συνέπεια να ενεργοποιείται και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA (Dyson N. et al., 1998). Η πρωτεΐνη E7 δεσμεύει την αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου E2F/DP1 και κατ' επέκταση τον συνεχή πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη pRb εμφανίζουν οι πρωτεΐνες E7 τόσο των ιών χαμηλού όσο και των ιών υψηλού κινδύνου, όμως η σύνδεση των τελευταίων είναι 10 φορές ισχυρότερη και είναι αυτή που οδηγεί την πρωτεΐνη pRb για αποδόμηση στο πρωτεάσωμα (Munger et al., 1992). Επίσης, η E7 αλληλεπιδρά και με την απακετυλάση των ιστονών (histone deacetylase, HDAC) (Brehm A. et al., 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η συνεργασία της με την pRb στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν μολυνθεί από HPV, η Rb προσδένει τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές που εξαρτώνται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Οι HDACs αφαιρούν ακετυλομάδες από πλούσιες σε λυσίνη αμινοτελικές ουρές ιστονών οι οποίες συγκροτούν τα νουκλεοσώματα. Επιπροσθέτως, μπορούν να απακετυλιώσουν απευθείας τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους και κατ' επέκταση την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Marks P. et al., 2001). Η E7 συνδέει ταυτόχρονα την Rb και την HDAC, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στον υπερπολλαπλασιασμό και την αθανασία των μολυσμένων κυττάρων (Liu Y. et al., 1999). Η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21 CIP1, p27 KIP1 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. (Funk J.O et al., 1997).

2.2.10 Όψιμη πρωτεΐνη HPV L1 (Late, L)

Το καψίδιο των ιών HPV αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2 (Larsen et al. , 1987). Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η L1, η οποία έχει μέγεθος 55 kDa και είναι καλά διατηρημένη μεταξύ των διαφόρων ιών HPV. Η πρωτεΐνη L1 οργανώνεται σε έναν σχηματισμό 72 πενταμερών με μια εικοσαεδρική δομή, όπου T=7 (Baker et al. , 1991, Hangensee et al. , 1994). Η πρωτεΐνη L1 όταν εκφράζεται ως ευκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να αυτο-οργανώνεται σε ψευδοϊοσωμάτια (virus-like particles, VLP) (Kirnbauer et al. , 1993, Rose et al. , 1993, Zhou et al. , 1991, Hagensee et al. , 1993). Τα VLP εμφανίζουν τους ίδιους επίτοπους όπως και οι πραγματικοί ιοί, οι οποίοι είναι ειδικοί για τον κάθε τύπο του ιού (Christensen et al. , 1990, Kirnbauer et al 1994). Φαίνεται ότι το αμινοξύ 202 είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την οργάνωση των VLP της πρωτεΐνης HPV16 L1, καθορίζοντας τόσο τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών (Volpers et al. 1994). Εμβολιασμός με L1 VLPs προστατεύει από τη μόλυνση από papilloma ιούς (Yang R et al 2004).

Μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη L1 κατευθύνεται στον πυρήνα, μέσω σημάτων πυρηνικής εντόπισης (nuclear localization signals, NLS) του καρβοξυτελικού άκρου της (Sun et al. , 1995). Τα NLS είναι μικρές αλληλουχίες 8-10 αμινοξέων που περιέχουν μεγάλη αναλογία θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνη και αργινίνη) (Silver PA, 1991). Η πρωτεΐνη HPV L1 περιέχει δύο NLS αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο της (Zhou et al. , 1991). Η συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των επιμολυσμένων κυττάρων. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση των HPV L γονιδίων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, καθώς δεν υπάρχει σύστημα κυτταροκαλλιέργειας in vitro για τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του ιού. Η έναρξη μεταγραφής του γονιδίου L1 και η δημιουργία του ιού συνδέεται στενά με το στάδιο διαφοροποίησης των επιμολυσμένων κυττάρων. Οι πρωτεΐνες L1 ανιχνεύονται κυρίως σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης των όψιμων γονιδίων HPV και της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης είναι πιθανό να ρυθμίζεται από περιοχές του ιικού mRNA με ρυθμιστική δράση και από ιικούς μεταγραφικούς παράγοντες που συντίθενται στα προσβεβλημένα κύτταρα (E6, E7).

Διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί σε παράγοντες που σχετίζονται με την αυτορρύθμιση των ιών HPV. Φαίνεται ότι το mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη L1 του καψιδίου των ιών HPV περιέχει αλληλουχίες που αναστέλλουν την έκφραση της L1 μετα-μεταγραφικά (Tan et al. ,1995). Υπάρχει, συγκεκριμένα, ένα ανασταλτικό στοιχείο στην όψιμη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (untranslated region, UTR) του ιού HPV16 το οποίο δρα ανεξάρτητα (Kennedy et al. , 1991). Έτσι, μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών των ιών HPV περιορίζεται στα τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα (Tan et al. ,1995). Τέτοιες ανασταλτικές αλληλουχίες έχουν, επίσης, βρεθεί σε όψιμες 3' UTR άλλων τύπων ιών HPV, όπως ο HPV1, γεγονός που καταδεικνύει ότι οι αλληλουχίες αυτές είναι συντηρημένες και παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού (Tan et al. 1995). Έχουν αναγνωριστεί δύο πυρηνικές και δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συνδέονται ειδικά σε RNA αλληλουχίες πλούσιες σε αδερίνη και ουρακίλη (AU) (Zhao et al. , 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές δε συνδέονται στις 3' UTR των HPV1 πρώιμων mRNA, τα οποία δεν έχουν ανασταλτική δραστηριότητα. Επομένως, οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να συμμετέχουν στην αναστολή της έκφρασης των L γονιδίων των ιών HPV1 σε μη διαφοροποιημένα επιθήλια (Zhao et al. , 1996).



Εικόνα 10: Αναπαράσταση καψιδίου HPV όπου διακρίνεται η L1 πρωτεΐνη.

2.2.11 Όψιμη πρωτεΐνη HPV L2 (Late, L)

Η πρωτεΐνη HPV L2 (50 kDa) περιέχει σήματα πυρηνικής εντόπισης (NLS) για τη μεταφορά της στον πυρήνα μετά από τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα. Η λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι σαφής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι παρόλο που δε χρησιμεύει για τη σύνδεση υποδοχέων, η πρωτεΐνη L2 απαιτείται για τη λοιμογόνο δράση του ιού (Larsen et al., 1987, Roden et al., 1994, Zhou et al., 1993). Η πρωτεΐνη L2 βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την πρωτεΐνη L1, σε αναλογία 1/10 (Doorbar et al., 1987). Ενώ η ανασυνδυασμένη L1 πρωτεΐνη αυτό-οργανώνεται σε σωματίδια που μοιάζουν με ιοσωμάτια, η οργάνωση ενισχύεται από την παρουσία της πρωτεΐνης L2, η οποία μπορεί να απαιτείται για τη συνάθροιση των λοιμογόνων σωματιδίων του ιού καθώς και για τη σύνδεση στο DNA (Zhou et al., 1991, Hagensee et al., 1993, Zhou et al., 1994). Όταν τα σήματα πυρηνικής εντόπισης NLS αποκόπτονται από την πρωτεΐνη L1, οι ακρωτηριασμένες L1 πρωτεΐνες διασπείρονται σε ολόκληρο το κύτταρο. Μετά, όμως, από τη συνέκφραση της πρωτεΐνης L2 αυτές κατευθύνονται εκ νέου στον πυρήνα (Zhou et al., 1994).

Μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο η πρωτεΐνη L2 και όχι η L1 μπορεί να συνδεθεί στο DNA του ιού HPV. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης L2 και ιδιαίτερα των πρώτων 12 αμινοξέων (λυσίνης ή αργινίνης) (Zhou et al., 1994) θεωρείται σημαντικότερο στη συναρμολόγηση των HPV καψιδίων, εισάγοντας το DNA του ιού HPV στα ιικά σωματίδια που δημιουργούνται από την πρωτεΐνη L1 (Zhou et al., 1994). Έτσι φαίνεται ότι η πρωτεΐνη L2 κατευθύνει την L1 σε συγκεκριμένη θέση στον πυρήνα. Όταν η πρωτεΐνη HPV L1 συνεκφράζεται με την L2, η πρωτεΐνη L1 εμφανίζει διάστικτη εντόπιση σε μερικά κύτταρα, παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης HPV L2 στα ίδια κύτταρα (Zhou et al., 1994).

ORF:	Λειτουργία Πρωτεΐνης
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγμα του ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμύκησης στην αντιγραφή του DNA.
E2	Υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση αντιγραφής. Υπάρχει σε δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός καταστολέας. Δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή του ιικού γενώματος.
E3	Άγνωστη λειτουργία.
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, επάγει την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hHERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της pRb, ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

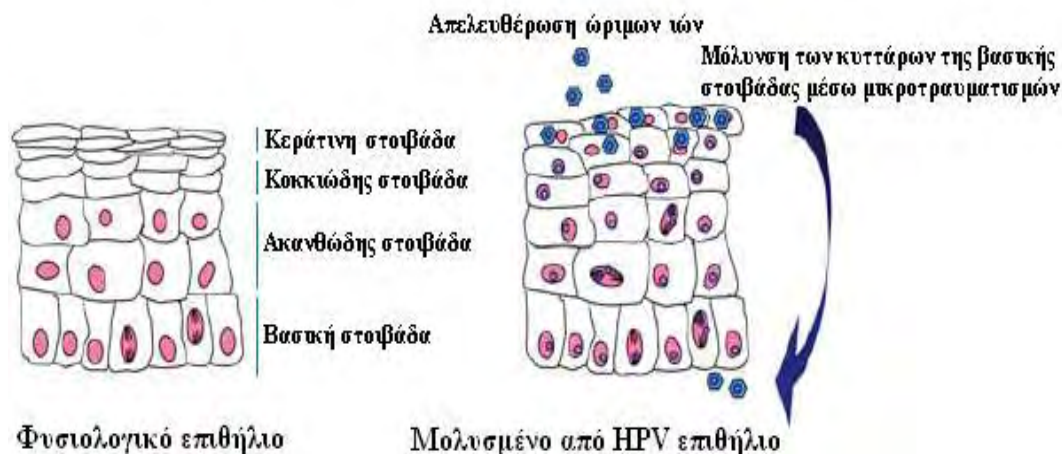
3. Ο κύκλος ζωής των HPVs

3.1 Η μόλυνση με τον ιό

Η μόλυνση με τον ιό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους παρακάτω τρόπους:

- 1) Με σεξουαλική επαφή, γυναίκες που εναλλάσσουν πολλούς σεξουαλικούς συντρόφους έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να μολυνθούν από HPV.
- 2) Μετάδοση από την μητέρα στο νεογέννητο, όπου παρατηρούνται αλλοιώσεις ανάλογες των κονδυλωμάτων στο αναπνευστικό σύστημα του νεογνού.
- 3) Μετάδοση χωρίς σεξουαλική επαφή (επαφή με ουρογεννητικά εκκρίματα). (Fraiser, 1994).

Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στιβάδας (εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Η παρουσία του HPV στο επιθήλιο και η μόλυνσή του από αυτόν.

Η έναρξη της μόλυνσης ξεκινά με την πρόσβαση του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Διαμάχη υπάρχει όσον αφορά τη φύση του επιφανειακού υποδοχέα του κυττάρου, ο οποίος επιτρέπει την αρχική σύνδεση του ιού στο κύτταρο, αν και οι

περισσότερες μελέτες προτείνουν μια εξάρτηση στην παρουσία της θειικής ηπαρίνης (Giroglou T. et al., 2001, Joyce J.G. et al., 1999). Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon C.S. et al., 2001). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμινίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp T.D. et al., 2006). Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση, μια αργή διαδικασία με χρόνο ημιζωής ωρών, σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού. Στη συνέχεια τα σωματίδια του ιού αποδιατάσσονται σε ενδοσώματα και σε λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (Day P.M. et al., 2004, Culp T.D. and Christensen N.D. 2004, Day P.M. et al., 2003, Selinka H.C. et al., 2002). Η έκδυση του papillomaviruses μπορεί να διευκολυνθεί από την διάσπαση ενδοκαψομεριδιακών δισουλφιδικών δεσμών στο αναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου, επιτρέποντας το ιικό DNA να μεταφερθεί στον πυρήνα. Το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Σε σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 (Selinka H.C. et al., 2002).

