

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

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

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

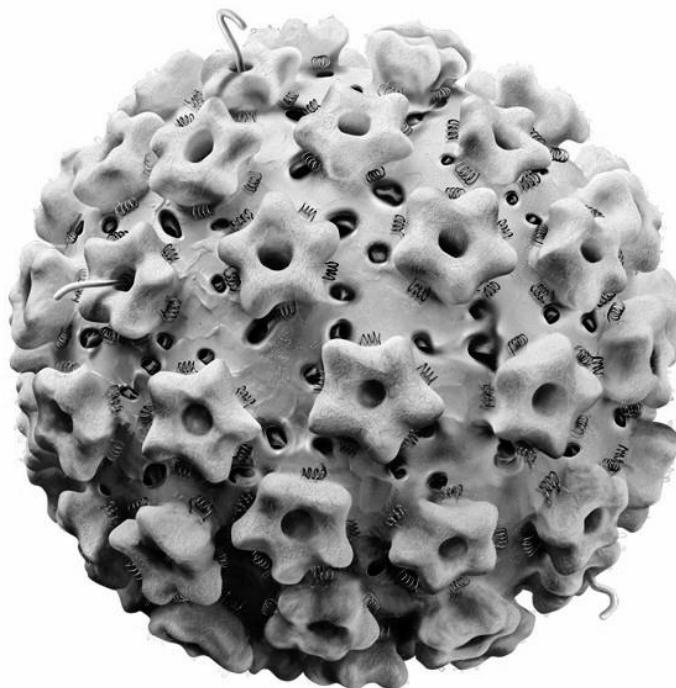
**ANNA Λ. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ**

**« Στελέχη HPV υψηλού κινδύνου (HPV-16, -18, -31, -33).  
Τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν  
ένα μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I προς CIN III; »**



**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

« Στελέχη HPV υψηλού κινδύνου (HPV-16, -18, -31, -33). Τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν ένα μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I προς CIN III; »



### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

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

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

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

**Semper committitur...**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία, αισθάνομαι ικανοποίηση και έντονη συγκίνηση, αφού ένας μεγάλος στόχος επιτεύχθηκε, ενώ ακόμη, μία επίπονη και ταυτόχρονα εποικοδομητική πορεία έχει φτάσει στο τέλος της. Και τι να πρωτοπώ, τώρα που ένας μεγάλος κύκλος κλείνει και ένας άλλος, άγνωστος, ετοιμάζεται να ανοίξει...

Νιώθω την βαθιά ανάγκη να εκφράσω ένα μεγάλο «ευχαριστώ», στον Επιβλέποντα Καθηγητή της Μεταπτυχιακής μου Εργασίας, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, γνωρίζοντας πολύ καλά ότι ποτέ αυτό δε θα είναι αρκετό, για να αντισταθμίσει την στήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Για μένα είναι ο Επιστήμονας και ο Άνθρωπος, που με την έμφυτη ευγένεια του χαρακτήρα του, μέσα από τη δική του αγάπη και αφοσίωση για την Επιστήμη, με μύησε στον υπέροχο κόσμο της Ιολογίας...

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Κομιώτη Δημήτριο, όπως και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας Μεταπτυχιακής Εργασίας.

Οποσδήποτε, δε γίνεται να μην αναφέρω σε αυτό το σημείο, το πόσο ευγνώμων και ιδιαίτερα τυχερή νιώθω που υπάρχει στη ζωή μου και με στηρίζει απόλυτα σε κάθε μου βήμα, η Καθηγήτρια Γενετικής του Τμήματος Βιολογίας, του Α.Π.Θ. από το οποίο και αποφοίτησα, κα. Μαυραγάνη-Τσιπιδίου Πηνελόπη. Πρόκειται για τον Άνθρωπο που πίστεψε και πιστεύει σε εμένα και τις δυνατότητές μου από την πρώτη στιγμή που με γνώρισε και με ώθησε στο να συνεχίσω τις Σπουδές μου στον χώρο της Επιστήμης και της Έρευνας μετά το πέρας των Βασικών Σπουδών μου.

Πραγματικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του συναδέλφους από το Εργαστήριο Ιολογίας και Μικροβιολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το φιλικό κλίμα που δημιουργήσαν και για την αμέριστη βοήθειά τους οποτεδήποτε το είχα ανάγκη και κυρίως τους υποψήφιους διδάκτορες, Δημήτριο Τσακογιάννη και Ειρήνη Ρούτερ, μα πιο πολύ την συνεργάτιδα, συνάδελφο και πλέον πολύ καλή μου φίλη, Δρ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, για όλες τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων και για όλη την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε εντός και εκτός του Πανεπιστημίου. Η

παρουσία της, μερικές φορές και μόνο, μαζί μου, στο χώρο του Πανεπιστημίου, έκανε ευχάριστη και δημιουργική και την δική μου παρουσία.

Θεωρώ ότι η στήριξη από την επιστήθια φίλη μου, Ελισάβετ Τζιγέρη, ήταν καθοριστικής σημασίας για να ολοκληρώσω με επιτυχία τις Σπουδές μου σε Μεταπτυχιακό επίπεδο, αφού η ίδια, συνεχώς, κοντά μου, στις χαρές και στις δύσκολες στιγμές είχε πάντα να μου πει ένα καλό λόγο και να μου δώσει κουράγιο να συνεχίσω την προσπάθεια. Μου χάρισε και μου χαρίζει όμορφες στιγμές ευτυχίας και ξεγνοιασιάς στο πλαίσιο μίας αγνής φιλίας.

Ευχαριστώ, τέλος όλους τους υπόλοιπους φίλους μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους, που με οποιονδήποτε τρόπο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση των Μεταπτυχιακών Σπουδών μου, και σαφώς πιο πολύ από όλους ευχαριστώ την Οικογένεια μου και βεβαίως, του Γονείς μου, Στέλλα και Λεωνίδα, για τα 25 χρόνια ζωής που τους έχω δίπλα μου να με λατρεύουν...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Human Papillomaviruses (HPVs) συνιστούν μία ομάδα DNA ιών, χωρίς περίβλημα και επιθηλιακό τροπισμό. Προκαλούν καλοήθεις αλλοιώσεις του δέρματος και των βλεννογόνων, γνωστές ως κονδυλώματα, ωστόσο, εμπλέκονται και σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου.

Οι ιοί αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες υψηλού κινδύνου, ενδιάμεσου κινδύνου ή χαμηλού κινδύνου, ανάλογα με την τάση για κακοήγη εξέλιξη των αλλοιώσεων που προκαλούν. Οι υψηλού κινδύνου τύποι HPVs, όπως οι HPV-16, -18, -31 και -33, συνδέονται με πάνω από το 90% των περιπτώσεων των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Η μόλυνση με τους παραπάνω τύπους HPVs είναι η κύρια αιτία δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας ή χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN).

Το ογκογονικό δυναμικό των HPVs, στηρίζεται στην υπερέκφραση των ογκογονιδίων τους E6 και E7. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση των μεταγράφων των ογκογονιδίων αυτών θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένας παράγοντας προσδιορισμού του κινδύνου, μία γυναίκα να εμφανίσει τραχηλική ενδοεπιθηλική νεοπλασία (CIN).

Τα μετάγραφα των HPVs είναι σχεδόν όλα πολυκιστρονικά, με πολλά εξώνια και εσώνια. Αυτά τα πολυκιστρονικά μετάγραφα χαρακτηρίζονται από κατάλληλα σήματα ματίσματος και υποβάλλονται σε εκτεταμένο εναλλακτικό μάτισμα. Οι HPVs εκμεταλλευόμενοι τον μηχανισμό του εναλλακτικού ματίσματος, παρά το μικρό μέγεθος του γενόματός τους, καταφέρνουν να κωδικοποιούν πολλαπλές πρωτεΐνες και επωφελούνται από το εναλλακτικό μάτισμα για να εκφράσουν διαφορεικά αυτές τις πρωτεΐνες σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης και σε καθορισμένο χρονικό διάστημα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 60 κλινικά δείγματα από γυναίκες με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας με σκοπό να ανακαλυφθούν οποιαδήποτε εναλλακτικά μετάγραφα των ογκογονιδίων E6 και E7 είναι παρόντα και να εκτιμηθεί η συχνότητα εμφάνισης των μεταγράφων αυτών, με σκοπό να συσχετισθούν με την κλινική εικόνα των ασθενών. Με άλλα λόγια, να αξιολογηθεί το κατά πόσον τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 από του τύπους HPVs υψηλού κινδύνου (HPV-16, -18, -31 και -33) μπορούν να αποτελέσουν ένα μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I σε CIN III και καρκίνο.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ PAPILLOMA VIRUSES .....	3
1.3. ΔΟΜΗ ΤΩΝ HUMAN PAPILOMAVIRUSES (HPVs).....	5
1.3.1. Δομή του καψιδίου .....	5
1.3.2. Οργάνωση του γενόματος .....	6
1.3.2.1. Η ιϊκή πρωτεΐνη E1.....	7
1.3.2.2. Η ιϊκή πρωτεΐνη E2.....	8
1.3.2.3. Η ιϊκή πρωτεΐνη E4.....	9
1.3.2.4. Οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E5, E6 και E7 .....	10
2.4. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HUMAN PAPILOMAVIRUSES .....	14
1.4.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	14
1.4.2. Μεταγραφή του ιϊκού γενόματος .....	15
1.4.3. Εγκατάσταση του ιού.....	16
1.4.4. Παραγωγική φάση.....	18
1.4.5. Αντιγραφή του ιϊκού γενόματος.....	18
1.4.6. Συναρμολόγηση ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	19
1.5. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	20
1.6. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ .....	21
1.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	22
1.7.1. Τεστ Παπανικολάου (Pap test).....	22
1.7.2. Hybrid Capture II test.....	23
1.8. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ.....	23
1.9. ΤΟ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ ΣΤΟΥΣ HPV <sub>s</sub> .....	25
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>30</b>
2.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ .....	30

2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA/RNA.....	32
2.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	32
2.4. ΠΕΨΗ ΜΕ DNASE .....	34
2.5. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	35
2.6. PCR.....	36
2.7. NESTED PCR.....	37
2.8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	39
2.9. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	39
2.10. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	40
2.10.1. Auto Nested Go Taq PCR .....	40
2.10.2. Απομόνωση PCR προϊόντων από πηκτή αγαρόζης.....	41
2.10.3. Αντίδραση Λιγάσης (Ligation).....	41
2.10.4. Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων.....	41
2.10.5. Κλωνοποίηση σε στερεή και υγρή καλλιέργεια.....	42
2.10.6. Απομόνωση των φορέων από τα βακτήρια.....	42
2.10.7. Πέψη των προϊόντων της κλωνοποίησης.....	43
2.11. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	43
2.12. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	43
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>44</b>
3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-16.....	45
3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-18 .....	47
3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-31.....	48
3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-33 .....	50
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>51</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>54</b>



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι Papilloma ιοί (PVs) συνιστούν μία ομάδα DNA ιών, χωρίς περίβλημα και επιθηλιακό τροπισμό. Προκαλούν καλοήθεις αλλοιώσεις του δέρματος και των βλεννογόνων, γνωστές ως κονδυλώματα, ωστόσο εμπλέκονται και σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου. Το όνομα "Papilloma" προέρχεται από τη λατινική λέξη "papilla (θηλή)" και την ελληνική κατάληξη "oma (όγκος)" **{Hatama, S 2011}**. Τα κονδυλώματα ήταν ήδη γνωστά στους αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Αν και η μολυσματική φύση τους έχει πλέον εξακριβωθεί, μέχρι τον 19ο αιώνα, τα κονδυλώματα, συνήθως, θεωρούνταν ως μια μορφή σύφιλης ή γονόρροιας **{Ciuffo, G 1907}**.