3.1.1 Τα στάδια της μόλυνσης με HPV

Τα στάδια εξέλιξης της HPV μόλυνσης μπορούν να οριοθετηθούν ως εξής (Μορτάκης Α., 1999):

- 1) Φάση επώασης (Incubation Phase): Μετά την είσοδο του ιού στα κύτταρα του επιθηλίου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, το γονιδίωμα του HPV, μεταφέρεται στον πυρήνα τους χωρίς να ενσωματώνεται στα χρωμοσώματά τους (επισωμικό). Η φάση αυτή διαρκεί από 6 εβδομάδες έως 8 μήνες, και

χαρακτηρίζεται από την εξάπλωση της μόλυνσης σε μεγάλες επιφάνειες του επιθηλίου του κατώτερου γεννητικού συστήματος, που έχει ως συνέπεια μια αρχικά σταθερή φλεγμονή του επιθηλίου (“steady state” HPV-infection).

- 2) Φάση ενεργούς έκφρασης (Active expression phase): Η περαιτέρω αύξηση της μόλυνσης παρατηρείται σε άτομα ευαίσθητα από ανοσολογική άποψη. Στην περίπτωση αυτή, ο HPV, εισέρχεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, προκαλώντας υπερπλασία. Τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας διαφοροποιούνται και ωριμάζοντας, ανέρχονται προς τις επιφανειακές στοιβάδες, μεταφέροντας τη μόλυνση και στις υπόλοιπες στοιβάδες του επιθηλίου, όπου παρουσιάζεται κοιλοκυτταρική ατυπία ή άλλα σημάδια φλεγμονής από τον ιό. Παράλληλα δημιουργείται υπερπλασία του επιθηλίου και των αγγείων του στρώματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση κλινικών και υποκλινικών αλλοιώσεων. Εάν είναι πιο έντονες οι μεταβολές στα αγγεία τότε δημιουργούνται εξωφυτικά κονδυλώματα. Εάν είναι πιο έκδηλες οι μεταβολές στο επιθήλιο, τότε εμφανίζονται υποκλινικές αλλοιώσεις γνωστές και ως λαυκάζουσες αλλοιώσεις, οι οποίες εμφανίζονται με εμβροχή με διάλυμα οξικού οξέος 5%.

- 3) Φάση εξισορρόπησης (Host Containment Phase): Περίπου ένα εξάμηνο μετά την προσβολή του με τον ιό, ο οργανισμός αντιδρά ανοσολογικά αντισταθμίζοντας τη δραστηριότητα του HPV, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται νέες αλλοιώσεις ή να επιβραδύνεται ο ρυθμός εμφάνισής τους. Η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού έχει ως αποτέλεσμα την αυτόματη υποχώρηση των κονδυλωμάτων στο 20% περίπου των περιπτώσεων. Επειδή οι γνώσεις μας για την απάντηση του οργανισμού υπολείπονται, η θεραπευτική μέθοδος στην οποία μπορούμε να καταφύγουμε είναι οι επανειλημμένες καταστροφές των αλλοιώσεων, με χειρουργική αφαίρεση ή καυτηριασμό μέχρι να ενεργοποιηθεί το αμυντικό σύστημα του ξενιστή.

- 4) Απώτερη φάση (Late phase): Ορίζεται χρονικά περίπου 9 μήνες μετά την εμφάνιση της πρώτης αλλοίωσης. Στη φάση αυτή οι ασθενείς χωρίζονται σε 2 κατηγορίες : Σε αυτούς που η κατάστασή τους βρίσκεται σε ύφεση και

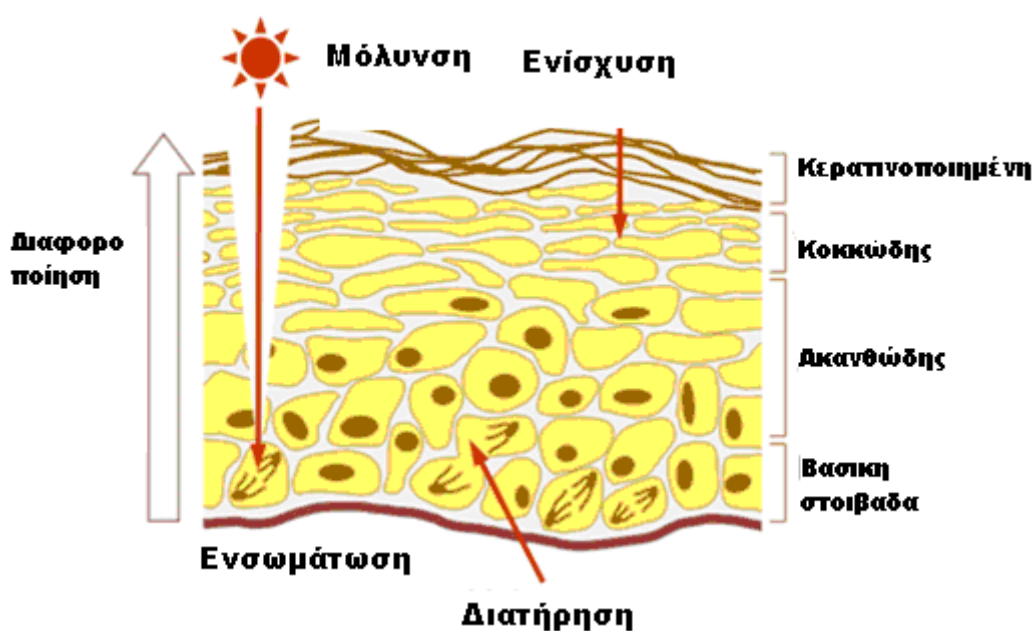
θεωρείται ότι θεραπεύτηκαν, αν και το DNA του ιού μπορεί να συνεχίσει να ανιχνεύεται για πολλά χρόνια ακόμα στους ιστούς τους, και σε αυτούς που υποτροπιάζουν ή συνεχίζουν να βρίσκονται στη φάση της ενεργούς έκφρασης, και συνιστούν την ομάδα υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση νεοπλασιών.

3.2.1 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Προκειμένου να παραχθούν λοιμογόνιοι ιοί, είναι απαραίτητο να αντιγραφεί το ιικό DNA και να σχηματιστούν τα ιικά σωματίδια. Αυτό συμβαίνει στις μεσαίες ή ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες μετά από αύξηση της ενεργότητας του όψιμου εκκινητή. Ο όψιμος προαγωγέας εδράζεται στο πλαίσιο ανάγνωσης της E7 και η ενεργοποίησή του οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντιγραφή του ιικού DNA, όπως οι E1, E2, E4 και E5, χωρίς να επηρεάζεται άμεσα η έκφραση των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την είσοδο στη φάση S, όπως οι E6 και E7 (Middleton et al., 2003).

Η αντιγραφή του γενώματος των HPV κατά την διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την ενσωμάτωση, την διατήρηση και την ενίσχυση (εικόνα 3.3). Κατά την διάρκεια της φάσης της ενσωμάτωσης που ακολουθεί την μόλυνση, ένα HPV γένωμα μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και ξεκινά αρκετούς γύρους αντιγραφής και φτάνει 50 - 100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Σε αυτό το σημείο το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Ακολουθώντας την ενσωμάτωση, το ιικό γένωμα αντιγράφεται, μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, κατά μέσο όρο ένα σε κάθε κυτταρικό κύκλο κατά την διάρκεια της φάσης S, με την διατήρηση ενός σταθερού αριθμού αντιγράφων για περιόδους, που περιορίζεται σε δεκάδες εξαιτίας της ρύθμισης της έκφρασης των E1 και E2 από την E2 πρωτεΐνη (Steger and Corbach 1997, Stubenrauch et al., 1998b). Τα επίπεδα της E2 ρυθμίζουν την πρώιμη ιική μεταγραφή. Σε μικρό αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της E2, η E2 ενεργοποιεί την έκφραση από τον πρώιμο υποκινητή ο οποίος οδηγεί στην έκφραση των E1 και E2, ενώ, από την άλλη, η E2 σε υψηλά επίπεδα, παρεμποδίζει την μεταγραφή (Stubenrauch et al., 1998b). Μ' αυτόν τον τρόπο, η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και ο αριθμός των αντιγράφων του

ικού γενώματος πιστεύεται ότι διατηρούνται σε ένα σταθερό, ευνοϊκό επίπεδο στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Κατά την διαφοροποίηση, η μεταγραφή των αντιγραφικών γονιδίων εξαρτάται, όχι πλέον από τον E2-ρυθμιζόμενο πρώιμο υποκινητή, αλλά από τον περισσότερο ενεργό όψιμο υποκινητή ο οποίος είναι ανεξάρτητος από την πρωτεΐνη E2 (Klumpp and Laimins, 1999). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των E1 και E2 πρωτεϊνών αντιγραφής από αυτόν τον ειδικό υποκινητή οδηγούν στην ενίσχυση του ιικού γενώματος σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R. et al., 2006). Ανάλυση των επιπέδων των ιικών μετάγραφων κατά την διάρκεια της σύνθεσης του DNA υποδηλώνει ότι η E1 πρέπει να είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ενίσχυσης του ιικού γονιδιώματος (Ozbun and Meyers, 1998a).



Εικόνα 12: Οι τρεις φάσεις της αντιγραφής του γενώματος του HPV (ενσωμάτωση, διατήρηση και ενίσχυση).

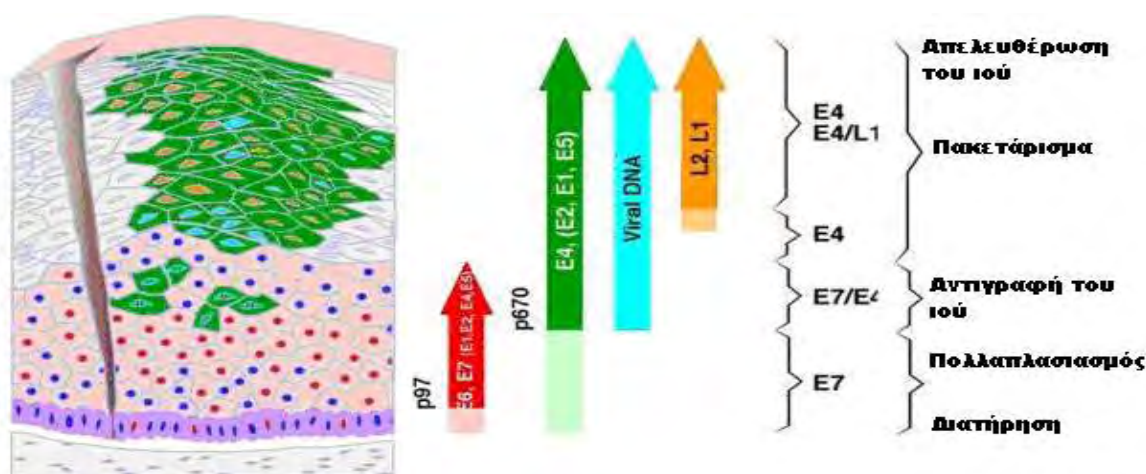
3.2.2 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης στο γονιδίωμα των ιών HPV αναφέρονται συχνά ως γονίδια, αν και είναι γνωστό ότι ένα γονίδιο δεν είναι συνώνυμο με ένα πλαίσιο ανάγνωσης. Όσον αφορά στους ιούς των θηλωμάτων, μόνο ένα πλαίσιο ανάγνωσης (E1[^]E4) εκτείνεται σε δύο ξεχωριστά εξόνια. Καθώς ένα συγκεκριμένο πλαίσιο ανάγνωσης μπορεί να περιλαμβάνεται σε διάφορα αγγελιαφόρα RNA (mRNA) τα οποία μεταγράφονται από διαφορετικούς προαγωγείς, ότι συμπεραίνεται ότι είναι δύσκολο να καθοριστεί με ακρίβεια από ποιο μετάγραφο κωδικοποιείται κάθε ιική πρωτεΐνη. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τη χαρτογράφηση της μεταγραφής του HPV16 και τη γονιδιακή έκφραση προσπαθούν να αποσαφηνίσουν αυτό το θέμα.