Σε μια εξαιρετική έρευνα το 1842, ο Ιταλός γιατρός Rigoni Stern ανέλυσε τα πιστοποιητικά θανάτου των γυναικών από τη Βερόνα κατά τη διάρκεια της περιόδου 1760-1839 και παρατήρησε μεγάλη συχνότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις παντρεμένες γυναίκες, στις χήρες και στις εκδιδόμενες γυναίκες. Αντιθέτως, σπάνια ήταν η εμφάνισή του σε παρθένες κοπέλες και μοναχές. Έτσι, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη αυτού του τύπου καρκίνου θα πρέπει να σχετίζεται με τη σεξουαλική επαφή. Με την ταχεία ανάπτυξη της Βακτηριολογίας, στο δεύτερο μισό του 19ου αιώνα, επιχειρήθηκε από τους επιστήμονες η απόδειξη της συσχέτισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με σεξουαλικά μεταδιδόμενους λοιμώδεις παράγοντες. Εξέχοντες Αμερικανοί επιστήμονες, τη δεκαετία του 1970, παρατήρησαν ότι πολλές γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είχαν ιστορικό μόλυνσης με τον Έρπητα των γεννητικών οργάνων και αντί να συνειδητοποιήσουν ότι η διαπίστωση αυτή ήταν μια σύμπτωση, εσφαλμένα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ιός του Έρπητα ήταν η αιτία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας **{Rawls, WE, et al. 1968, Naib, ZM, et al. 1969, Nahmias, AJ, et al. 1970}**.

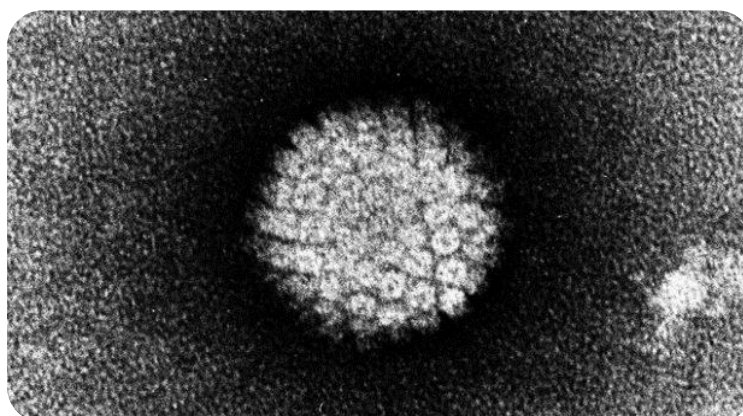
Λεπτομέρειες, σχετικά με το πότε και πώς, το πρώτο στέλεχος HPV ανακαλύφθηκε, είναι αποσπασματικές, ωστόσο, γενικά οι Papilloma ιοί συσχετίστηκαν με ασθένειες για πρώτη φορά από τον Richard Shope, στο Πανεπιστήμιο του Rockefeller, τη δεκαετία του 1930. Ένα στέλεχος του ιού των θηλωμάτων που προσβάλλει τα κουνέλια, τους προκαλεί, συχνά, κονδυλώματα που μοιάζουν με «κέρατα» **(Εικόνα 1)**. Η αιτία αυτών των κονδυλωμάτων δεν ήταν, όμως, γνωστή εκείνη την εποχή. Ο Shope πειραματίστηκε λαμβάνοντας δείγματα από τα κονδυλώματα, τα οποία στη συνέχεια ομογενοποιούσε και κατόπιν, εισήγαγε το ομογενοποιημένο υλικό με ένεση σε υγιή κουνέλια. Τα υγιή κουνέλια ανέπτυσαν, σύντομα, κονδυλώματα και ενώ ο Shope δεν εντόπισε τον ιό, ορθώς συμπέρανε, ότι τα κονδυλώματα στα κουνέλια προκαλούνται από ιό **{Shope, RE & Weston, EW 1933}**.

**Εικόνα 1.** Κονδυλώματα σε κουνέλια που μοιάζουν με «κέρατα».



Η πρώτη σαφής απόδειξη του λοιμώδους χαρακτήρα των ανθρωπίνων κονδυλωμάτων πραγματοποιήθηκε, ύστερα από πειράματα μετάδοσης των κονδυλωμάτων μέσω μη-κυτταρικών αιτιολογικών παραγόντων από τον Giuseppe Ciuffo, το 1907, στην Ιταλία. Ο Ciuffo μπόρεσε να αποδείξει ότι ένας διηθητικός παράγοντας (πιθανότατα ένας ιός) ήταν υπεύθυνος για τη μετάδοση των κονδυλωμάτων του δέρματος. Περαιτέρω πειράματά του έδειξαν, επίσης, ότι οι αιτιολογικοί παράγοντες των κοινών κονδυλωμάτων του δέρματος και των γεννητικών οργάνων σχετίζονται στενά. Λίγο αργότερα, το 1949, επιτεύχθηκε η απεικόνιση των ιικών σωματιδίων με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και έτσι, επιβεβαιώθηκε η ιογενής προέλευση των κονδυλωμάτων (**Εικόνα 2**). Πιο εκτεταμένη μελέτη των αλλοιώσεων που προκαλούν οι HPVs ήταν σε μεγάλο βαθμό δύσκολο να επιτευχθεί, εξαιτίας των προβλημάτων στην καλλιέργεια και τη μελέτη των ιών αυτών με τις μεθόδους της τότε Κλασικής Ιολογίας {**Strauss, MJ, et al. 1949**}.

**Εικόνα 2.** Απεικόνιση ιικού σωματιδίου HPV με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, η ανάπτυξη της Μοριακής Ιολογίας έκανε τη μελέτη των HPVs πιο προσιτή στους ερευνητές. Ο Γερμανός Ιολόγος, Harald zur Hausen (**Εικόνα 3**) πρότεινε το 1976 ότι οι HPVs, και όχι ο Έρπης, είναι η αιτία του

καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, μια θεωρία που οι άλλοι επιστήμονες, αρχικά, απέρριψαν. Το 1983 και 1984, ο zur Hausen ανακάλυψε το DNA του HPV-16 και του HPV-18, αντίστοιχα, σε καρκινικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας, αποδεικνύοντας τη θεωρία του και γι' αυτό το 2008 τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ για την έρευνα του αυτή. Έκτοτε, ανιχνεύτηκαν πολλοί ακόμα τύποι HPVs και συσχετίστηκαν με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως, επίσης και με καλοήθειες νεοπλασίες του δέρματος και των βλεννογόνων {Kerksiek, K 2009}.

**Εικόνα 3.** Harald zur Hausen.



## 1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ PAPILLOMAVIRUSES

Οι Papilloma ιοί αποτελούν μία μεγάλη και εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ιών που μολύνουν, κυρίως, θηλαστικά και πτηνά. Πολλοί τύποι Papilloma ιών έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο, καθώς ο άνθρωπος έχει μελετηθεί πιο εντατικά ως ξενιστής των ιών αυτών {de Villiers, EM, et al. 2004}. Οι Papilloma ιοί, αρχικά, είχαν ταξινομηθεί μαζί με τους Polyoma ιούς σε μία οικογένεια που ονομαζόταν, *Papovaviridae*. Η ομαδοποίηση αυτή, βασίστηκε στην ομοιότητα των καψιδίων των ιών αυτών, στην απουσία περιβλήματος και στην παρουσία δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA ως γενετικού υλικού.

Πρόσφατα, περαιτέρω έρευνες έδειξαν, ότι οι δύο ομάδες των ιών αυτών έχουν διαφορετικά μεγέθη γενώματος, εντελώς διαφορετική οργάνωση του γενώματός τους και αμελητέα ομοιότητα στις νουκλεοτιδικές και τις αμινοξικές τους αλληλουχίες. Έτσι, η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των ιών (ICTV) διαχώρισε τους Papilloma και Polyoma ιούς σε δύο ξεχωριστές οικογένειες, την *Papillomaviridae* και την *Polyomaviridae* {Rebrikov, DV, et al. 2002}.

Δεδομένου ότι, κυτταρικές καλλιέργειες των ιών αυτών δεν είναι ως τώρα διαθέσιμες, η ταξινόμησή τους βασίζεται στον προσδιορισμό του γενότυπου και όχι του ορότυπου του ιού, όπως εφαρμόζεται παραδοσιακά στην Ιολογία. Ειδικότερα, η συστηματική κατάταξη των τύπων, των υποτύπων και των παραλλαγών του ιού, πραγματοποιείται με βάση την αλληλουχία του DNA από το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, Open Reading Frame) που κωδικοποιεί τη βασική πρωτεΐνη L1 του ιικού καψιδίου (**Εικόνα 4**), με διαφορές στην μεταξύ τους αλληλουχία κατά τουλάχιστον 10%, 2-10% και έως 2%, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, οι Papilloma ιοί ομαδοποιούνται (**Εικόνα 5**) σε γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου, παραδείγματος χάριν, Alpha-, Beta- και Gamma-Papillomaviruses. Κάθε γένος, διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές, όπως ήδη αναφέρθηκε, με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1 {de Villiers, EM, et al. 2004}.