Το γονιδίωμα του ιού HPV16 περιλαμβάνει δύο κύριους προαγωγείς, τους P97 και P670. Ο προαγωγέας P97 βρίσκεται πριν από το πλαίσιο ανάγνωσης E6 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων σχεδόν των πρώιμων γονιδίων (Smottkin, 1986). Ο προαγωγέας P670 βρίσκεται μέσα στην περιοχή του πλαισίου ανάγνωσης E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassman et al ,1996). Παρόλο που έχουν περιγραφεί και άλλοι ελάσσονες προαγωγείς στις πρώιμες περιοχές του γονιδιώματος (Rosertiene et al ,2003), οι δράσεις τους στο επισωματικό γονιδίωμα των ιών HPV δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

Η δράση του προαγωγέα P97 HPV16 ελέγχεται ιδιαίτερα στενά και αποτελεσματικά από περιοχές DNA που προηγούνται (cis upstream elements) και αφορούν στη ρυθμιστική περιοχή LCR. Αυτά τα στοιχεία αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και με την ιική πρωτεΐνη E2, ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση του προαγωγέα από τα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στοιβάδας έως τα καλώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα (Bernard, 2002). Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η πρωτεΐνη E2 λειτουργεί κατασταλτικά στη μεταγραφική δραστηριότητα του P97 μόνο σε κύτταρα όπου ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο γονιδίωμα και όχι σε επισωματική μορφή (Bechtold, 2003). Τα πρώιμα πρωτογενή μετάγραφα (pre-mRNAs) που προκύπτουν έχουν όλα τρία εξόνια και δύο ιντρόνια, τα οποία υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) και πολυαδενυλίωση στο νουκλεοτίδιο 4215. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή

τουλάχιστον 14 διαφορετικών ειδών μεταγράφων mRNA με ποικίλο δυναμικό κωδικοποίησης. Ο προαγωγέας P670 HPV16 (Grassman et al ,1996) αφορά στην έκφραση των όψιμων γονιδίων και είναι λειτουργικός μόνο σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Όσον αφορά στον τρόπο ενεργοποίησης του όψιμου προαγωγέα P670, φαίνεται ότι αυτός ρυθμίζεται από ένα τμήμα της αλληλουχίας που εδράζεται στην περιοχή που κωδικοποιεί τις E6 και E7 (Bodily, Meyers, 2005, Spink, 2005). Παρόλα αυτά, ο προαγωγέας P670 βρίσκεται στην περιοχή που κωδικοποιεί την E7 και απαραίτητη προϋπόθεση για την έκφραση της όψιμης περιοχής είναι η παράκαμψη της περιοχής της πρώιμης πολυαδενυλίωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μετάγραφο του όψιμου pre-mRNA να είναι ένα χμαιρικό μετάγραφο αποτελούμενο από πρώιμες και όψιμες περιοχές, με την πρώιμη περιοχή στο 5' μισό και την όψιμη περιοχή στο 3' μισό του. Αυτό το όψιμο premRNA υφίσταται επεξεργασία και μπορεί να εξελιχθεί σε μετάγραφο είτε της πρώιμης είτε της όψιμης περιοχής, ανάλογα με τη θέση κατάτμησης και πολυαδενυλίωσης. Σε αντίθεση με τα πρώιμα μετάγραφα, τα μετάγραφα της όψιμης περιοχής είναι ανιχνεύσιμα μόνο σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα με βλαστική αντιγραφή του DNA (Barksdale, 1993).

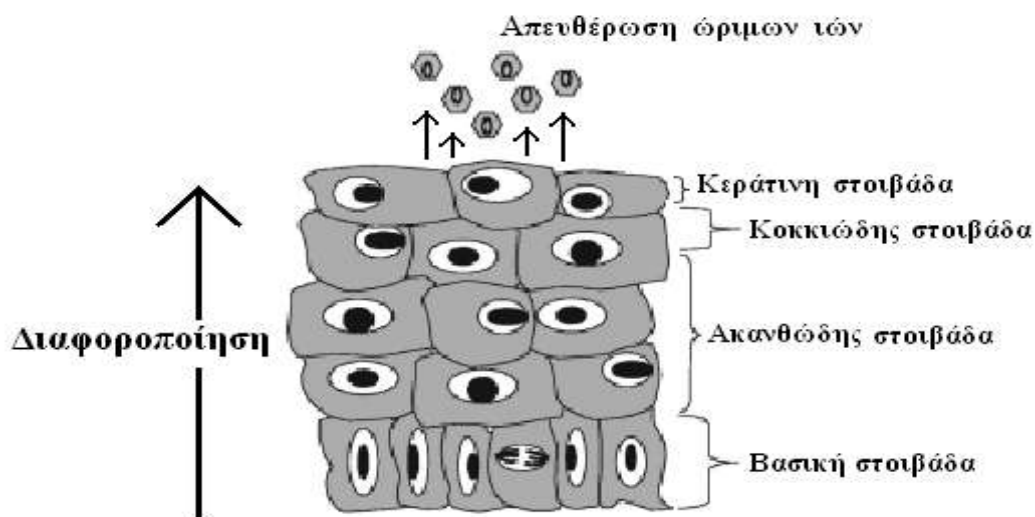


Εικόνα 13 : Συνοπτική απεικόνιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος.

3.2.3 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Οι ιοί HPV κωδικοποιούν δύο δομικές πρωτεΐνες, τις L1 και L2, οι οποίες εκφράζονται στις ανώτερες στοιβάδες του προσβεβλημένου επιθηλίου (Ozgun, 1996).

Η L2 είναι μια ελάσσων καμψιδική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται, όπως και η L1, στα κύτταρα που εκφράζουν την E4 (Doorbar et al. , 1998). Η μείζων καμψιδική πρωτεΐνη είναι η L1, η οποία εκφράζεται έπειτα από την L2 και επιτρέπει τη συναρμολόγηση των ιοσωματίων στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου (Florin et al. , 2002). Τελικά, ο ιός πρέπει να εξέλθει από το επιθηλιακό κύτταρο και να επιβιώσει στο εξωκυττάριο περιβάλλον πριν προκαλέσει την επαναλοίμωξη. Οι HPV δεν είναι λυτικοί ιοί και δεν απελευθερώνονται προτού τα προσβεβλημένα κύτταρα φτάσουν στην επιθηλιακή επιφάνεια. Οι ιοί HPV είναι ανθεκτικοί στην αποξήρανση και η επιβίωσή τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον μπορεί να ενισχυθεί αν αποβληθούν περιβεβλημένοι από κερατινοποιημένες φολίδες (Bryan et al. , 2001). Η κατακράτηση των ιικών αντιγόνων ενδοκυττάρια μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου, επηρεάζει τον εντοπισμό του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα, ιδιαίτερα από τη στιγμή που ο ιός έχει αναπτύξει μοριακούς μηχανισμούς που περιορίζουν την παρουσίαση των ιικών επιτόπων στις κατώτερες επιθηλιακές στοιβάδες (Ashrafi et al. ,2002, Marcheti et al. , 2002, Matthews et al. 2003). Φαίνεται, τέλος, ότι η πρωτεΐνη E4 διαταράσσει την ακεραιότητα της κερατίνης (Doorbar, 1991,Wang et al. 2004) συνεισφέροντας άμεσα στην ανάδυση του ιού στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα



Εικόνα 14: Απελευθέρωση των ώριμων HPV ιών από την κεράτινη

3.3 Πρόληψη

Μέχρι σήμερα ο μοναδικός τρόπος προστασίας από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ήταν τα προληπτικά προγράμματα (τεστ Παπανικολάου), με τα οποία διαγιγνώσκονταν οι προκαρκινωματώδεις δυσπλασίες. (Heise A., 2003) Παρά την αποτελεσματικότητα όμως, της μεθόδου, υπάρχουν και σημαντικοί περιορισμοί. Πρόσφατη ανάλυση κατέδειξε ότι η ευαισθησία της δοκιμασίας στην ανίχνευση ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ή διεισδυτικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ήταν 51% και η μέση ειδικότητα ήταν 98%(Franco et al., 2005) Προσθήκη στα προγράμματα ανίχνευσης του DNA των ογκογόνων HPV ιών (PCR) θα αποτελέσει σημαντική εξέλιξη στο διαγνωστικό τομέα. Τα παραπάνω προγράμματα μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, όμως, δεν εμποδίζουν τη λοίμωξη από HPV ή την εμφάνιση προκαρκινωματωδών βλαβών. (Heise A., 2003, Franco et al., 2005)

3.3.1 Εμβόλια

Σημαντικός σταθμός στον τομέα της έρευνας για τη δημιουργία εμβολίων έναντι του ιού σημειώθηκε το 1991 που οι Zhou και συνεργάτες, έδειξαν ότι η καμψιδιακή πρωτεΐνη L1 του HPV-16 όταν εκφρασθεί με γενετικό ανασυνδυασμό δημιουργεί σωματίδια (Virus Like Particles-VLPs) παρόμοια με το φυσικό ιο, αλλά όχι λοιμογόνα (Mahdavi A, Monk BJ.,2005). Αργότερα ο White και οι συνεργάτες ανακάλυψαν ότι χρησιμοποιώντας VLPs (πρωτεΐνες που μοιάζουν με αυτές του ιού – virus like proteins) που είχαν συντεθεί από τη μείζονα καμψιδιακή πρωτεΐνη L1 μπορούσαν να δημιουργήσουν αντισώματα έναντι ειδικών τύπων HPV3. Τα VLPs δε διαθέτουν DNA, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν διακρίνονται από τους αληθινούς ιούς και αποδείχθηκαν εξαιρετικά ανοσογόνα, καθώς προκαλούσαν υψηλό τίτλο εξουδετερωτικών αντισωμάτων μετά την παρεντερική τους χορήγηση (Mahdavi A, Monk BJ.,2005, Franco et al., 2005)

3.3.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η E1 φαίνεται να είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (White et al.2005). Επίσης τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται μία νέα προσέγγιση για θεραπεία που έχει ως βάση τους αδενοεξαρτώμενους ιούς.

Από την ανακάλυψή τους το 1966, οι αδενοεξαρτώμενοι ιοί (AVV) περιγράφονται ως εξαρτώμενοι από βοηθούς ιούς Parvo-ιοί. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα πρόκειται για μη παθογόνους ιούς με ογκοκατασταλτική δράση. Οι AVV φαίνεται ότι εμποδίζουν την HPV-επαγόμενη καρκινογένεση του τράχηλου της μήτρας μέσω της πρωτεΐνης του Rep 78. Η δράση της είναι διττή. Αρχικά η Rep 78 καταστέλλει τη λειτουργία του p97 υποκινητή του HPV16, υπεύθυνου για τη σύνθεση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών (Su P-F. et al. , 2000) και επίσης αναιρεί την ογκογόνο δράση της E7 πρωτεΐνης, αλληλεπιδρώντας με τον κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα E2F-1 και σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο το σύμπλοκο pRB-E2F-1 (Batchu et al.,2001). Καθώς οι AVV δεν θεωρούνται παθογόνοι χρησιμοποιούνται συχνά ως φορείς στη γονιδιακή θεραπεία, σχετικά πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιούν τους AVV ως φορείς για τη δημιουργία εμβολίων που φέρουν το L1 γονίδιο των HPV (Liu D.W. et al. , 2005, Mandic A., et al. , 2004, Herzog J.T. , et al. 2003, Galloway A.D. 2003), και εικάζεται ότι έχουν τόσο προφυλακτική όσο και θεραπευτική δράση, βασισμένοι στη ικανότητα των AVV να καταστέλλουν την HPV-επαγόμενη καρκινογένεση του τραχήλου (Ahn W. S., et al., 2006).

4.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Κλινικά Δείγματα

Για την εκπόνηση της ερευνητικής μελέτης εξετάσθηκαν συνολικά 28 κλινικά δείγματα υψηλού και χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (High και Low Grade). Από αυτά 7 ήταν δείγματα εμβαπτισμένα σε παραφίνη και προήρχοντο από ιδιωτικό ιατρείο, 15 προήρχοντο από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας από τα οποία 8 ήταν δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων και 6 ήταν σε PBS και 5 από το αντικαρκινικό νοσοκομείο των Αθηνών Άγιος Σάββας τα οποία ήταν δείγματα σε Thin prep. Τα δείγματα αυτά είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV16 σε παλαιότερες μελέτες. Η προέλευση των δειγμάτων, η κλινική εικόνα τους καθώς και η κωδικοποίησή τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Προέλευση Δειγμάτων	Κωδικοποίηση	Κλινική Εικόνα
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A3	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A4	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A6	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A13	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A15	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A17	LG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A24	LG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A31	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	A38	LG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL2	LG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL4	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL5	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL6	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL7	HG
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας	PNL11	HG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D2	HG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D4	HG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D7	LG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D14	HG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D16	HG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D34	LG
Ιδιωτικό Ιατρείο	D42	LG
Άγιος Σάββας	747	LG
Άγιος Σάββας	793	LG
Άγιος Σάββας	796	LG
Άγιος Σάββας	858	LG
Άγιος Σάββας	868	LG

Πίνακας 4.1: Κωδικοποίηση , προέλευση των κλινικών δειγμάτων και βαθμός τραχηλικής αλλοίωσης.