Οι HPVs παρουσιάζουν τύπο-ειδικό τροπισμό για τα επιθήλια του δέρματος και των βλεννογόνων {Stacey, SN, et al. 1995} και προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων που κυμαίνονται από κονδυλώματα ως δυσπλασίες και καρκίνο {Doorbar, J 2006}. Οι ιοί αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες υψηλού κινδύνου, ενδιάμεσου κινδύνου ή χαμηλού κινδύνου, ανάλογα με την τάση για κακοήγη εξέλιξη των αλλοιώσεων που προκαλούν (Πίνακας 1). Οι υψηλού κινδύνου τύποι HPVs, όπως οι HPV-16, -18, -31 και -33, συνδέονται με πάνω από το 90% των περιπτώσεων των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Η μόλυνση με τους παραπάνω τύπους HPVs είναι η κύρια αιτία δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας ή χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) {Yugawa, T & Kiyono, T 2009, Muñoz, N, et al. 2003}.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των HPVs σε ομάδες επικινδυνότητας.

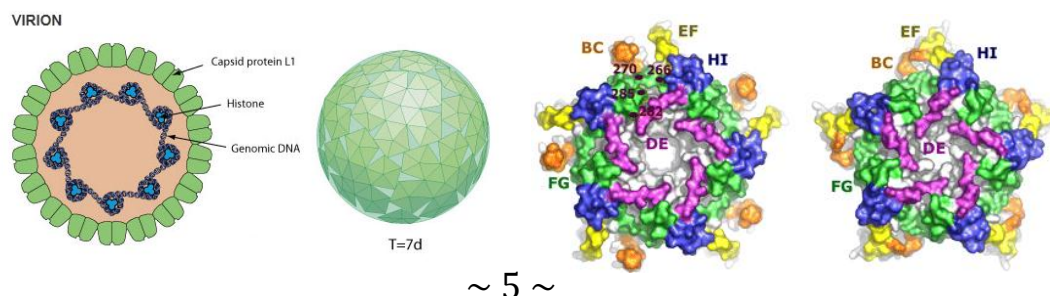
ΟΜΑΔΕΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ	ΤΥΠΟΙ HPV
Υψηλού Κινδύνου (High Risk):	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου Κινδύνου (Middle Risk):	26, 53, 66
Χαμηλού Κινδύνου (Low Risk):	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

## 1.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ HUMAN PAPILLOMA VIRUSES (HPVs)

### 1.3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων είναι μικροί σε μέγεθος, DNA ιοί, χωρίς περίβλημα. Πιο συγκεκριμένα, τα ιϊκά σωματίδια των HPVs έχουν διάμετρο της τάξης των 52-55 nm και αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA με μέγεθος περί τα 8.000 ζεύγη βάσεων, το οποίο περιέχεται μέσα σε ένα σφαιρικό καψίδιο πρωτεϊνικής φύσης {Crawford, LV & Crawford, EM 1963}. Τα ιϊκά αυτά σωματίδια στην εξωτερική τους επιφάνεια αποτελούνται από 72 πενταμερή της βασικής L1 καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζοντας, έτσι, εικοσαεδρικά καψίδια με triangulation number T=7 (Εικόνα 6) {Baker, TS, et al. 1991}.

Εικόνα 6. Δομή του καψιδίου των HPVs και επιφανειακή απεικόνιση των πενταμερών της L1 πρωτεΐνης του HPV-16 (αριστερά) και του HPV-18 (δεξιά).



Αναλυτικότερα, το ιϊκό καψίδιο αποτελείται από δύο δομικές πρωτεΐνες. Η κύρια δομική πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η L1. Αυτή έχει μοριακό βάρος περίπου 55 kD και αντιπροσωπεύει περίπου το 80% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του ιού. Επιπλέον, η L1 πρωτεΐνη συνιστά αντιγονικό καθοριστή, που συμβάλλει στην αναγνώριση των ιϊκών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα ενός προσβεβλημένου ατόμου {Crawford, LV & Crawford, EM 1963}.

Το καψίδιο του ιού περιλαμβάνει και μία ακόμη πρωτεΐνη, την L2 που έχει μοριακό βάρος περίπου 70 kD. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γένωμα του ιού {Favre, M, et al. 1975, Gissmann, L, et al. 1977, Pfister, H, et al. 1977}. Η καψιδιακή L2 πρωτεΐνη τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της L1 και έχει άγνωστο ως τώρα δομικό ρόλο. Η βασική της, ωστόσο, λειτουργία είναι η καθοριστικής σημασίας αλληλεπίδρασή της με την ιϊκή E2 πρωτεΐνη κατά το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά καψίδια {Buck, CB, et al. 2004}.

### 1.3.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

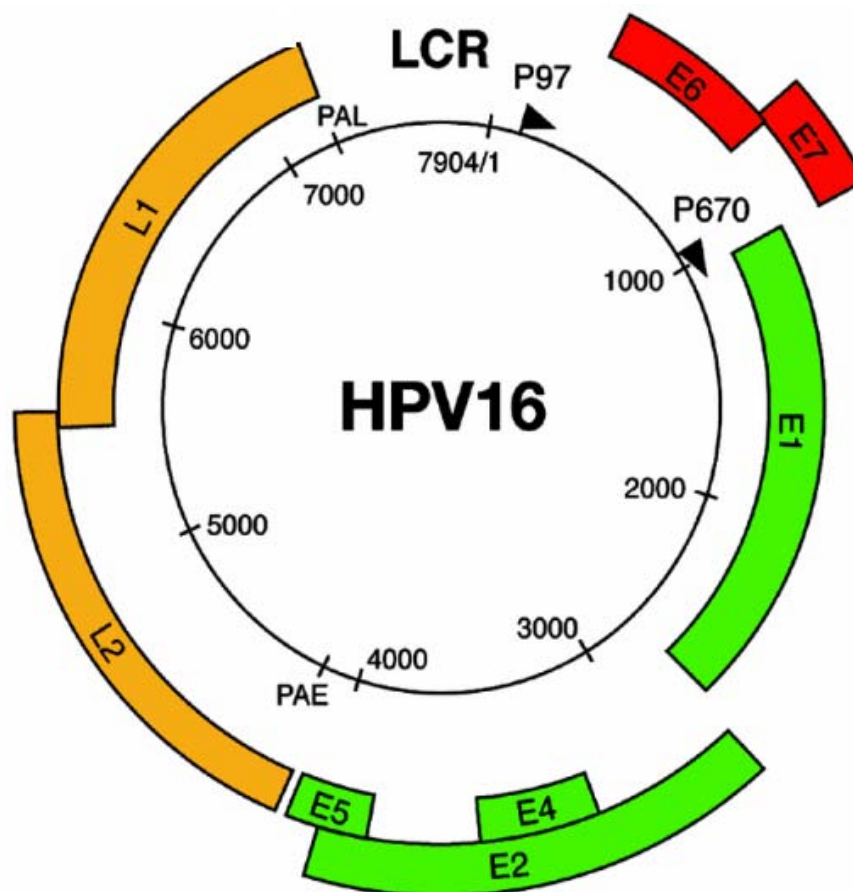
Το γένωμα των HPVs είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, με μήκος 7500-8000 bp, πακεταρισμένο σε ιϊκό καψίδιο, με τη βοήθεια κυτταρικών ιστονών (Εικόνα 6), σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που μοιάζει με χρωματίνη {Favre, M, et al. 1975, Pfister, H, et al. 1977, Orth, G 2008}. Γενικά, το γένωμα των HPVs μπορεί να διαιρεθεί, σε τρεις μεγάλες περιοχές: την πρώιμη περιοχή, την όψιμη περιοχή, και μια μεγάλη περιοχή ελέγχου (LCR, Long Control Region). Οι τρεις αυτές περιοχές σε όλους τους ιούς των ανθρωπίνων θηλωμάτων διαχωρίζονται από δύο πολυαδενυλιωμένες περιοχές (pA sites): την πρώιμη pA περιοχή (PAE) και την όψιμη pA περιοχή (PAL) (Εικόνα 7) {Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

Η πρώιμη περιοχή του γενώματος των HPVs καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γενώματος του ιού και κωδικοποιεί για έξι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) {Danos, O, et al. 1982}. Τα E1 και E2 γονίδια εμπλέκονται στην ιϊκή αντιγραφή του DNA και τη ρύθμιση της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων. Το E4 γονίδιο εκφράζεται στις παραγωγικές λοιμώξεις του ιού και σχετίζεται με την κατάρρευση του δικτύου ινιδίων κυτοκερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, επάγοντας, έτσι, την καταστροφή του δικτύου αυτού και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιϊκών σωματιδίων κατά το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής του ιού. Τα E5, E6 και E7 γονίδια είναι ιϊκά ογκογονίδια και η έκφρασή τους προκαλεί αθανатоποίηση και μετασχηματισμό των κυττάρων {Muñoz, N, et al. 2003}. Το ογκογονικό δυναμικό των στελεχών HPVs υψηλού κινδύνου οφείλεται στις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7, οι οποίες συνδέονται με μια σειρά γονιδιακών προϊόντων και επηρεάζουν τη δράση τους, όπως οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν σε διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα τη γενωμική αστάθεια και τον αυξημένο κίνδυνο για κακοήθειες εξαλλαγές {Kraus, I, et al. 2006}.

Η όψιμη περιοχή του γενώματος όλων των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων, που καλύπτει σχεδόν το 40% του γενώματος του ιού, βρίσκεται

καθοδικά της πρώιμης περιοχής και κωδικοποιεί την βασική δομική L1 πρωτεΐνη και τη δευτερεύουσα L2 πρωτεΐνη του καψιδίου.