4.2 Προετοιμασία DNA

Για την απομόνωση του DNA των κλινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι για κάθε ομάδα δειγμάτων. Για τα Thin prep δείγματα η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με την μέθοδο των Casas I. et al, 1996. Το DNA από τα δείγματα βιοψίας τραχηλικών επιχρισμάτων εκχυλίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Puramen M. et al. 1995. Τέλος, τα δείγματα ιστού εκχυλίστηκαν με την βοήθεια πρωτεΐνάσης K από καλυπτρίδες στις οποίες βρίσκονταν μονιμοποιημένα κύτταρα, με την μέθοδο που περιγράφεται κατωτέρω. Αρχικά, λήφθηκαν τομές διαμέτρου 5-10μm με την βοήθεια νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνάρια (tubes) χωρητικότητας 0,5ml. Κάθε τομή καθαρίστηκε από την παραφίνη με ξυλένιο, ξεπλύθηκε με 96% αιθανόλη, ιζιματοποιήθηκε και αφέθηκε να στεγνώσει. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl 1X extraction buffer (το οποίο περιείχε 20μg ανά μl πρωτεΐνάσης K), 100μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 X PCR buffer (Stratagene, La Jolla USA) καθώς και αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 1 ml. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C overnight ή, εναλλακτικά, στους 55°C για 3 ώρες. Κατόπιν, τοποθετήθηκαν στους 95°C για 15 min ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν τα κυτταρικά κατάλοιπα με σύντομη ανάδευση και το απομονωμένο DNA (υπερκείμενο) αποθηκεύτηκε σε νέα σωληνάρια στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

4.3 Εκκινητικά μόρια PCR για την ενίσχυση του E4 ORF

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και την ενίσχυση με PCR του E4 ORF (288bp) σχεδιάστηκε ένα ζευγάρι εκκινητικών μορίων, με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), με βάση την πρότυπη αλληλουχία του HPV-16 η οποία είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Εκκινητές	Πολικότητα	Αλληλουχίες	Μήκος προϊόντος PCR
3314	Sense	ATGCGGGTGGTCAGGTAAT	598
3912	Antisense	AGCACACAAAGCAAAGCAAAA	

Πίνακας 4.2 :Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR με κατεύθυνση 5´-3´.

4.4 Ενίσχυση του E4 ORF με μεθόδους PCR

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τα παραπάνω εκκινητικά μόρια με σκοπό την ενίσχυση των αντίστοιχων επιμέρους τμημάτων του E4 ORF του ιού. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή με ελεγχόμενες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας για το κάθε στάδιο της αντίδρασης.

4.4.1 Απλή PCR

Κάθε μεμονωμένο δείγμα υποβλήθηκε σε PCR με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων (HPV16 3314 5'-ATGCGGGTGGTCAGGTAAT-3' /HPV16 3912 5'-AGCACACAAAGCAAAGCAAAA-3'). Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ενζύμου Paq5000TM DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla USA). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl. Κάθε σωληνάριο περιείχε:

- 3μl DNA από το υπό εξέταση δείγμα,
- 2 μl του ζεύγους εκκινητικών μορίων (HPV-16 3314/HPV-16 3912) τελικής συγκέντρωσης 50 pmol,
- 6 μl dNTPs συγκέντρωσης 10mM , 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος Paq Reaction Buffer 10x,
- 2,5 units/tube Paq DNA πολυμεράση
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μl.

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

- i. Αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95°C για 2 min
- ii. 40 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	30 sec



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

Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 3 μl H₂O (αντί των 3 μl δείγματος DNA) ελεύθερου από DNases και RNases.

4.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από τις αντιδράσεις PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων σε πηκτώματα (gel) αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο με σκοπό τη δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν σε διαμορφωμένα πηγάδια 10 μl από κάθε προϊόν των αντιδράσεων PCR και AutoNested PCR αφού πρώτα αναμιχθηκαν με 2-3 μl χρωστικής ουσίας. Εν συνεχεία, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 100-140 V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Το “ύψος” σε ζεύγη βάσεων των τμημάτων

εξακριβώθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

4.6 Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA που συλλέχθηκαν

Η κλωνοποίηση πραγματοποιείται διότι στα τραχηλικά δείγματα HPV16 θεωρείται πολύ πιθανή η ταυτόχρονη μόλυνση από διαφορετικά στελέχη HPV16. Έτσι με τη διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης θα προκύψουν μεμονωμένοι κλώνοι ο καθένας από τους οποίους περιέχει το γενωμικό τμήμα από ένα μόνο διακριτό στέλεχος. Επίσης θα καταστεί πιο εύκολη η αλληλούχισή τους. Για να κλωνοποιηθούν, τα τμήματα DNA που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR επεξεργάστηκαν έτσι ώστε να μπορούν να εισαχθούν επιτυχώς σε φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια). Κατόπιν, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα (βακτήρια) τα οποία είχαν επεξεργασθεί κατάλληλα με σκοπό να γίνουν δεκτικά προς τους φορείς και να καταστεί έτσι δυνατός ο τελικός μετασχηματισμός τους. Έπειτα, ακολούθησε καλλιέργεια και επώαση των μετασχηματισμένων βακτηρίων στις κατάλληλες συνθήκες για την κλωνοποίησή τους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συλλογή των επιθυμητών αποικιών – κλώνων και η απομόνωση των φορέων από τα βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, με μία πέψη των πλασμιδιακών φορέων με ένζυμα περιορισμού ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της διαδικασίας.

4.6.1 AutoNested GoTaq 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 μονόκλωνα αυτά άκρα είναι συμπληρωματικά προς την πολυδύναμη θέση ένθεσης των πλασμιδιακών φορέων. Η εισαγωγή αυτή επιτυγχάνεται με πραγματοποίηση μίας AutoNested PCR με την βοήθεια του ενζύμου GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) το οποίο προσθέτει (A) άκρα στους νεοσυντιθέμενους κλώνους. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα με τελικό όγκο 50 μl. Το μείγμα σε κάθε PCR tube περιείχε:

- 2 μl προϊόντος DNA που προέκυψε από την τελευταία αντίδραση PCR,

- 2 μl από το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών από το οποίο προέκυψε το κάθε τμήμα συγκέντρωσης 50 pmol,
- 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,
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50 μl.

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 2 μl H₂O (αντί των 2 μl 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.

4.6.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq

PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση και την εξακρίβωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων από τις αντιδράσεις AutoNested GoTaq PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων σε πηκτώματα (gel) αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όπως ακριβώς περιγράφεται ανωτέρω (4.5).

4.6.3 Απομόνωση των προϊόντων των αντιδράσεων AutoNested GoTaq PCR

από τα πηκτώματα αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης AutoNested GoTaq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης, ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα από κάθε προϊόν. Στη συνέχεια, οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα με χρήση νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα tubes 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.

4.6.4 Αντίδραση Λιγάσης

Αφού οι αλληλουχίες προετοιμάστηκαν με την προσθήκη (A) άκρων μετά την AutoNested GoTaq PCR, ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA). Κατά την αντίδραση αυτή, τα (A) άκρα στα 3' και 5' άκρα των αλληλουχιών συνδέονται με τα αντίστοιχα (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.

4.6.5 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων

Αναγκαία για την διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν η παραγωγή δεκτικών κυττάρων προς τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5a, που επεξεργασθήκαν με κατάλληλη χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο – CaCl₂). Από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολούθησε επώαση για 16 ώρες (overnight) στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, η καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν τακτικές λήψεις 1ml από την καλλιέργεια με σκοπό να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση του διαλύματος σε OD₆₀₀ ώστε να διακοπεί η κυτταρική ανάπτυξη όταν τα βακτήρια βρεθούν σε φάση εκθετική αύξησης, δηλαδή σε επίπεδα οπτικής απορρόφησης A=0,450-0,550. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης, τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 min ώστε να αδρανοποιηθούν. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 4000 rpm για 10min στους 4°C, μετά το πέρας της οποίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε σε 10ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 min στους 4°C, στο τέλος της οποίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε ξανά σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M (0,55g CaCl₂, Sigma, USA, διαλύονται σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 ml).

4.6.6 Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Για κάθε αλληλουχία μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes) 200 μl από το stock δεκτικών κυττάρων και 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση, και τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 min (heat shock). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από όπου ήταν δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα μικροσωληνάρια σε αντίστοιχα falcon που περιείχαν 800μl θρεπτικού μέσου LB Broth και επώαστηκαν στους 37°C σε 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων – “επούλωση”).

4.6.7 Κλωνοποίηση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια

Από κάθε falcon λήφθηκαν 300μl υγρής καλλιέργειας και επιστρώθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε ποσότητα 1,5 μl ανά 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 αμπικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία X-gal η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος που χρωματίζει τις αποικίες-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 αμπικιλίνη σε ποσότητα 1,5μl ανά ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

4.7 Απομόνωση των φορέων από τα πλασμίδια

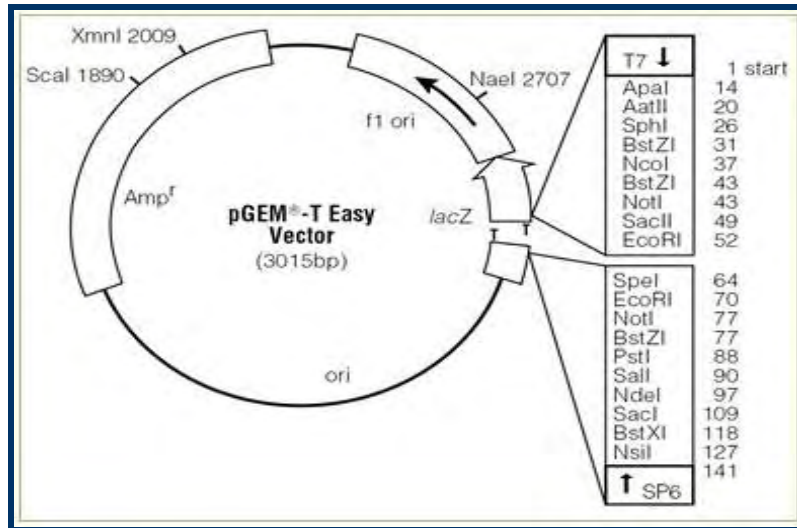
Για να καταστεί δυνατή η αλληλούχιση των ενθεμάτων απαιτείται απομόνωση των φορέων κλωνοποίησης από τα βακτηριακά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin® Plasmid extraction kit (Macherey-Nagel, Germany).

4.8 Πέψη προϊόντων κλωνοποίησης

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.



Εικόνα 15: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector . Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη και της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI. Από www.promega.com.

4.9 Αλληλούχιση των προϊόντων

Η αλληλούχιση των προϊόντων των κλωνοποιήσεων πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

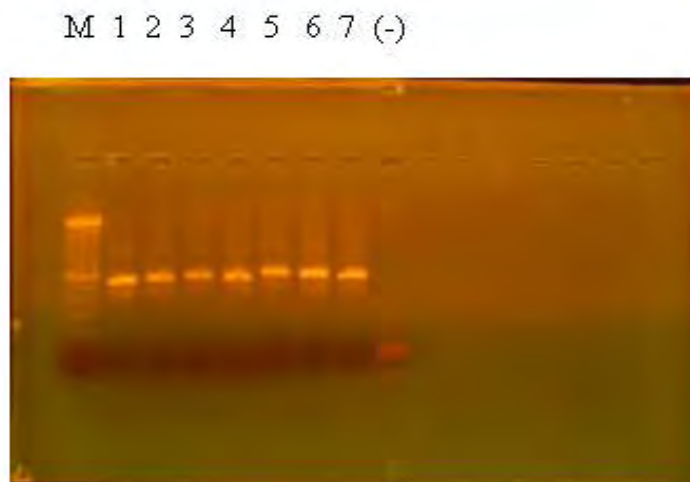
4.10 Επεξεργασία των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Για την ακρίβεια, οι αλληλουχίες που συλλέχθηκαν συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων (GenBank) με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το GeneRunner και τέλος, η πολλαπλή στοίχιση και η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η δημιουργία φυλογενετικών δέντρων με το πρόγραμμα MEGA V.5.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του E4 γονιδίου

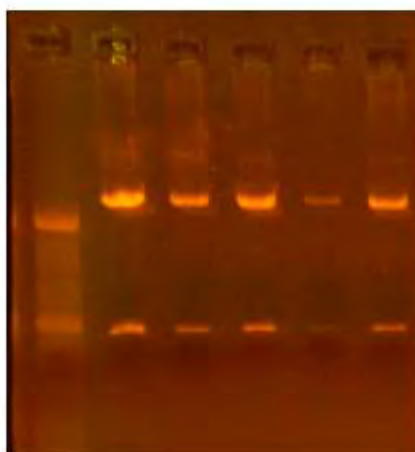
Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E4 γονιδίου με το ζεύγος των εκκινητικών μορίων HPV16 3314/HPV16 3912. Το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος κυμαίνεται στις 598bp. Στη θέση Μ εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στις θέσεις 1-7 εμφανίζονται τα δείγματα A17, A24, A31, A38, PNL2, PNL4, PNL5. Τέλος, εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας (-) ο οποίος αποτελείται από αποστειρωμένο H₂O.



Εικόνα 1 : Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης απλής PCR

6.2 Αποτελέσματα Κλωνοποίησης

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν με PCR και με GoTaq PCR κλωνοποιήθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Παρακάτω ακολουθεί ενδεικτική φωτογραφία από ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη RFLP των προϊόντων κλωνοποίησης με το ένζυμο περιορισμού EcoR1. Από κάθε μεμονωμένο δείγμα συλλέχτηκαν 1-2 κλώνοι για την φυλογενετική και νουκλεοτιδική ανάλυση του E4 γονιδίου.



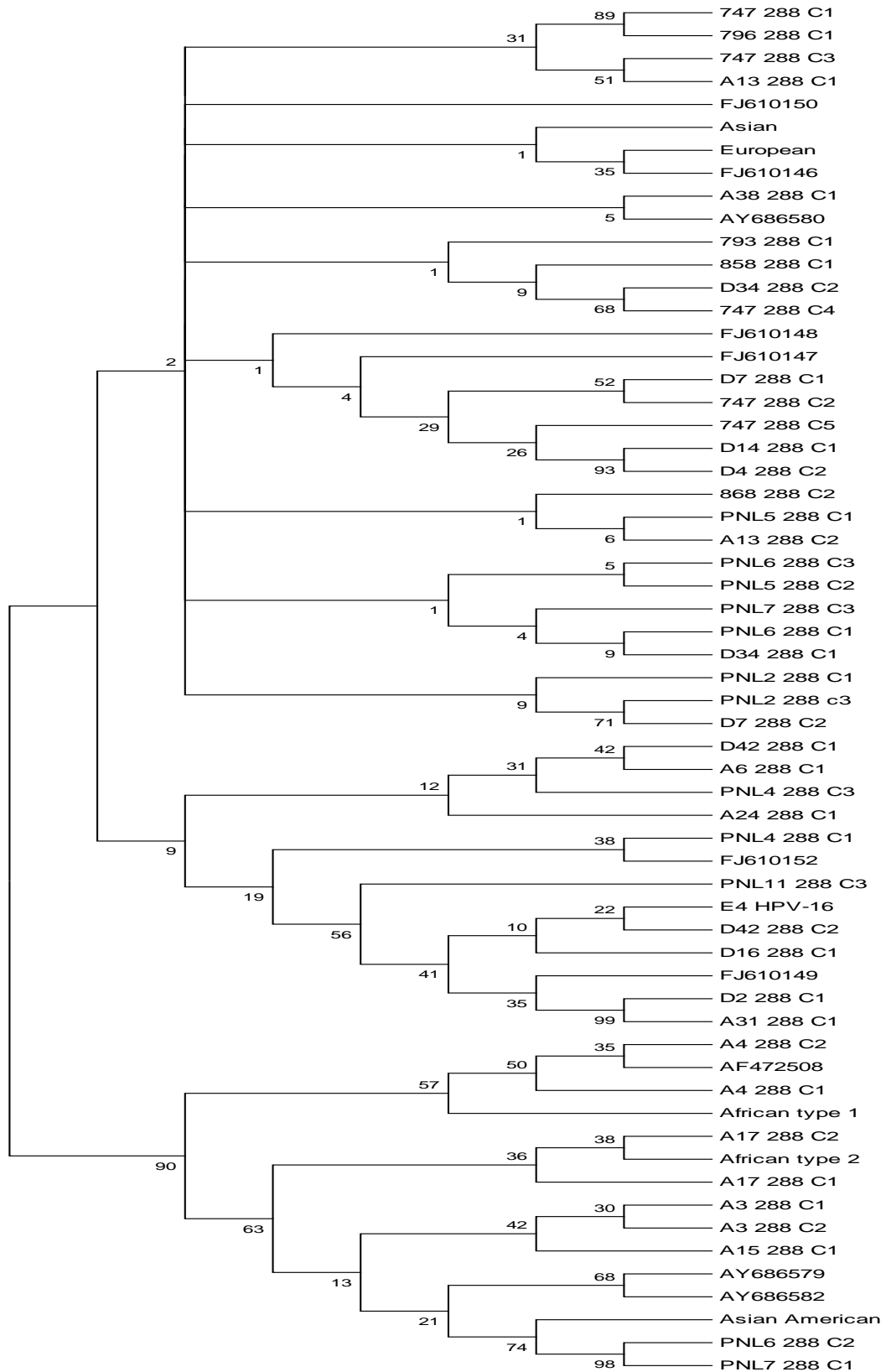
Εικόνα 2: Αποτελέσματα πέψης RFLP με το ένζυμο περιορισμού EcoR1

6.3 Φυλογενετικό δέντρο

Με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής MEGA V.5 έγινε η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Οι αλληλουχίες – κλώνοι που συλλέξαμε επιτυχώς από τα κλινικά δείγματα συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του E4 γονιδίου του πρότυπου στελέχους HPV-16 (HPV16R), αλλά και με τις πρότυπες αλληλουχίες των HPV16 variants. Πιο συγκεκριμένα για το European variant: **AF536179**, **AY686580**, **FJ610148**, **FJ610147**, **FJ610149**, για το Asian American variant: **AY686579**, **AY686582**, **AF402678**, για το African type-1 variant: **AF472508**, **AF472508**, για το

African type-2 variant: **AF472509** και **AF534061**. Το δέντρο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Neighbor-Joining με 1000 bootstraps με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA v.5. Από την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου στην περιοχή E4 του HPV16 παρατηρούμε την δημιουργία διαφορετικών φυλογενετικών κλαδιών κάθε ένα από τα οποία αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό HPV16 variant.

Πιο συγκεκριμένα οι κλώνοι A3C1, A3C2, A15C1, PNL6C2, PNL7C1, A15C1 ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με το Asian American Variant. Οι κλώνοι A4C1, A4C2 με το African type 1 Variant. Οι κλώνοι A17C1, A17C2 με το African type 2 Variant. Όλοι οι υπόλοιποι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν μαζί με το European Variant. Επιλέον υπάρχει ένας σαφής διαχωρισμός μεταξύ μη Ευρωπαϊκών και Ευρωπαϊκών στελεχών με bootstrap value 90% (Yamada et al. 1995). Όπως παρατηρούμε και από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το συγκεκριμένο φυλογενετικό δέντρο τα AA, AF1, AF2 δεν είναι εντελώς διαφοροποιημένα μεταξύ τους όπως αναφέρεται και στην προαναφερθείσα βιβλιογραφία. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι η E4 περιοχή είναι μια μικρή περιοχή του γονιδιώματος του ιού (288bp) από την οποία μπορούν να διεξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για την προέλευση των διαφορετικών HPV16 variants.



Εικόνα 16 : Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από κλώνους της γενωμικής περιοχής HPV16 E4 με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής MEGA V.5

6.4 Αποτελέσματα από ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων οι οποίες ενισχύθηκαν με τα εκκινητικά μόρια HPV16 3314/HPV16 3912 και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής. Η πολλαπλή ομοπαράθεση των κλωνοποιημένων E4 αλληλουχιών με την πρότυπη αλληλουχία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA V.5 με στόχο να εντοπίσουμε νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλλαγές. Σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα των δειγμάτων καθώς και την αντιστοιχία των κλώνων E4 HPV16 με τα διαφορετικά HPV16 variants όπως προέκυψαν από την φυλογενετική ανάλυση κατασκευάστηκαν οι παρακάτω πίνακες (πίνακας 1.1 και 1.2).

Πιο συγκεκριμένα, οι νουκλεοτιδικές αλλαγές στις θέσεις 3360 και 3361 προκαλούν την αμινοξική αλλαγή A7P και A7V στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E1^ΛE4. Η μετάλλαξη G3360C ανιχνεύτηκε σε δύο δείγματα υψηλής αλλοίωσης (PNL6 και PNL7) και στο δείγμα χαμηλής αλλοίωσης (D42). Η μετάλλαξη C3361 ανιχνεύτηκε στο δείγμα χαμηλής αλλοίωσης A17 και στα δείγματα υψηλής αλλοίωσης A3 και A4. Επιπλέον έξι σιωπηλές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στις θέσεις 3362, 3377, 3387, 3410, 3413 and 3449. Δύο διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στην θέση 3387. Πιο συγκεκριμένα η μετάλλαξη T3387C (A3, A15, PNL6, PNL7) δεν προκαλεί αμινοξική αλλαγή στην πρωτεΐνη ενώ η μετάλλαξη T3387A (747, A17) προκαλεί την αμινοξική αλλαγή L16I.

Επιπλέον δύο μεταλλάξεις στις θέσεις 3476 και 3516 προκαλούν τις αμινοξικές αλλαγές D45E and L59I, αντίστοιχα. Η μετάλλαξη C3476A ανιχνεύτηκε σε δύο δείγματα χαμηλής αλλοίωσης (A31, D2). Η μετάλλαξη C3516A εντοπίστηκε στα δείγματα A3, A4 A6, A15 και A31. Μόνο στο δείγμα A4 οδηγεί σε υποκατάσταση Ile στο αμινοξύ 59. Στα υπόλοιπα δείγματα η μετάλλαξη C3516A παρατηρείται σε συνδυασμό με την μετάλλαξη T3517C προκαλώντας την αμινοξική αλλαγή L59T.

Στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την καταστροφή της κεράτινης στιβάδας και τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης βρέθηκαν τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές στις θέσεις 3538, 3556, 3566. Η μετάλλαξη A3538C

προκαλεί την αμινοξική αλλαγή Q66P η οποία ανιχνεύτηκε σε δείγματα που σχετίστηκαν με μη Ευρωπαϊκά στελέχη (A3, A4, A15, PNL6, PNL7, and A17). Η μετάλλαξη C3556T προκαλεί την αμινοξική υποκατάσταση S72F στα υψηλού βαθμού αλλοίωσης δείγματα A4, PNL6 και PNL7. Αυτή η μετάλλαξη συσχετίστηκε με τα African type I και με τα Asian American variants. Επιπλέον η μετάλλαξη T3566G εισάγει την αμινοξική αλλαγή H75Q στα δείγματα A17, A3, A4, και A15. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την φυλογενετική και νουκλεοτιδική ανάλυση συμπεραίνουμε ότι οι αμινοξικές αλλαγές στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης συνδέονται με μη Ευρωπαϊκά στελέχη όπως τα HPV16 Asian American, African type I και African type II variants

		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	
		6	6	6	7	8	1	1	4	6	7	1	1	3	5	6	
CIN	CLONES	0	1	2	7	7	0	3	9	2	6	6	7	8	6	6	Variants
		G	C	A	C	T	C	G	G	C	C	C	T	A	C	T	
	PNL2 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL2 288 C3	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D7 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	European
	D7 288 C2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D34 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D34 288 C2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D42 288 C1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D42 288 C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	747 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	European
	747 288 C2	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	European
	747 288 C3	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
LG	747 288 C4	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	747 288 C5	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	796 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	European
	858 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	868 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	793 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	A17 288 C1	-	-	G	G	A	T	-	A	-	-	A	C	-	-	G	African type II
	A17 288 C2	-	T	G	G	-	T	-	A	-	-	A	C	C	-	G	African type II
	A24 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	A38 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	aminoacid	A7P	A7V	A7A	L12L	L16I	T23T	P24P	P33P	R40R	D45E	L59I	L59T	Q66P	S72F	H75Q	

Πίνακας 1.1

CIN	CLONES	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Variants	
		0	1	2	7	7	0	3	9	2	6	6	7	8	6		6
		G	C	A	C	T	C	G	G	C	C	C	T	A	C	T	
	A3 288 C1	-	-	G	G	-	T	A	A	-	-	A	-	C	-	G	Asian American
	A3 288 C2	-	T	G	G	-	T	A	A	-	-	A	C	C	-	G	Asian American
	A4 288 C1	-	-	G	G	-	T	-	A	-	-	A	-	-	-	G	African type I
	A4 288 C2	-	T	G	G	-	T	-	A	-	-	A	-	-	T	G	African type I
	A6 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	A	C	-	-	G	European
	A13 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	-	-	-	-	-	European
	A13 288 C2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	A15 288 C1	-	-	-	G	-	-	A	A	T	T	A	C	C	-	G	Asian American
	A31 288 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	-	-	European
	D2 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	European
	D4 288 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D14 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	D16 288 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
HG	PNL4 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL4 288 C3	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL5 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL5 288 C2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL6 288 C1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL6 288 C2	C	-	G	G	C	T	-	A	-	-	A	C	C	T	G	Asian American
	PNL6 288 C3	-	-	-	-	-	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL7 288 C1	C	-	G	G	C	T	-	A	-	-	A	C	C	T	G	Asian American
	PNL7 288 C3	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	PNL11 288 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	European
	aminoacid	A7P	A7V	A7A	L12L	L16L	T23T	P24P	P33P	R40R	D45E	L59I	L59T	Q66P	S72F	H75Q	