**Εικόνα 7.** Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γενώματος του HPV-16.



Η περιοχή LCR είναι ένα τμήμα περίπου 850 bp (10% του γενώματος του ιού), που δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, αλλά φέρει τη θέση έναρξης της αντιγραφής, καθώς και πολλαπλές περιοχές δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την έναρξη της μεταγραφής από την RNA-πολυμεράση II, τόσο από τους πρώιμους, όσο και από τους όψιμους υποκινητές των διαφόρων τύπων HPVs {Bernard, HU 2002}. Παραδείγματος χάριν, το γένωμα του HPV-16 (Εικόνα 7) περιέχει δύο βασικούς υποκινητές: Ο P97 υποκινητής που βρίσκεται ανοδικά του E6 γονιδίου, εντός της LCR, είναι υπεύθυνος για σχεδόν όλη την πρώιμη γονιδιακή έκφραση, ενώ ο P670 υποκινητής βρίσκεται εντός της περιοχής του E7 γονιδίου και είναι υπεύθυνος για την όψιμη γονιδιακή έκφραση {Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

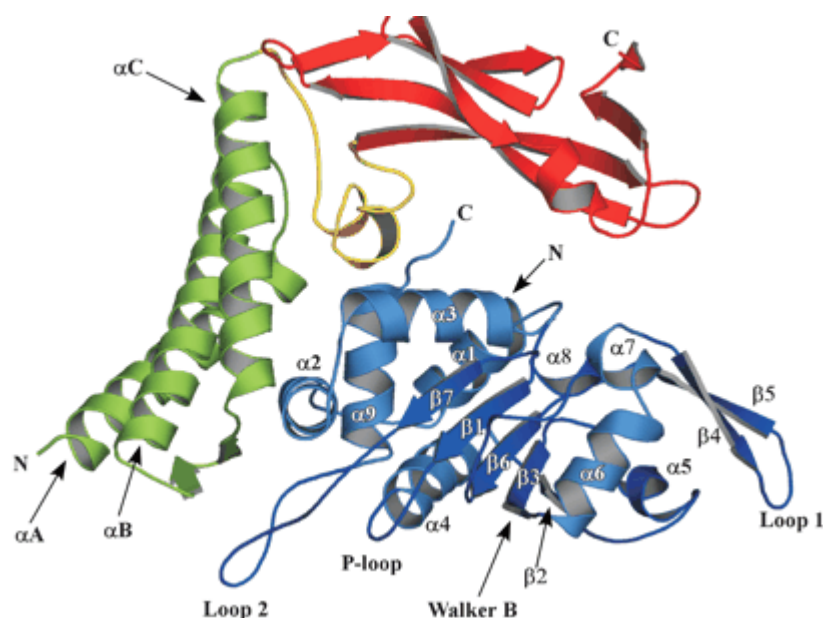
### 1.3.2.1 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1

Η E1 πρωτεΐνη είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλά επίπεδα έκφρασης και μέγεθος περίπου 70-80 kD. Η παρουσία της είναι καθοριστικής σημασίας για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος {Ustav, M &

**Stenlund, A 1991**}. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία της με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 **{Clertant, P & Seif, I 1984, Mansky, KC, et al. 1997}**. Η πρωτεΐνη αυτή έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, επίσης, έχει δραστικότητα ελικάσης, ακόμα, ΑΤΡάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA-πολυμεράσης  $\alpha$  **{Thorner, LK, et al. 1993}**.

Η E1 πρωτεΐνη, παρουσία ATP, προσδένεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε A-T προκαλώντας δομικές αλλαγές. Ως πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους: Πρώτον, έχει δράση πρωτεΐνης πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον, έχει δράση ελικάσης με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει την θέση έναρξης της αντιγραφής **{Liu, JS, et al. 1995}**. Η E1 πρωτεΐνη προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της E2 πρωτεΐνης **(Εικόνα 8)**, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας **{Titolo, S, et al. 2003}**.

**Εικόνα 8.** Σύμπλοκο E1-E2 πρωτεϊνών.



### 1.3.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη έχει μέγεθος περίπου 50 kD και δρα σε διμερή μορφή, ρυθμίζοντας την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιϊκού DNA. Συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης, επιδρά στην ρύθμιση της μεταγραφής, δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας **{Cripe, TP, et al. 1987}**. Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN4CGGT **(Εικόνα 9)** **{Bouvard, V, et al. 1994}**. Οι περιοχές αυτές είναι εντός της περιοχής LCR και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 **{Smotkin, D & Wettstein, FO 1986}**. Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο πλαίσιο TATA, ακριβώς ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης

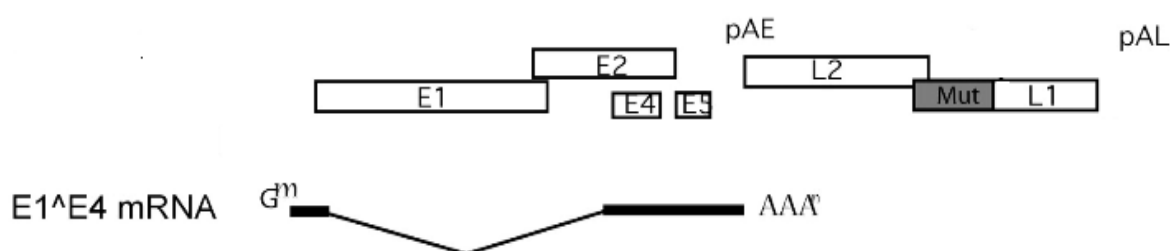




ιού. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της αντιγραφής του ιϊκού γενώματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού {**Wilson, R et al. 2005**}. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 περιλαμβάνει και τα πέντε πρώτα αμινοξέα του E1 γονιδίου σχηματίζοντας την E1<sup>^</sup>E4 πρωτεΐνη, καθώς απουσιάζει από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του E4 το κωδικόνιο έναρξης AUG (**Εικόνα 11**) {**Howley, NP, et al. 1996**}.

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

**Εικόνα 11.** Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E1<sup>^</sup>E4 πρωτεΐνης.



#### 1.3.2.4 Οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E5, E6 και E7

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή, υδρόφοβη πρωτεΐνη, με όχι πλήρως κατανοητή, ως σήμερα, λειτουργία. Εντοπίζεται στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων, στη συσκευή Golgi και περιστασιακά στις κυτταρικές μεμβράνες {**Conrad, M, et al. 1993**}. Η E5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού {**Fehrmman, F, et al. 2003**}. Σε στελέχη Papilloma ιών που προσβάλλουν τα βοοειδή, η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF. Η E5 πρωτεΐνη των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων έχει μικρή ομολογία με την ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών και πιθανώς, λειτουργεί διαφορετικά. Έχει προταθεί ότι η E5 πρωτεΐνη των HPVs συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό, βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της E5 πρωτεΐνης, αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF, με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του {**Straight, SW, et al. 1993**}.

Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας το MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια {**Ashrafi, GH, et al. 2005**}.

Μερικές από τις πρώτες μοριακές εξηγήσεις για το ογκογονικό δυναμικό των HPV-16 και HPV-18, ήρθαν με την παρατήρηση ότι οι E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες τους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις βασικές κυτταρικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, p53 και pRb {**Pim, D & Banks, L 2010**}. Αυτές οι δύο πρώιμες ιικές ογκοπρωτεΐνες, συμβάλλουν από κοινού στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV. Αν και η E7 πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι συνδέεται με την pRb, η πιο καλά χαρακτηρισμένη δραστηριότητα της E6 πρωτεΐνης, είναι το να προκαλεί αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 μέσω του μονοπατιού της ουβικουιτίνης (**Εικόνα 12**) {**Fournane, S, et al. 2010**}.

**Εικόνα 12.** Αλληλεπίδραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών με βασικές κυτταρικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες.



Η p53 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη μεταγραφή και επιπλέον, επάγει την απόπτωση. Ως απάντηση σε βλάβες του DNA, εξάντληση των νουκλεοτιδίων ή υποξία, ενεργοποιείται μέσω ακετυλίωσης και φωσφορυλίωσης, λειτουργώντας ως ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην επαγωγή γονιδίων, τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο ή προκαλούν απόπτωση, ενώ ακόμα μπορεί να επάγει απόπτωση, πιο άμεσα, μέσω αλληλεπίδρασης της με τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος σε μιτοχονδριακές περιοχές {**Pim, D & Banks, L 2010**}. Καθώς οι HPVs εξαρτώνται από το κυτταρικό μηχανισμό σύνθεσης του DNA και πρέπει να προωθήσουν το κύτταρο στη φάση S προκειμένου να αντιγράψουν το γένωμά τους, υπερέκφραση της p53 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η E6 συνδέεται με την πρωτεΐνη p53 μέσω μιας κυτταρικής λιγάσης της ουβικουιτίνης, την E6-AP (E6 Associated protein), η οποία επιστρατεύει το σύμπλοκο των ενζύμων της ουβικουιτίνης και ξεκινά την πρωτεόλυσή της. Η αποικοδόμηση της p53 οδηγεί σε παράκαμψη των σημάτων για ανασχεση της ανάπτυξης στα σημεία ελέγχου G1 / S και G2 / M του κυτταρικού κύκλου και είναι η κύρια αιτία χρωμοσωμικής αστάθειας, με μεταλλαξιγόνες συνέπειες σε κύτταρα μολυσμένα με HPVs, ενώ, ακόμα, διεγείρει την ενσωμάτωση ξένου DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή {**Boulet, G, et al. 2007**}.

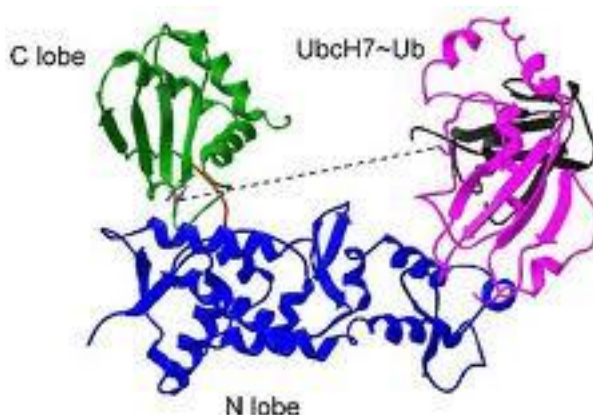
Το E6 είναι ένα από τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τους HPVs. Το E6 ORF κωδικοποιεί μία μικρή πρωτεΐνη, περίπου 150 αμινοξέων με μοριακό βάρος 16-18 kD (**Εικόνα 13**). Οι E6 πρωτεΐνες περιέχουν τέσσερα CxxC μοτίβα, τα οποία είναι σημαντικά για λειτουργίες, όπως η μεταγραφική ενεργοποίηση, ο μετασχηματισμός, η αθανатоποίηση και η αλληλεπίδραση με κυτταρικές πρωτεΐνες. Στην περίπτωση των τύπων HPVs υψηλού κινδύνου που προσβάλλουν τους βλεννογόνους, η COOH-τελική περιοχή της E6 πρωτεΐνης περιέχει μία PSD-95/Dlg/ZO1 (PDZ) επικράτεια πρόσδεσης, που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν τη

PDZ επικράτεια και εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση και τον έλεγχο της πολικότητας των κυττάρων {Fournane, S, et al. 2010}. Κανονικά οι PDZ επικράτειες, {X-(S/T)-X-(V/L/I)}, όπου X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ, όπου S/T σερίνη ή θρεονίνη και όπου V/L/I βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη}, παρουσιάζουν μία συντηρημένη αναδίπλωση από έξι β-πτυχωτά φύλλα που σχηματίζουν ένα β-βαρέλι, το οποίο καλύπτεται από δύο α-έλικες {Yugawa, T & Kiyono, T 2008, Fournane, S, et al. 2010}.

Αντιθέτως, στους τύπους HPVs χαμηλού κινδύνου που προσβάλλουν το δέρμα και τους βλεννογόνους, η E6 πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει τη συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης για πρωτεΐνες που περιέχουν τη PDZ επικράτεια, καθιστώντας τη ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των τύπων HPVs υψηλού κινδύνου που προσβάλλουν τους βλεννογόνους. Η παρουσία της συντηρημένης PDZ επικράτειας πρόσδεσης απαιτείται για την E6-διαμεσολαβούμενη αθανатоποίηση κυττάρων από θηλαστικά, τον p53 ανεξάρτητο μετασχηματισμό κυττάρων από τρωκτικά και την επαγωγή επιθηλιακής υπερπλασίας in vivo {Fournane, S, et al. 2010}. Το γεγονός ότι αυτή η περιοχή πρόσδεσης της E6 για πρωτεΐνες που περιέχουν την PDZ επικράτεια είναι απαραίτητη για την ογκογονικότητά της, αποδεικνύεται με σαφήνεια από τη διαπίστωση ότι σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών, η έλλειψη της επικράτειας πρόσδεσης του PDZ μοτίβου από την E6 πρωτεΐνη, την καθιστά ανίκανη να προκαλέσει υπερπλασία {Pim, D & Banks, L 2010}. Ως εκ τούτου, η αναγνώριση των PDZ επικρατειών από τις E6 πρωτεΐνες, εμφανίζεται ως σημείο κλειδί στην ογκογένεση που διαμεσολαβείται μέσω των ιών HPVs {Fournane, S, et al. 2010}.

Η E6 πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί ότι επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες και αλληλεπιδρά με μια πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών {Mammas, IN, et al. 2008}. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η E6 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με περισσότερες από 30 κυτταρικές πρωτεΐνες {Fournane, S, et al. 2010}. Αυτές περιλαμβάνουν (1) την E6-AP, (2) την E6-BP, που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επιθηλιακή διαφοροποίηση, (3) τον Bak ρυθμιστή του μονοπατιού της απόπτωσης, (4) την πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης paxillin, (5) τις πρωτεΐνες hDlg και hScrib, (6) τις MAGI-1, -2 και -3, (7) τον IRF-3 μεταγραφικό ενεργοποιητή που ενδεχομένως εμπλέκεται στις αντί-ϊκές κυτταρικές αποκρίσεις, (8) την MMP-7, (9) τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP/p300, (10) την τελομεράση, (11) την πρωτεΐνη E6TP1, (12) την Rho-επαγόμενη κινάση σερίνης-θρεονίνης, PKN (13) την Gps2 και (14) την c-myc {Mammas, IN, et al. 2008}.

**Εικόνα 13.** Δομή της E6 ογκοπρωτεΐνης των υψηλού κινδύνου HPVs.



Είναι ενδιαφέρον, ότι η E6 πρωτεΐνη προωθεί την αθανатоποίηση των κυττάρων, αυξάνοντας τα επίπεδα της τελομεράσης {Nominé, Y, et al. 2006}, κυρίως, μέσω αύξησης των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου hTERT. Η πρωτεΐνη hTERT είναι η καταλυτική υπομονάδα του συμπλέγματος του ενζύμου της τελομεράσης και εκφράζεται επιλεκτικά σε ένα μικρό υποσύνολο φυσιολογικών κυττάρων (βλαστοκύτταρα), σε ιστούς με όγκο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η E6 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-στόχο μέσω του μοτίβου πρόσδεσης Leu-XAA-XAA-Leu-Leu (LXXLL μοτίβο, όπου το L είναι η λευκίνη και το X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ). Η πρωτεΐνη hTERT έχει τρία τέτοια μοτίβα LXXLL και αυτή η παρατήρηση οδήγησε τους επιστήμονες να αναζητήσουν μια πιθανή άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των E6 και hTERT πρωτεϊνών {Liu, X, et al. 2009}.

Η E7 πρωτεΐνη είναι, επίσης, μία ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την αθανатоποίηση των κυττάρων, καθώς, επίσης και με την ιϊκή παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 100 αμινοξέα και περιέχει τρεις συντηρημένες περιοχές. Την CR1, CR2 και την CR3 {Barbosa, MS, et al. 1990, Dyson, N, et al. 1992}. Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο, ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλει στην σύνδεση της E7 πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος {Dyson, N, et al. 1992}. Η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου {Munger, K, et al. 1989}.

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητα της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb) (Εικόνα 14) {Dyson, N, et al. 1989}. Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της pRb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων που συμβάλλουν 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 pRb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F και έτσι, να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά την δράση του ιού, η E7 πρωτεΐνη συνδέεται με την pRb, επάγοντας την αποικοδόμηση της pRb μέσω του μονοπατιού της ουβικουτίνης. Η πρόσδεση της E7 πρωτεΐνης στην pRb έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό {Berezutskaya, E et al. 1997, Wang, J, et al. 2001}.

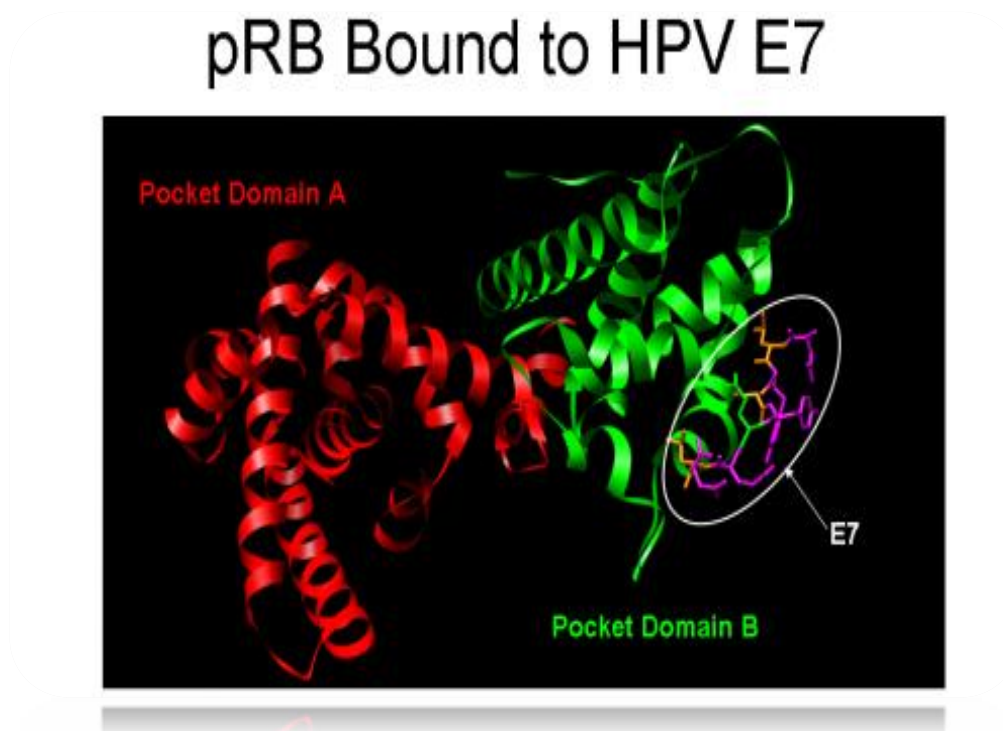
Επιπλέον, η E7 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E, καθώς, επίσης και με τους αναστολείς των κυκλίνω-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα, η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρει την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της pRb και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

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρά με την E7 πρωτεΐνη είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη pRb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F/υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο-ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν, επιπρόσθετα, να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F, αναστέλλοντας την λειτουργία του. Ακόμη,



έχει αναφερθεί, ότι η πρόσδεση της E7 πρωτεΐνης στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την απορύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC, με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού {Longworth, MS, et al. 2004, Brehm, A, et al. 1999}.

**Εικόνα 14.** Η E7 πρωτεΐνη συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος.

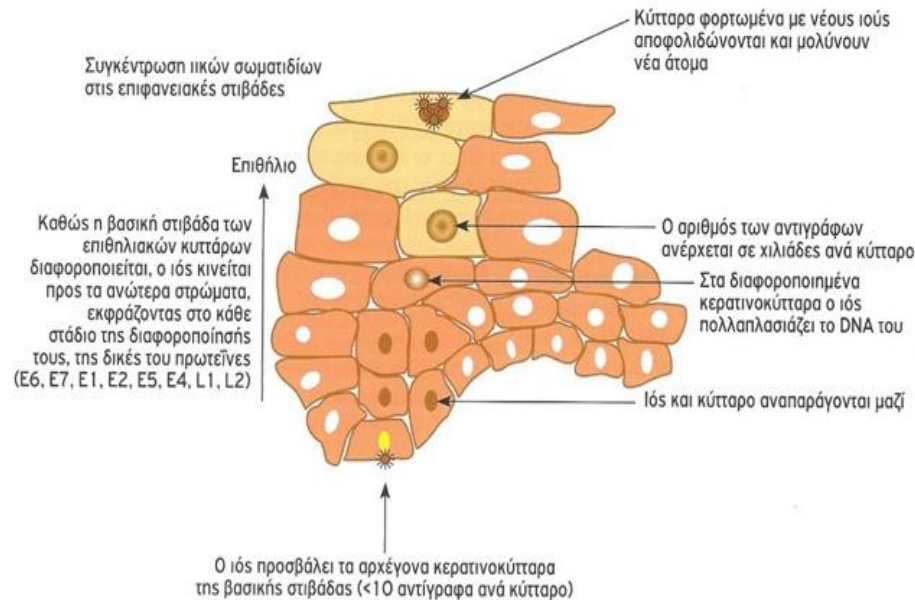


## 1.4. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ HUMAN PAPILLOMAVIRUSES

### 1.4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων. Η αρχική μόλυνση απαιτεί πρόσβαση του ιού στα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας των επιθηλίων, γεγονός που πραγματοποιείται μέσω μικροτραυματισμών ή εκδορών. Ο κύκλος ζωής που ακολουθούν οι HPVs είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του εκάστοτε επιθηλίου. Τα κύτταρα αυτά είναι κύτταρα που διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Ο ιός, αφού ενσωματωθεί στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί τον κύκλο της ζωής τους, εκφράζοντας σε κάθε στάδιο της διαφοροποίησής τους τις διάφορες πρωτεΐνες του. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται μόνο στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και οι νέοι ιοί απελευθερώνονται με την απόπτωση των κυττάρων στα οποία περιέχονται (**Εικόνα 15**) {Egawa, K 2003, Schmitt, A, et al. 1996}.