Πίνακας 1.2

Περιοχή E4		
Δείγμα	Μετάλλαξη	Κλινική εικόνα
A17C1,A17C2	A3362G	LG
A17C1,A17C2, A3C1,A3C2, A4C1,A4C2, PNL6C2,PNL7C1	C3377G	LG+HG
Όλοι οι κλώνοι EKTOΣ των D42C1,D42C2,A15C1,A35C1, D4C1,D16C1	C3410T	LG +HG
747C1,796C1	G3449T	LG
A17C1,A17C2	G3449A	LG
A3C1,A3C2, A4C1,A4C2	A3362G	HG
A3C1,A3C2, A4C1,A4C2, A15C1, PNL6C2,PNL7C1	C3377G	HG
PNL6C2,PNL7C1	T3387C	HG
747C3, A17C1	T3387A	LG
PNL6C3,A31C1, A3C1,A3C2	G3413A	HG
A3C1,A3C2, A4C1,A4C2, A13C1, A15C1, PNL6C2,PNL7C1	G3449A	HG
A15C1, D7C1, 747C2	C3462T	LG+HG

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων (που δεν δίνουν αμινοξική αλλαγή) για την περιοχή E4 HPV16 ανάλογα με την κλινική εικόνα του δείγματος. Με πράσινο σημειώνονται οι μεταλλάξεις που δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Στον παραπάνω πίνακα συγκεντρώθηκαν οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν και δεν προκαλούν παραγωγή διαφορετικού αμινοξέος από το αναμενόμενο. Οι μεταλλάξεις : **G3449T**, **G3413A** και **C3462T** δεν έχουν ξανααναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Περιοχή E4			
Δείγμα	Μετάλλαξη	Αμινοξική Αλλαγή	Κλινική εικόνα
D42C1, PNL6C2,PNL7C1	G3360C	A7P	LG+HG
A17C2, A3C1, A4C2,	C3361T	A21V	LG+HG
747C3, A17C1	T3387A	L16I	LG
PNL6C2,PNL7C1	T3387C	L16I	HG
A17C1,A17C2	C3516A	L59I	LG
A17C1,A17C2	T3517C	L59T	LG
A17C2	A3538C	Q66P	LG
A17C1,A17C2	T3566G	H75Q	LG
PNL6C2,PNL7C1	G3360C	A7P	HG
A3C2,A4C2	C3361T	A21V	HG
A15C1	C3476T	D45E	HG
D2C1,D4C1	C3476A	D45E	HG
A3C1,A3C2, A4C1,A4C2, A6C1,A13C1, A15C1,A31C1, PNL6C2,PNL7C1	C3516A	L59I	HG
A3C2,A6C1, A15C1, PNL6C2,PNL7C1	T3517C	L59T	HG
A3C1,A3C2, A15C1, PNL6C2,PNL7C1	A3538C	Q66P	HG
A4C2, PNL6C2,PNL7C	C3556T	S72F	HG
A3C1,A3C2, A4C1,A4C2, A6C1,A13C1, A15C1, PNL6C2,PNLC1	T3566G	H75Q	HG

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων (που δίνουν αμινοξική αλλαγή) για την περιοχή E4 HPV16 ανάλογα με την κλινική εικόνα του δείγματος. Με πράσινο σημειώνονται οι μεταλλάξεις και οι αμινοξικές αλλαγές που δεν έχουν ξανααναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Στον παραπάνω πίνακα συγκεντρώθηκαν οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν και προκαλούν παραγωγή διαφορετικού αμινοξέος από το αναμενόμενο. Επίσης, αναφέρονται και τα αμινοξέα που παράγει κάθε μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις : **G3360C , C3361T , T3387A, G3360C, C3361T, C3476T, C3476A, C3556T** δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία. Οι αμινοξικές αλλαγές: **A7P, A21V, D45E, S72F** δεν αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία.

<u>Κωδική ονομασία</u>	<u>Πλήρης ονομασία</u>
<u>A</u>	<u>Αλανίνη</u>
<u>D</u>	<u>Ασπαρτικό</u>
<u>E</u>	<u>Γλουταμινικό</u>
<u>F</u>	<u>Φαινυλανανίνη</u>
<u>H</u>	<u>Ιστιδίνη</u>
<u>I</u>	<u>Ισολευκίνη</u>
<u>L</u>	<u>Λευκίνη</u>
<u>P</u>	<u>Προλίνη</u>
<u>Q</u>	<u>Γλουταμίνη</u>
<u>R</u>	<u>Αργινίνη</u>
<u>S</u>	<u>Σερίνη</u>
<u>T</u>	<u>Θρεονίνη</u>
<u>V</u>	<u>Βαλίνη</u>

Πίνακας 8: Πίνακας αντιστοίχισης της πλήρους ονομασίας των αμινοξέων που αναφέρονται στους παραπάνω πίνακες με την κωδικοποίησή τους .

7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι HPV είναι μια ομάδα ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα γύρω από το καψίδιό τους και με δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους περίπου 8.000 ζευγών βάσεων. Προσβάλλουν και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά σε κερατινοκύτταρα (επιθηλιοτροπικοί ιοί). Στις μέρες μας η επιστημονική κοινότητα έχει φτάσει στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συνδέεται άμεσα με την μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) του τραχήλου, μιας και το 99% των περιπτώσεων αυτού του καρκίνου είναι θετικό σε HPV μόλυνση. Οι HPV χωρίζονται σε τρεις ομάδες επικινδυνότητας ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκαλούν στον ξενιστή. Κύριος εκπρόσωπος της ομάδας υψηλής επικινδυνότητας αποτελεί ο ιός HPV16 ο οποίος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

και ακολουθούν οι τύποι 18, 45, 31 οι οποίοι ανήκουν στους HPV υψηλού κινδύνου (high-risk HPV). Οι τύποι υψηλού κινδύνου ευθύνονται για το 90% των περιστατικών καρκίνου της μήτρας. Παρόλο που η χρήση του test pap και του DNA test έχει μειώσει την θνησιμότητα και την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου στις ανεπτυγμένες χώρες, η ασθένεια εξακολουθεί να αποτελεί αιτία θανάτου για χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο ανά τον κόσμο. Ο καρκίνος του τραχήλου είναι ο δεύτερος πιο συχνός, μετά από αυτόν του μαστού, στις γυναίκες κάτω των 35, με 651 νέες περιπτώσεις στη Μεγάλη Βρετανία το 2005.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η φυλογενετική και γενωμική ανάλυση της E4 γενωμικής περιοχής κλινικών στελεχών HPV16 και η συσχέτιση των μη Ευρωπαϊκών στελεχών του ιού με τις νεοπλασίες βάση της συχνότητας εμφάνισής τους σε δείγματα υψηλής αλλοίωσης. Το E4 γονίδιο εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 πρωτεΐνη. Η E1^E4 συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2. Ως εκ τούτου κρίνεται σημαντική η μελέτη του E4 για την ανίχνευση μεταλλάξεων, έτσι ώστε να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα σχετικά με το κατά πόσο μεταλλάξεις στη συγκεκριμένη γενωμική περιοχή μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτης για τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων. Για την πραγματοποίηση της πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 28 κλινικά δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων χαμηλής και υψηλής αλλοίωσης. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με εκκινητικά μόρια για το γονίδιο E4. Σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη

εκκινητικών μορίων HPV16 (3314 5'-ATGCGGGTGGTCAGGTAAT-3' /HPV16 3912 5'-AGCACACAAAGCAAAGCAAAA-3') τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εν λόγω γονιδίου.

Στη συνέχεια, τα δείγματα κλωνοποιήθηκαν. Η μοριακή κλωνοποίηση που ακολούθησε ήταν απαραίτητη καθώς βοήθησε στην δημιουργία μεμονωμένων κλώνων ο καθένας από τους οποίους περιείχε το γενωμικό τμήμα από ένα μόνο διακριτό στέλεχος. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε σχέση με την πρότυπη αλληλουχία για το E4 γονίδιο του HPV-16.

Από το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε (εικόνα 3) σχηματίστηκαν διαφορετικά φυλογενετικά κλαδιά κάθε ένα από το οποίο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό HPV16 variant. Επιπλέον παρατηρείται σαφής διαχωρισμός μεταξύ μη Ευρωπαϊκών και Ευρωπαϊκών στελεχών με bootstrap value 90% (Yamada et al. 1995). Πιο συγκεκριμένα από την φυλογενετική ανάλυση των HPV16 στελεχών με βάση την E4 περιοχή παρατηρήσαμε ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων ομαδοποιήθηκε στο ίδιο φυλογενετικό κλαδί με το European variant. Το γεγονός ότι συναντάμε το E variant σε δείγματα υψηλού βαθμού αλλοιώσεων ίσως συνδέεται με το γεγονός της καρκινογόνου δυναμικής της Ευρωπαϊκής μετάλλαξης E-350. Η αντικατάσταση στη νουκλεοτιδική θέση 350 (T→G) στο E6 γονίδιο οδηγεί σε μία αντικατάσταση του αμινοξέος 83 από βαλίνη σε λευκίνη. Αυτή η αλλαγή έχει συσχετιστεί με υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες και διηθητικό καρκίνο (Yamada et al. 1997).

Επιπλέον το δείγμα χαμηλής αλλοίωσης A17 ομαδοποιήθηκε στο ίδιο φυλογενετικό κλαδί με το African type II variant, το δείγμα υψηλής αλλοίωσης A4 ομαδοποιήθηκε με το African type I variant ενώ τα δείγματα υψηλής αλλοίωσης PNL6, PNL7, A3, A15 συσχετίστηκαν με το Asian American variant. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι μη Ευρωπαϊκά στελέχη κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ ενισχύεται η υπόθεση ότι μη ευρωπαϊκά στελέχη σχετίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα με υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες (Yamada et al, 1997, Casas et al, 1999, Sichero et al, 2007, Berumen et al, 2001). Ωστόσο, από τη νουκλεοτιδική και φυλογενετική ανάλυση εντοπίσαμε ότι διαφορετικοί κλώνοι από το ίδιο δείγμα ομαδοποιούνται με διαφορετικά HPV16 variants (PNL6, PNL7). Από το γεγονός αυτό καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι στα συγκεκριμένα αυτά δείγματα υπάρχει πολλαπλή μόλυνση από διαφορετικά HPV16 variants.

Είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται φυλογενετική ανάλυση στην E4 γενωμική περιοχή του HPV16 και η πρώτη μελέτη που εντοπίζει HPV16 variants που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα της γενωμικής ανάλυσης παρουσιάστηκαν συγκεντρωτικά στους πίνακες 1.1 και 1.2. Εντοπίστηκε και χαρακτηρίστηκε πληθώρα μεταλλάξεων κατά μήκος του γονιδίου, κατά κύριο λόγο στα δείγματα που προέρχονται από υψηλού βαθμού αλλοιώσεις. Μέχρι στιγμής δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη γενωμική ανάλυση του E4 γονιδίου από τη διεθνή βιβλιογραφία με μόνη μελέτη του Eriksson και συνεργατών το 1999. Ενώ πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν αναφερθεί στις μεταλλάξεις των γονιδίων E6, E5, E7, E2, L1 και L2, καθώς και της περιοχής LCR, δεν υπάρχουν άλλες αναφορές στη βιβλιογραφία για τις μεταλλάξεις της περιοχής E4 και τον πιθανό συσχετισμό τους με την ογκογονικότητα των HPV-16. Έτσι, η σύγκριση της ανάλυσης της παρούσας εργασίας έγινε με αυτή του Eriksson. Στην παρούσα εργασία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις όπου δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία. Αυτές είναι : **G3449T**, **G3413A** και **C3462T** όπου δεν έχουμε κάποια διαφορά στην παραγωγή αμινοξέων και οι : **G3360C** , **C3361T** , **T3387A**, **G3360C**, **C3361T**, **C3476T**, **C3476A**, **C3556T** όπου δίνουν τις αλλαγές: **A7P**, **A21V**, **D45E**, **S72F** οι οποίες επίσης δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία .

Στη γενωμική ανάλυση της E4 HPV16 γενωμικής περιοχής οι κλώνοι των δειγμάτων που συντάχθηκαν με βάση τα μη Ευρωπαϊκά στελέχη (Asian American, African 1 , African 2) παρουσιάζουν μεταλλάξεις κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο και στο αμινοτελικό άκρο της E4 πρωτεΐνης, δίνοντας διαφορετικά αμινοξέα κατά κύριο λόγο στο καρβοξυτελικό άκρο. Κάτι που τα διαφοροποιεί σε σχέση με το European variant, όπου οι μεταλλάξεις περιορίζονται κατά κύριο λόγο στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης η οποία είναι πλούσια σε προλίνη. Έτσι μπορεί να υπάρξει με αυτόν τον τρόπο συσχετισμός ανάμεσα στις μεταλλάξεις και στο βαθμό αλλοίωσης.

Όσον αφορά την E1^E4 πρωτεΐνη, μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες περιοχές επηρεάζουν σαφώς τη λειτουργία της. 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. Στο μοτίβο της λευκίνης δεν είχαμε στα δείγματά μας κάποια αμινοξική αλλαγή. Στο καρβοξυτελικό άκρο οι

αμινοξικές αλλαγές ήταν πολλές κάτι που μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση του δικτύου των κερατινοκυττάρων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μετάλλαξη C3410T η οποία δεν δίνει κάποια αμινοξική αλλαγή , παρόλα αυτά όμως , παρουσιάζεται σε όλους σχεδόν τους κλώνους (εκτός των D42C1,D42C2,A15C1,A35C1, D4C1,D16C1) κάτι που συνέβη και σε παρόμοια μελέτη του Eriksson και συνεργατών το 1999. Η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης αυτής σε δείγματα υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας ίσως να αποτελεί ένα σημαντικό μοριακό δείκτη για την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής τραχηλικής νεοπλασίας σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Απο την μοριακή και φυλογενετική ανάλυση αποκαλύφθηκε ότι οι μεταλλάξεις A3362A, C3377G, G3413A, G3516C, T3617C, A3538C, C3556T και T3566T ανιχνεύονται κυρίως σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις και θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για να συσχετιστούν με την ογκογονικότητα του ιού. Επίσης οι μεταλλάξεις C3361T, G3449A, A3538C, C3556T, T3566G συνδέονται με τα HPV16 African type I, African type II and Asian American variants ενώ η μετάλλαξη C3387T συνδέεται αποκλειστικά και μόνο με το Asian American variant. Η συσχέτιση των μεταλλάξεων αυτών με τις διαφορετικές παραλλαγές του HPV16 γονιδιώματος θα πρέπει περαιτέρω να μελετηθεί με στόχο να χρησιμοποιηθούν οι μεταλλάξεις αυτές ως μοριακοί δείκτες εντοπισμού HPV16 variants.

Η E4 γενωμική περιοχή του HPV16 στελέχους αποτελεί σημαντικό στόχο για μελλοντικές μελέτες καθώς λίγα είναι γνωστά για την συγκεκριμένη περιοχή του ιού. Από την φυλογενετική και νουκλεοτιδική ανάλυση προκύπτει ότι η E4 περιοχή είναι μια μικρή περιοχή του γονιδιώματος του ιού (288bp) αρκετά πολυμορφική μεταξύ διαφορετικών HPV16 variants από την οποία μπορούν να διεξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για την προέλευση και την ογκογονικότητα των διαφορετικών HPV16 variants.

8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adami, H.O., D. Hunter, and D. Trichopoulos, eds. Textbook of Cancer Epidemiology. 2002, Oxford University Press: New York
2. Agorastos T, Masouridou S, Lambropoulos AF et al. 2004 P53 codon 72 polymorphism and correlation with ovarian and endometrial cancer in Greek women. *Eur J Cancer Prev.*13(4):277-80
3. Agorastos T, Papadopoulos N, Lambropoulos AF et al. 2007 Glutathione-S-transferase M1 and T1 and cytochrome P1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to cervical intraepithelial neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev.* 16(6):498-504
4. Ahn W. S. , Bae S. M. , Lee H. J., Kim Y.W., Lee J. M., Namkoong S. E., Kim C.K., Kim Y.W. , Jin H. S. , Development of anticancer gene vaccine interact with human papilloma virus oncoprotein inhibition, *Int J. Gynecol Cancer* 16:270-276
5. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, et al. 2003. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84:1881–6.
6. Antonsson A, McMillan NA, 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200.
7. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805–809.
8. Arbyn M., Autier P., Ferlay J. Burden 2007 Research of cervical cancer in the 27 member states of the European Union: estimates for 2004. *Annals of Oncology* 18(8):1423-1425
9. Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L, et al. 2002 Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* Jan 10;21(2):248-59.
10. Azar KK, Tani M, Yasuda H, et al. 2004 Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 35(11): 1376-1384

11. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* Dec;60(6):1445-56
12. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* Mar;63(3):1404-7
13. Barksdale SK, Baker CC 1993. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters. *J Virol* Sep;67(9):5605-16
14. Batchu B. R. , Shamma A. M., Wang Y. J., Munshi C.N., 2001. Dual level inhibition of E2- F1 Activity by Adeno-associated Virus Rep78 : *J Biol Chem* 276(26):24315-24322
15. Bechtold V, Beard P, Raj K. 2003 Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* 79:13150-13165
16. Bernard H.-U. , Burk R. D., Chen Z. , Doorslaer van K. , Zur Hausen H. , de Villiers E. M. , 2010 Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79
17. Bernard , H. U. , Chan, S.Y. Manos, M. M. , Delius, H., 1994. Evolution of papillomaviruses. *Current topics in Microbiology and immunology* 186:33-53
18. Bernard HU. 2002. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* Dec;7(4):219-37
19. Berumen Jaime , Rosa M. , Ordonez Eduardo , Jorge Salmeron , Silvia C. Galvan, Ruth A. Estrada, Elsa Yunes, Alejandro Garcia- Carranca, Guillermo Conzalez-Lira, Angeles Madrigal-de la Campa. 2001 Asian – American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a case control study. *Journal of National Cancer institute* 93. 1325-30
20. Bethesda system (No authors listed). The 1988 Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. Developed and approved at a National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, U.S.A., December 12-13, 1988. *J Reprod Med*. 1989;34(10):779-785
21. Bodily JM, Meyers C. 2005 Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter. *J Virol* Mar;79(6):3309-21
22. 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

23. Bosch, F.X., 1995. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst*; 87:796-802
24. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. 1998 Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* Feb 5;391(6667):597-601
25. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, et al. 1999 The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* May 4;18(9):2449-58
26. Breitburd, F., O. Croissant, and G. Orth. 1987. Expression of human papillomavirus type 1 E4 gene products in warts. *Cancer cells (Cold Spring Harbor)* 5:115-122
27. Bryan JT, Brown DR. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001 Mar 1;281(1):35-42
28. Burk RD, Kelly P, Feldman J et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 1996;23(4):333-41
29. Casas L., S. C. Galvan , Ordonez Rosa M., Lopez N., Guido M. and Berumen J., 1999. Asian American Variants of Human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in Cervical Carcinomas *Int. J. Cancer:* 83, 449–455
30. Chan S., Ho L., Ong C.-K., Chow V., Drescher B., Durst M. , Meulen J. T., Villa L. , Luande S. J. , Mgaya H. N., and Bernard H.U. 1992 Molecular Variants of Human Papillomavirus Type 16 from Four Continents Suggest Ancient Pandemic Spread of the Virus and Its Coevolution with Humankind. *J Vir*, Apr., p. 2057-2066 Vol. 66, No. 4
31. Charles E. Wood, Zigu 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
32. Chen Z., Schiffman M. , Herrero R., DeSalle R. ,Anastos K. , Michel Segondy, Vikrant V. Sahasrabudde, Patti E. Gravitt, Ann W. Hsing, Robert D. Burk, 2011 .Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *Plos One* , Volume 6 ,Issue 5, e20183
33. 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* Feb 20;193(4):599-608

34. Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. and Wang, T. S. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J. Biol. Chem.* 274, 2696–2705
35. 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
36. 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.
37. Danos O, Engel LW, Chen EY, et al. 1983 Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol*;46:557–66.
38. 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
39. Datto MB, Yu Y, Wang XF. 1995 Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* Dec 1;270(48):28623-8
40. Davy C.E., Jackson Deborah J., Raj Kenneth, Peh Woei Ling, Southern Shirley A., Das Papia, Sorathia Rina, Laskey Peter, Middleton Kate, Nakahara Tomomi, Wang Qian Masterson , Phillip J., Lambert Paul F., Cuthill Scott, Millar Jonathan B. A., and Doorbar John. 2005 Human Papillomavirus Type 16 E1^{E4}-Induced G2 Arrest Is Associated with Cytoplasmic Retention of Active Cdk1/Cyclin B1 Complexes. *J of Vir*, 79, 3998–4011
41. Davy C.E., Jackson J. D. , Wang Q. , Raj K. , Masterson J. P. , Fenner F. N. , Southern S. , Cuthill S. , Millar B. A. J. and John Doorbar, 2002 identification of G2 Arrest Domain in the E1^{E4} protein of Human Papillomavirus Type 16. . *J of Vir* 76, 9806-9818
42. Davy C.E. , McIntosh P., Jackson D. , Sorathia R. , Miell M. , Wang Q., Khan J. , Soneji Y., Doorbar J., 2009, A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1^{E4} proteins leads to stabilization of E2. *Virology* 394, 266-275
43. 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

44. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. 2003 Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* ;307:118-121
45. de Boer, M. A., Peters, L. A. W., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S., Kolkman-Uljee, S. & Fleuren, G. J. (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* 94, 488–494
46. Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71:9343–9349
47. de Sanjost S, Diaz M, Castellsagut X, et al. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*; 7:453-9
48. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hauzen H. 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27
49. Dixon, E. P., G. L. Pahel, W. J. Rocque, J. A. Barnes, D. C. Lobe, M. H. Hanlon, K. A. Alexander, S. F. Chao, K. Lindley, and W. C. Phelps. 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270:345–357
50. Doorbar J., C. Foo., Coleman N. et al., 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4 , *Virology* 238:40-52
51. Doorbar, J., D. Campbell, R. J A. Grand, and P.H. Gallimore. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.* 5:355-362
52. Doorbar, J., H. S. Evans, I. Coneron, L. V. Crawford, and P. H. Gallimore. 1998. Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J.* 7:825-833
53. Doorbar J, PH. Gallimore Identification of proteins encoded by the L1 and L2open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 1987Sep;61(9):2793-9.
54. Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824–827
55. Doorbar J., 2007 Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers* 23, 297-313
56. Doorbar J 2006 Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, 525–541.

57. 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
58. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. 1989 The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* Feb 17;243(4893):934-7
59. Ericksson, A. , Herron, J. R., Yamada, T. , Wheeler, C. M. , 1999. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *Journal of the National Cancer Institute* 86:1558-1559
60. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 71 (3): 2449–56.PMID 9032382.
61. Fakhry C, D’Souza G, Sugar E, et al. Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and –negative women. *J Clin Microbiol* 2006;44:4479–85
62. 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
63. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. 2002 Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* Oct;76(19):10009-14
64. Fraiser, L. D. *et al*, 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360
65. Franco EL, Hasrper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005; 23:2388-2394
66. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12398–12402
67. 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
68. Galloway A.D. 2003 paillomavirus vaccines in clinical trials , *Reviews Lancet Infect Dis* 3 : 469-475
69. Gewin L, Galloway DA. E 2001 box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* Aug;75(15):7198-201

70. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA 2004. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* Sep 15;18(18):2269-82
71. Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M 2001. "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate". *J. Virol.* 75 (3): 1565–70
72. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. 2002. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 186:462–9
73. Grand, R. J. A., J. Doorbar, K. J. Smith, I. Coneron, and P. H. Gallimore 1989. Phosphorylation of the human papilloma virus type 1 E4 proteins in vivo and in vitro. *Virology* 170:201-213
74. 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
75. Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, Galloway DA. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* 1994 Jul;68(7):4503-5
76. Han, Y., Loo, Y. M., Militello, K. T. and Melendy, T. 1999. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication
77. Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV) 2009. *J Dtsch Dermatol Ges* Mar 4
78. Heise A. The Clinical Significance of HPV 2003. *The Nurse Practitioner* ; 28: 8-17
79. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, et al. 2005. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ;14:2550–6
80. Ho, L., Chan, S.-Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S.-K., Villa, L. L. & Bernard, H.-U. 1991. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 29, 1765–1772.
81. 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.