**Εικόνα 15.** Ο μολυσματικός κύκλος του HPV απαιτεί πρόσβαση του ιού στα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας των επιθηλίων.



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

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

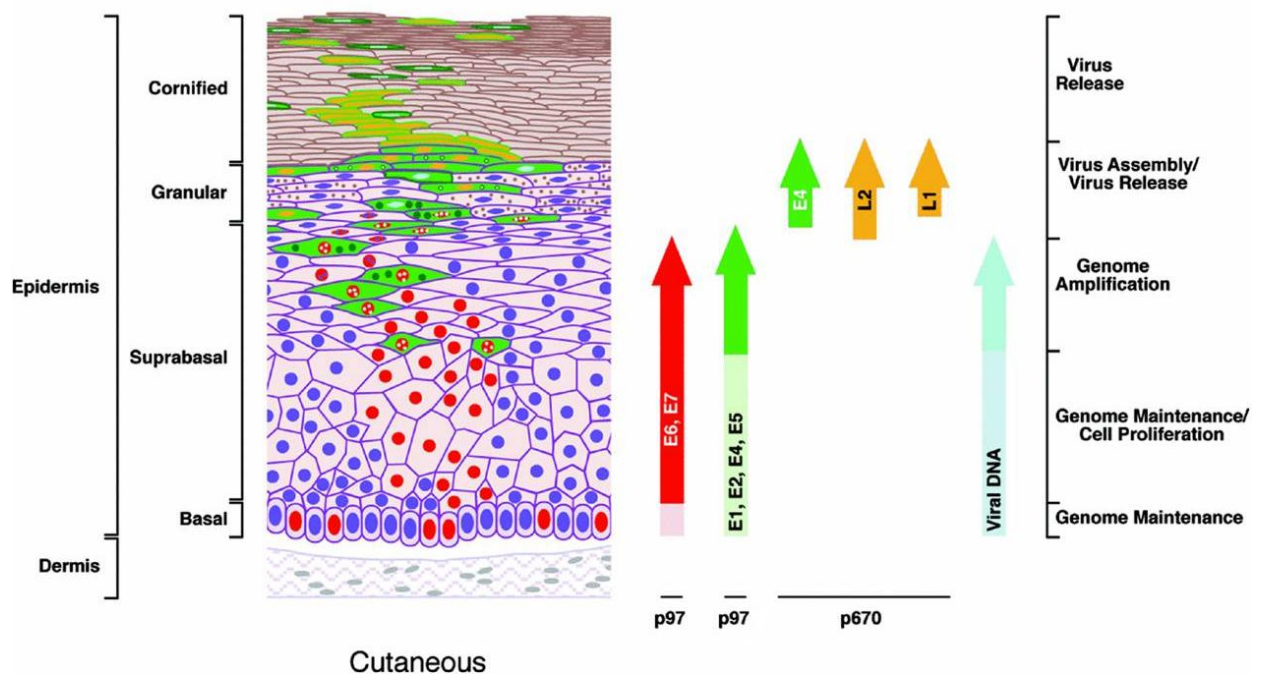
### 1.4.2 Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος

Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων των HPVs εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως, ο μηχανισμός με τον

οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPVs δεν είναι πλήρως κατανοητός {Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

Στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται οι έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6, και E7) από την πρόιμη περιοχή του ιϊκού γενώματος (**Εικόνα 16**). Τα έξι πρόιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρόιμου υποκινητή (πχ. του P97 για τον HPV-16, και τον HPV-31 και του P105 για τον HPV-18). Ο υποκινητής P97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρόιμων γονιδίων. Από την άλλη πλευρά, στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιϊκού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του όψιμου υποκινητή P670. Ο υποκινητής αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιϊκών γονιδίων {Grassmann, K, et al. 1996}.

**Εικόνα 16.** Κύκλος ζωής και μεταγραφή του ιϊκού γενώματος.



### 1.4.3 Εγκατάσταση του ιού

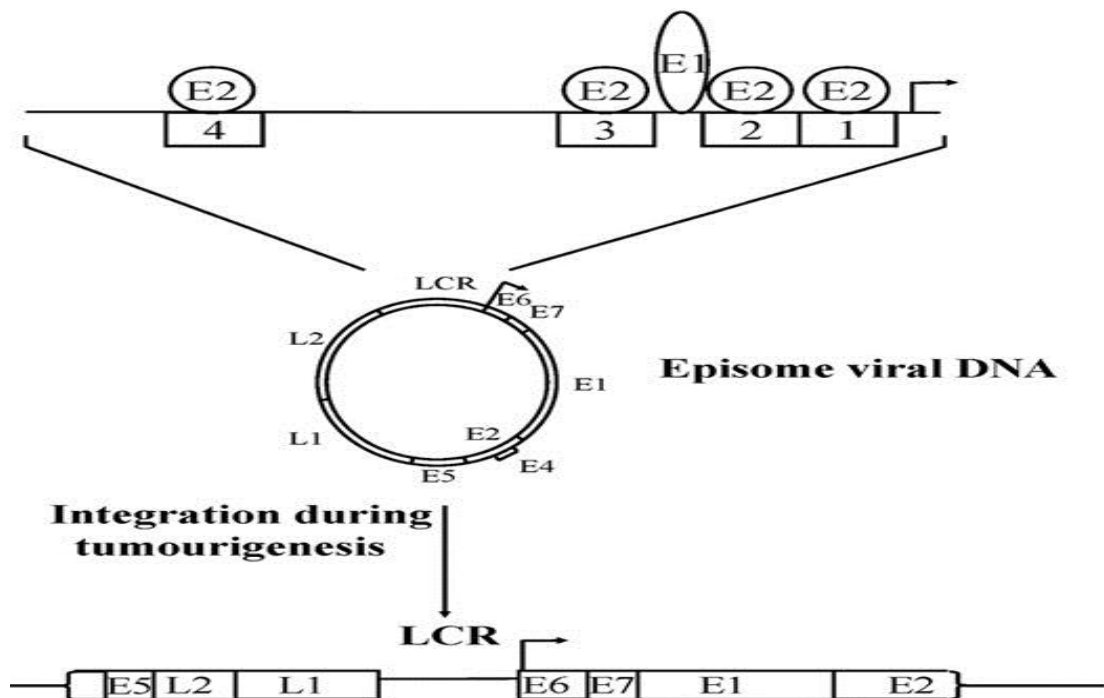
Μετά από την είσοδο του ιού και την απέκδυση, θεωρείται ότι ο ιός διατηρεί το γένωμά του σε επισωματική μορφή και σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου. Το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων του ιού στα κύτταρα αυτά δεν είναι καλά καθορισμένο, αλλά γενικά είναι αποδεκτό ότι οι E1 και E2 ιϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται προκειμένου να διατηρηθεί το DNA του ιού σε



επισωματική μορφή (**Εικόνα 16**) {Wilson, VG, et al. 2002} και να γίνει επίσης σωστά ο διαχωρισμός των γονιδιωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση {You, J, et al. 2004}. Η αποτυχία να εκφραστεί η E1 πρωτεΐνη πλήρους μήκους, για παράδειγμα, στον HPV-31, αποτρέπει τη διατήρηση του γενώματος σε επισωματική μορφή και προάγει την ενσωμάτωση του ιϊκού γενώματος σε κάποιο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή {Frattoni, MG, et al. 1996}.

Κατά συνέπεια, το γένωμα του ιού μπορεί να εντοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή σε δύο μορφές: σε επισωματική μορφή ή ενσωματωμένο στα χρωμοσώματα του πυρήνα, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών (**Εικόνα 17**). Από διάφορες μελέτες έχει βρεθεί ότι η ενσωμάτωση διαταράσσει, γενικά, τις E1 και E2 περιοχές του γενώματος του ιού {Vinokurova, S, et al. 2008, Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

**Εικόνα 17.** Χαρακτηριστικές μορφές γενετικού υλικού των HPVs: Επίσωμα ή ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.



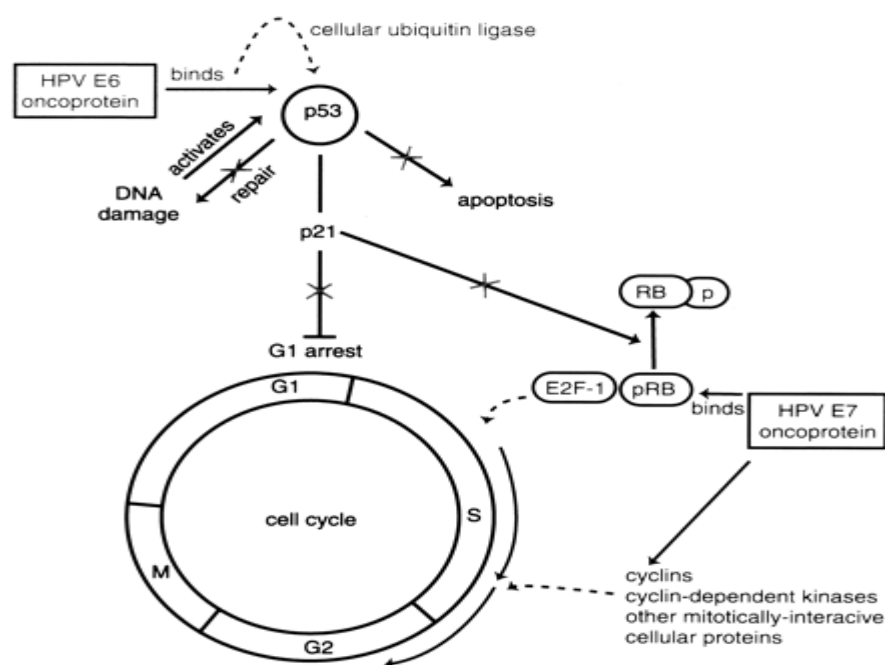
Έχει, ακόμη, προταθεί ότι το ιϊκό γένωμα διατηρείται στα κύτταρα της βασικής στιβάδας σε περίπου 10-200 αντίγραφα ανά κύτταρο, και ότι οι πρώιμες πρωτεΐνες του ιού (E6, E7, E1 και E2) εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα {De Geest, K, et al. 1993, Stanley, MA, et al. 1989}. Πιο συγκεκριμένα, τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα προϊόντα των οποίων διεγείρουν την αντιγραφή του DNA, ενώ ταυτόχρονα η E2 πρωτεΐνη ενεργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας την δράση των γονιδίων E6 και E7. Με την ενσωμάτωση, όμως του ιϊκού γενώματος στα χρωμοσώματα του κυττάρου ξενιστή, το E2 γονίδιο διαρρηγνύεται και απενεργοποιείται με αποτέλεσμα να υπερεκφράζονται οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Τα υψηλά επίπεδα αυτών των ογκοπρωτεϊνών επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, οδηγώντας σε διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα τη γενωμική αστάθεια και τον αυξημένο κίνδυνο για

κακοήθεις εξαλλαγές {Kraus, I, et al. 2006, Corden, SA, et al. 1999, Pett, MR, et al. 2006}.

#### 1.4.4 Παραγωγική φάση

Κατά τη λοίμωξη με ιούς των ανθρωπίνων θηλωμάτων, οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 εκφράζονται στα μολυσμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η φυσιολογική διαφοροποίησή τους {Sherman, L et al. 1997}. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες συνδέονται με μια σειρά γονιδιακών προϊόντων και επηρεάζουν τη δράση τους, όπως οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb, διεγείροντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S (Εικόνα 18). Έκφραση των E6 και E7 γονιδίων στα κατώτερα κύτταρα του επιθηλίου τα οδηγεί στην φάση S, η οποία δημιουργεί ένα περιβάλλον που είναι ευνοϊκό για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων {Kraus, I, et al. 2006}.

**Εικόνα 18.** Προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S από τις E6 και E7 πρωτεΐνες.



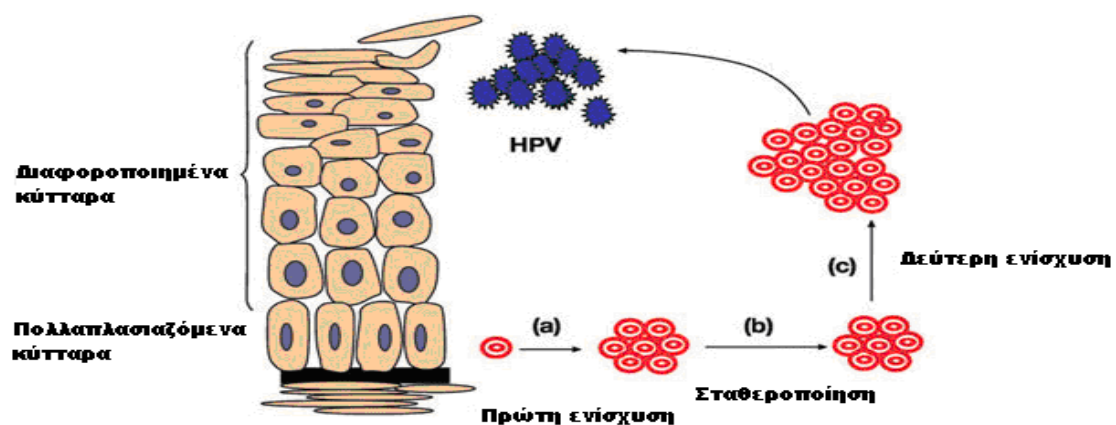
#### 1.4.5 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Σε πρώτη φάση, το γένωμα του ιού αντιγράφεται, όπως ήδη αναφέραμε, στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, όπου και διατηρείται σε επισωματική μορφή σε περίπου 10-200 αντίγραφα ανά κύτταρο (Εικόνα 19). Σε αυτό το σημείο, το ιϊκό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα {De Geest, K, et al. 1993, Stanley, MA, et al. 1989}.

Εν συνεχεία, το γένωμα του ιού πολλαπλασιάζεται και πάλι κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στρώδας στην φάση S. Έτσι, χρησιμοποιώντας το μηχανισμό της DNA αντιγραφής του κυττάρου-ξενιστή, ο ιός συνθέτει το δικό του ιϊκό DNA, κατά μέσο όρο μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο.

Σε τελική φάση, καθώς η βασική στρώδα των επιθηλιακών κυττάρων διαφοροποιείται, ο ιός κινείται προς τα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου (επιφανειακές στρώδες). Στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο ιός πολλαπλασιάζει το DNA του σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων, συνθέτει τις καψιδιακές του πρωτεΐνες και προκαλεί την πλήρη συγκρότηση των ιϊκών σωματιδίων του {Hoffmann, R, et al. 2006}.

**Εικόνα 19.** Φάσεις αντιγραφής του ιϊκού γενώματος κατά τον κύκλο ζωής του ιού.



#### 1.4.6 Συναρμολόγηση ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Οι HPVs κωδικοποιούν για δύο δομικές πρωτεΐνες που εκφράζονται αποκλειστικά στα ανώτερα στρώματα των μολυσμένων ιστών, αφού η ενίσχυση του ιϊκού γενώματος έχει ολοκληρωθεί {Ozbun, MA & Meyers, C 1998}. Η L2 είναι μια μικρή πρωτεΐνη που, όπως και η L1 πρωτεΐνη, παράγεται σε ένα υποσύνολο κυττάρων που εκφράζουν την E4 πρωτεΐνη {Doorbar, J, et al. 1997}. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου L1 εκφράζεται μετά την L2 πρωτεΐνη, επιτρέποντας τη συναρμολόγηση των μολυσματικών σωματιδίων στο ανώτερο στρώμα του επιθηλίου {Florin, L, et al. 2002}. Τα ιϊκά σωματίδια συγκροτούνται από ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA μεγέθους περίπου 8000 ζευγών βάσεων μέσα σε ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, που περιέχει 360 αντίγραφα της L1 πρωτεΐνης, και πιθανώς 12 αντίγραφα της L2, που οργανώνονται σε 72 καψομερή {Modis, Y, et al. 2002}. Η L2 πρωτεΐνη θεωρείται ότι υποβοηθά τη συναρμολόγηση του ιού, αν και καψίδια χωρίς γένωμα, γνωστά ως Virus-Like Particles μπορούν να συγκροτηθούν, ακόμα και απουσία της L2 πρωτεΐνης {Stauffer, Y, et al. 1998, Zhou, J, et al. 1993}.

Για να ολοκληρωθεί επιτυχώς ο κύκλος ζωής του ιού, ο ιός θα πρέπει, τελικά, να ξεφύγει από το μολυσμένο κύτταρο και να επιβιώσει εκτός κυττάρου

μέχρι την επόμενη μόλυνση. Οι HPVs δεν λύουν τα κύτταρα μετά τον πολλαπλασιασμό τους σε αυτά προκειμένου να εξέλθουν από αυτά. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται αποκλειστικά στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και οι νέοι ιοί απελευθερώνονται ύστερα από την απόπτωση που υφίστανται σε τελική φάση τα κύτταρα στα οποία περιέχονται (Εικόνες 15 & 16) {Roden, RB, et al. 1997, Bryan, JT and Brown, TR 2001}.

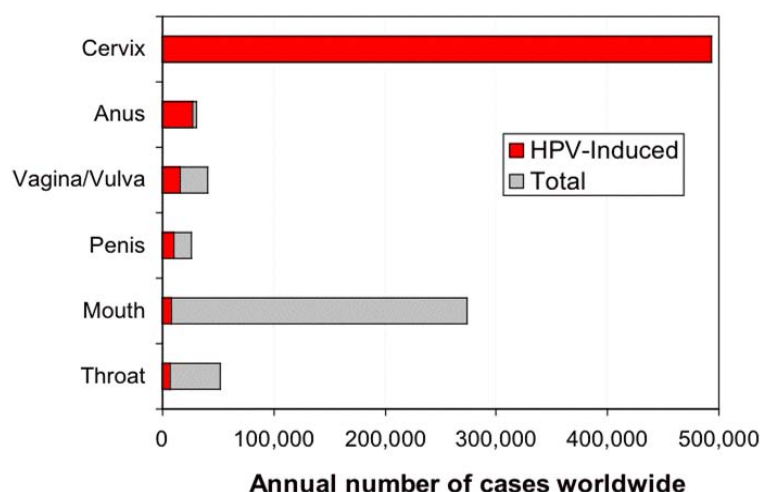
## 1.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι HPVs παρουσιάζουν τύπο-ειδικό τροπισμό για τα επιθήλια του δέρματος και των βλεννογόνων {Stacey, SN, et al. 1995} και προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων που κυμαίνονται από κονδυλώματα ως νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο {Doorbar, J 2006}. Επιπλέον, οι περισσότεροι καρκίνοι του κόλπου και του πρωκτού, προκαλούνται, επίσης, από ιούς HPV, όπως και ένα μέρος των καρκίνων του αιδοίου, του πέους και του στοματοφάρυγγα. Τέλος, άλλες κακοήθειες που προκαλούν είναι το πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος και ο καρκίνος του επιπεφυκότα {Boulet, G, et al. 2007}.

Οι ιοί αυτοί, όπως ήδη αναφέρθηκε, μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες υψηλού κινδύνου ή χαμηλού κινδύνου ανάλογα με την τάση για κακοήγη εξέλιξη των αλλοιώσεων που προκαλούν. Οι υψηλού κινδύνου τύποι HPVs, όπως είναι οι HPV-16, HPV-18 και HPV-31, συνδέονται με πάνω από το 90% των περιπτώσεων των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Η μόλυνση με τους παραπάνω τύπους HPVs είναι η κύρια αιτία δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας ή χαμηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας θεωρείται ότι προέρχεται από αυτές τις αλλοιώσεις μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα {Yugawa, T & Kiyono, T 2008}.

Μολύνσεις με τους HPVs είναι ευρέως διαδεδομένες και κατ' εκτίμηση το 80% όλων των γυναικών μολύνεται με τον ιό HPV σε κάποια στιγμή της ζωής του. Ωστόσο, λοίμωξη με τον ιό HPV δεν εγγυάται αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου {Scheurer, MS, et al. 2005}.