82. Ho GY, Kadish AS, Burk RD, et al. 1998. HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer*;78:281 – 285
83. 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.
84. Hoory Talia, Archana Monie, Patti Gravitt,T.-C. Wu. 2008. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus, [*J Formos Med Assoc*;107(3):198–217
85. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe DM,Howley PM, eds. *Field's Virology, Volume 2.* Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2007:2299–354
86. Howley, PM. 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
87. Herzog J.T. 2003, New approaches for the management of cervical cancer. *Gynecol Onc* 90: S22-27
88. Hughes, F. J., and M. A. Romanos. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 21:5817–5823
89. 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
90. Hummel, N., J. B. Hudson, and L. A. Laimins, 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070-6080
91. Icenogle, J. P., Sathy, P. , Miller, D. L. , Tucker, R. A., Rawls, W.E. , 1991. Nucleotide and amino acid sequence variation in L1 and E7 open reading frames of human papillomaviruses type 6 and 16. *Virology* 184:101-107
92. Isaacson E. R., Hinz Steven A., Davy C., and Doorbar J. 2009 Phosphorylation of the Human Papillomavirus Type 16 E1_E4 Protein at T57 by ERK Triggers a Structural Change That Enhances Keratin Binding and Protein Stability. *JOURNAL OF VIROLOGY* 83,3668–3683.
93. James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. *Int J Cancer* 2006 Oct 15;119(8):1878-85
94. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al. 1999. "The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes". *J. Biol. Chem.* 274 (9): 5810–22

95. Kataja V, Syrj nen S, Yliskoski M. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1993;138(9):735-745
96. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* Dec 23;266(5193):2011-5.
97. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* Dec;67(12):6929-36
98. Klumpp DJ, Laimins LA, 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology.* 257(1):239-46
99. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* Mar 7;380(6569):79-82.
100. Kremsdorf D, S Jablonska, M Favre, and G Orth ,1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *J Virol* 48(2): 340–351
101. 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
102. Larsen PM, Storgaard L, Fey SJ 1987. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J Virol* Nov;61(11):3596-601
103. Liu D. W. , Chang J. S. , Tsao Y.P. , Huang C. W. , Kuo S. W. , Chen S. L. , 2005. Covaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papilloma virus 16 L1 proteins and adenovirus encoding GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody, *Int J Cancer* 113(1):93-100
104. 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
105. Liu, J. S., Kuo S. R., Makhov A. M., D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 273:30704–30712
106. Liu, J. P. ,1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104

107. Li X, Coffino P. 1996 .High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* Jul;70(7):4509-16
108. Loo, Y. M. and Melendy, T. 2004 Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* 78,1605–1615
109. Lu, J. Z., Y. N. Sun, R. C. Rose, W. Bonne, and D. J. McCance. 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J. Virol.* 67:7131–7139
110. Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:382–387
111. Mahdavi A, Monk BJ. 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538
112. Mandic A., Vujkov T, 2004. Human papilloma virus vaccine as a new way of preventing cervical cancer : a dream or the future ? Review, *Annals of Oncology* 15: 197-200
113. Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM, Campo MS 2002. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogene* Nov 7;21(51):7808-16
114. Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1:194–202.
115. Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. and Romanos, M. A. 1998 A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. *J. Virol.* 72, 7407–7419
Michelle S. Longworth and Laimonis A. Laimins, 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol and Mol Biol Reviews*, p. 362–372
116. Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Backstrom BT, et al 2003. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* Aug;77(15):8378-85.
117. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* Aug 22;90(4):785-95

118. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* Oct;77(19):10186-201
119. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S et al. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*;285:2995–3002.
120. Muller, F., T. Giroglou, and M. Sapp. 1997. Characterization of the DNA binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J. Gen. Virol.* 78:911–915.
121. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv*;12:197-217
122. Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J* Dec 20;8(13):4099-105
123. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*;348:518–27
124. Nakahara, T., W. L. Peh, J. Doorbar, D. Lee, and P.F. Lambert, 2005. Human papillomavirus type 16 E1^{E4} contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J. Virol.* 79:13150-13165
125. 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
126. Nguyen ML, RM Kraft, Aubert M, Goodwin E, DiMaio D, Blaho JA 2007. p53 and hTERT determine sensitivity to viral apoptosis. *J Virol* Dec;81(23):12985-95
127. Northern Ireland Cancer Registry. Cancer Registrations in Northern Ireland, 2005. 2008
128. Northern Ireland Cancer Registry. Cancer Mortality in Northern Ireland, 2006. Accessed 2008
129. Office for National Statistics. Cancer Statistics registrations: Registrations of cancer diagnosed in 2005, England. Series MB1 no.36. 2008
130. Office for National Statistics. Mortality Statistics, England and Wales, 2006. Accessed 2008

131. Oren M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* Apr;10(4):431-42
132. Ozbun MA, Meyers C. 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* Apr;72(4):2715-22
133. Parkin DM, Almonte M, Bruni L. Burden 2008 trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*.;26 Suppl 11:L1-15
134. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, et al 2007. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis*;196:1128–36
135. Peh, W. L., J. I. brandsma, N. D. Christensen, N. M. Cladel, X. Wu an J. Doorbar. 2004. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J. Viro.* 78: 2142-2151
136. Pfister H. 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer, *J Natl Cancer Inst Monogr* 52–56
137. 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
138. Rebrikov, D.V., Bogdanova, E.A., Bulina, M.E., Lukyanov, S.A., 2002. A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtractive hybridization. *Mol. Biol.* 36, 813–820
139. Remm, M., A. Remm, and M. Ustav. 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J. Virol.* 73:3062–3070
140. Roberts S. , Ashmol I. , Gibson J. L. , Rookes M. S. , Barton J. G. , Gallimore H. P. 1994 Mutational Analysis of Human Papillomavirus E4 Proteins: Identification of Structural Features Important in the Formation of the Cytoplasmic E4/Cytokeratin Networks in Epithelial Cells. . *Journal of Virology* 68, 6432-6445
141. Roberts S., Ashmole I. , Rookes S. and Gallimore P., 1997 Mutational Analysis of the Human papillomavirus Type 16 E1^{E4} Protein Shows that the C terminus Is Dispensable for the Keratin Cytoskeleton Association but is In Inducing Disruption of the Keratin Filaments. *Journal of Virology* 71, 3554-3562
142. Roden RB, Kirnbauer R, Jenson AB, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* 1994 Nov;68(11):7260-6
143. Rodriguez, M. I., M. E. Finbow, and A. Alonso. 2000. Binding of human vol. 68, 2004 HPV pathogenesis in differentiating epithelia 371 papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H₊-ATPase can be dissociated

from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19:3727–3732

144. Rosenstierne MW, Vinther J, Hansen CN, Prydsoe M, Norrild B 2003. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* Nov;84(Pt 11):2909-20
145. Rose RC, Bonneze W, Reichman RC, Garcea RL 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* Apr;67(4):1936-44
146. Sedlacek TV 1999. Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. *Clin Obstet Gynecol.*;42(2):206-220
147. Sedman, J., and A. Stenlund. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72:6893–6897
148. Seedorf, K., Kra¨mmer, G., Du¨rst, M., Suhai, S. & Ro¨wekamp, W. G. 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145, 181–185
149. Selinka HC, Giroglou T, Sapp M 2002. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 299 (2): 279–287
150. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J et al. 2003. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*;168:421–5.
151. Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky, and J. Hurwitz. 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:702–706
152. 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
153. Shah S. D., Doorbar J. and Goldstein R. A, 2010. Analysis of Host-Parasite Incongruence in Papillomavirus Evolution Using Importance Sampling. *Molecular Biology and Evolution* 27, 1301-1314
154. 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
155. Sicheo Laura, Ferreira Silvaneide, Trottier Helen, Duarte – Franco Helen , Ferency Alex, Luis Franco Eduardo and Villa Lina Luisa, 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International journal of cancer* 120, 1763-1768
156. Silver PA. 1991 How proteins enter the nucleus. *Cell* Feb 8;64(3):489-97.

157. 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
158. Spink KM, Laimins LA. 2005. Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol Apr*;79(8):4918-26
159. 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
160. Straight, S. W., B. Herman, and D. J. McCance. 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69:3185–3192
161. 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
162. Stubenrauch, F., H. B. Lim, and L. A. Laimins, 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of the oncogenic human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 72:1071-1077
163. Sun XY, Frazer I, Muller M, Gissmann L, Zhou J. 1995. Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology Nov 10*;213(2):321-7
164. Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216:219–222.
165. Svare EI, Kjaer SK, Worm AM et al. 1998. Risk factors for HPV infection in women from sexually transmitted disease clinics: comparison between two areas with different cervical cancer incidence. *Int J Cancer.* ;75(1):1-8
166. Tan W, Schwartz S. 1995. The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 counteracts the effect of an AU-rich negative element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region. *J Virol May*;69(5):2932-45.
167. Thorner LK, Lim DA, Botchan MR, 1993 . DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol.* (10):6000-14
168. 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

169. Van G. Wilson, Michael West, Kelly Woutek, Dandapani Rangasamy, 2002. Papillomavirus E1 Proteins, Form, Function and Features. *Virus Geness* 24:3, 275-290.
170. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. 2001 Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* May;75(9):4467-72
171. Villa L. Luisa, Sichero Laura, Rahal Paula, Otavia Caballero, Frecencyz Alex, Tom Rohan and Eduardo L. Franco, 2000. Molecular variants of the human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of general virology* 81, 2959-2968
172. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000 Nov 16;408(6810):307-10
173. Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE, Sapp M. 1994 Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* May 1;200(2):504-12
174. Vousden KH, Lu X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* Aug;2(8):594-604
175. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. 1999 . Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol. Sep*;189(1):12-9
176. Wang Q. , Kennedy A. , Das P. , McIntosh P. , Howel A. S. , Isaacson E. R. , Hinz A. S. , Davy C. and Doorbar J. , 2009. Phosphorylation of the Human papillomavirus Type 16 E1^{E4} protein at T57 by ERK triggers a Structural Change That Enhances Keratin Binding and Protein Stability. *Journal of Virology* 83, 3668-3683
177. Wang YW, Chang HS, Lin CH, Yu WC. 2007. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol*;39(2):402- 12.
178. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* Apr 6;248(4951):76-9.
179. Wheeler, C. M. , Yamada T. , Hildesheim, A. , Jenison, S. A. , 1997. Human papillomavirus type 16 sequences variants : identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 35:11-19
180. White A, Livanos EM, Tlsty TD. 1994 Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev*;8:666-669
181. Wilson, R., G. B. Ryan, G. L. Knight, L. A. Laimins, and S. Roberts. 2007. The full-length E1^{E4} protein of human papillomavirus type 18 modulates

- differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology* 362:453-460
182. Wilson, R., F. Fehrmann, and L. knight, L. A. Laimins, 2005. Role of the E1^{E4} protein in the differentiation-depedent viral lifecycle of the human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 79:6732-6740
 183. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*;157:218–26
 184. Yamada T., Manos M., Peto J., Greer C. , Munoz N. , Bosch X. and Wheeler C. 1997. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Persepective. *Journal of Virology* 71, 2463-2472
 185. Yamada T. , Wheeler C. M, Halpern A. L., Steward A.-C. M. , Hildesheim A. , and Jenison S. A. , 1995. Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2, and L1 Coding Segments. *Journal of virology* , 7743-7753
 186. 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
 187. Yang, L., I. Mohr, E. Fouts, D. A. Lim, M. Nohaile, and M. Botchan. 1993. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5086–5090
 188. 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*; 283: 668–73
 189. Yoshioka, N., H. Inoue, K. Nakanishi, K. Oka, M. Yutsudo, A. Yamashita, A. Hakura, and H. Nojima. 2000. Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. *J. Virol.* 74:1008–1013
 190. Yuping Wu, Yulong Chen, Longyu Li, Guifang Yu, Ying He and Yanling Zhang 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *Journal of General Virology* (2006), 87, 1181–1188
 191. Zhang B, Li P, Wang E, et al. 2003. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*;310:100-108
 192. Zhao C, Tan W, Sokolowski M, Schwartz S. 1996. Identification of nuclear and cytoplasmic proteins that interact specifically with an AU-rich, cis-acting

inhibitory sequence in the 3' untranslated region of human papillomavirus type 1 late mRNAs. *J Virol* Jun;70(6):3659-67

193. Zheng Zhi-Ming and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302
194. Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY, Frazer IH. 1993. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol* Apr;74 (Pt 4):763- 8.
195. Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH. 1994. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 Nterminal sequence. *J Virol* Feb;68(2):619-25
196. Zur Hausen H. 1976 Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* Feb;36(2 pt 2):794
197. Zur Hausen, H 2000 *J. National Cancer inst. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis*
198. Zur Hausen H., 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 92(9):690-8. Review
199. Μορτάκης Α. Μόλυνση από τους HPV (ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων)- Στο κατώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. *Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.*