**Εικόνα 20.** Αριθμός περιστατικών καρκίνων που οφείλονται στους HPVs παγκοσμίως.



~ 20 ~

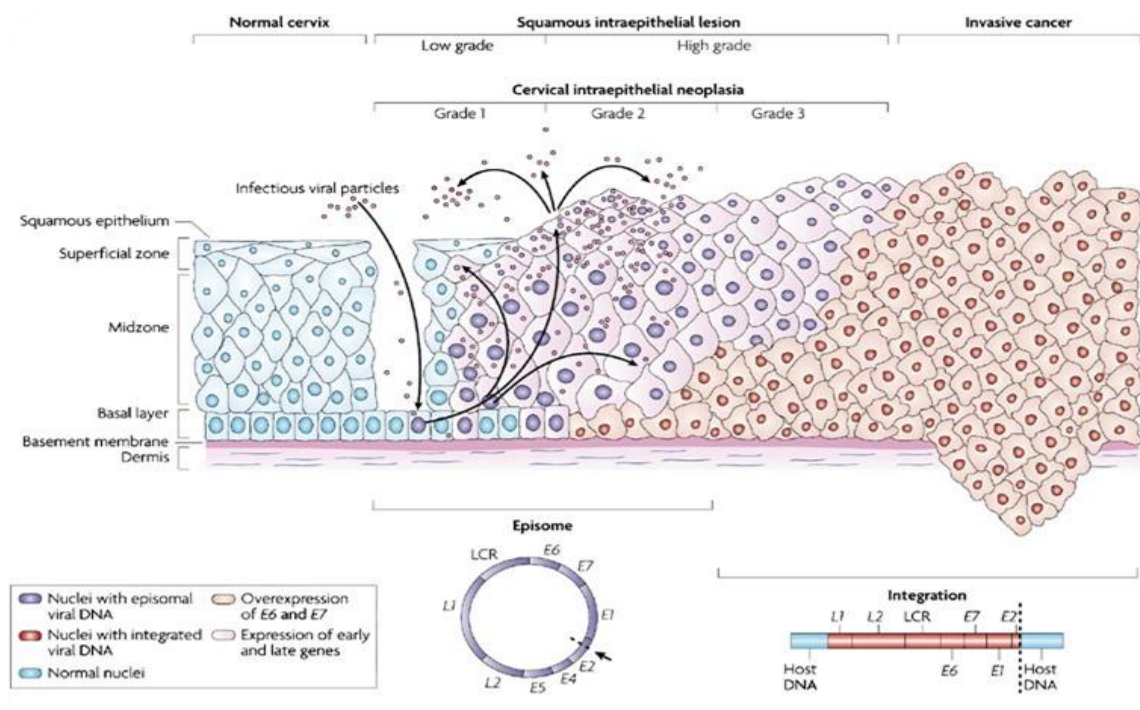
Οι HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45 και HPV-51 είναι οι πιο κοινοί τύποι που ταυτοποιούνται στο πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας με περισσότερο από το 55% των περιπτώσεων σε παγκόσμιο επίπεδο να συνδέεται με τον HPV-16 και 23% των περιπτώσεων να σχετίζεται με τον HPV-18. Η εξέλιξη σε καρκίνο είναι σπάνια, όμως ο καρκίνος του τραχήλου είναι πλέον η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως. Επί του παρόντος, περίπου 500.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου διαγιγνώσκονται παγκοσμίως ανά έτος, με τη θνησιμότητα να αγγίζει το ένα τρίτο περίπου των περιπτώσεων (Εικόνα 20) {Charbonnier, S, et al. 2008, Yugawa, T & Kiyono, T 2008, Schmitt, M, et al. 2009}.

## 1.6 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

Η ονομασία και η ταξινόμηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας έχει αλλάξει πολλές φορές κατά τον 20ο αιώνα. Το σύστημα ταξινόμησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ήταν περιγραφικό της αλλοίωσης, χαρακτηρίζοντας την ως ήπια, μέτρια, ή σοβαρή δυσπλασία (ανάλογα με το πάχος του τραχηλικού επιθηλίου που καταλαμβάνεται από νεοπλασματικά κύτταρα) ή καρκίνωμα *in situ* (αλλοιώσεις στις οποίες όλο το πάχος του επιθηλίου έχει αντικατασταθεί από αδιαφοροποίητα νεοπλασματικά κύτταρα).

Ο όρος τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Cervical Intraepithelial Neoplasia ή CIN) αναπτύχθηκε αργότερα για να δώσει έμφαση στο φάσμα των ανωμαλιών των αλλοιώσεων και να βοηθήσει στην τυποποίηση της θεραπείας. Κατατάσσει την ήπια δυσπλασία ως CIN1, την μέτρια δυσπλασία ως CIN2 και τη σοβαρή δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ* ως CIN3.

**Εικόνα 21.** Ταξινόμηση προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας.





Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση είναι αυτή της Bethesda που κατατάσσει όλες τις αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας σε 2 ομάδες: Χαμηλού βαθμού Πλακώδης Ενδοεπιθηλιακή Αλλοίωση (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion ή LGSIL) που αντιστοιχεί σε CIN1 και Υψηλού βαθμού Πλακώδης Ενδοεπιθηλιακή Αλλοίωση (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion ή HGIL) που αντιστοιχεί σε CIN2 και CIN3 αλλοιώσεις (**Εικόνα 21**) {Wright, TC 2006}.

## 1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Για την εργαστηριακή διάγνωση των HPVs χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι ρουτίνας. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν το Τεστ Παπανικολάου (test pap) και το Hybrid Capture II Test. Η ανίχνευση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας και η διάγνωση του καρκίνου με αυτές τις δύο μεθόδους είναι κατά το δυνατόν έγκαιρη και έγκυρη.

### 1.7.1 Τεστ Παπανικολάου (Pap test)

Το τεστ Παπανικολάου (Pap test) εφαρμόστηκε και αναπτύχθηκε από τον ιατρό Γεώργιο Παπανικολάου (**Εικόνα 22**), έναν Αμερικανό Ανατόμο, Ελληνικής καταγωγής, που ερευνούσε την επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στο επιθήλιο του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Το 1926 ανέφερε ότι καρκινικά κύτταρα μπορούσαν να παρατηρηθούν στις κολπικές εκκρίσεις από γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το 1943 δημοσίευσε το άρθρο «Διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από το κολπικό επίχρισμα». Οι παρατηρήσεις του αυτές σύντομα επιβεβαιώθηκαν και από άλλους.

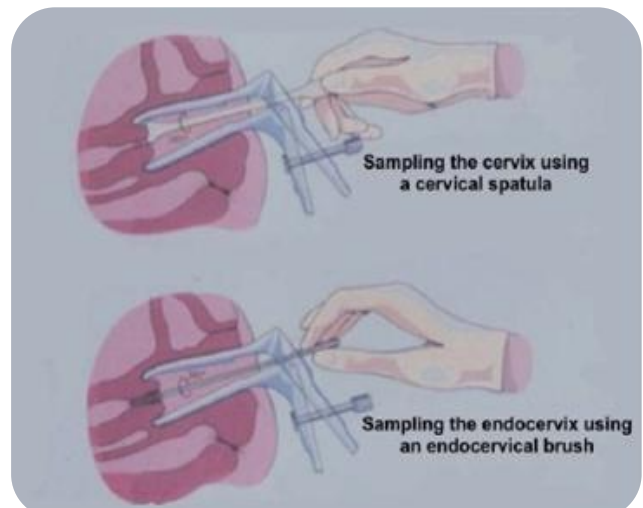


**Εικόνα 22.** Γεώργιος Παπανικολάου (1883-1962).

Το τεστ Παπανικολάου χρησιμοποιείται παγκοσμίως για την ανίχνευση του προδιηθητικού καρκίνου του τραχήλου. Η συμβατική διαδικασία περιλαμβάνει την απομάκρυνση ενός δείγματος επιθηλιακών κυττάρων από την επιφάνεια του τραχήλου χρησιμοποιώντας ειδική σπάτουλα ή βουρτσάκι (**Εικόνα 23**).

**Εικόνα 23.** Λήψη δείγματος Test Pap.

Τελευταία, αντί για τη συμβατική μέθοδο, εφαρμόζεται η κυτταρολογία υγρής φάσης (LBC) για



την προετοιμασία του επιχρίσματος. Η LBC έχει το πλεονέκτημα ότι είναι κατάλληλη για επιπρόσθετες εξετάσεις. Σύμφωνα με αυτήν, το δείγμα μεταφέρεται σε ένα φιαλίδιο με συντηρητικό υγρό, όπου τα κύτταρα διασκορπίζονται. Ένα υποπολλαπλάσιο του διαθέσιμου υλικού επιλέγεται για την επεξεργασία, κατά την οποία τα κύτταρα χωρίζονται με φυγοκέντρωση ή φιλτράρισμα. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε γυάλινη επιφάνεια και στέλνονται στο κυτταρολογικό εργαστήριο, όπου προετοιμάζονται με ειδικές χρώσεις για την μικροσκοπική εξέταση. Η αρχική μικροσκόπηση γίνεται από κυτταροτεχνολόγο που έχει εκπαιδευτεί για να ανιχνεύει άτυπα κύτταρα ανάμεσα σε χιλιάδες φυσιολογικά στο επίχρισμα.

Οι γυναίκες με προβληματικά επιχρίσματα παραπέμπονται σε περαιτέρω εξετάσεις και θεραπεία. Η ανίχνευση καρκίνου που βρίσκεται στο προδιηθητικό στάδιο έχει σώσει πολλές ζωές. Στην πλειονηφία των επιχρισμάτων, η διάκριση μεταξύ των καλοηθών επιθηλιακών κυττάρων και των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να γίνει από έναν έμπειρο κυτταρολόγο και τα επιχρίσματα μπορούν να ταξινομηθούν ως «LGSIL» ή «HGSIL», σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα της Bethesda. Εντούτοις σε ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων μπορεί να υπάρξει αμφιβολία ως προς το εάν τα επιθηλιακά κύτταρα είναι καλοήγη νεοπλασματικά. Σύμφωνα με το σύστημα της Bethesda, τέτοια επιχρίσματα ταξινομούνται στην κατηγορία που περιέχει “άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιοριστου σημασίας” (atypical squamous cells of undetermined significance ή ASCUS) {Howell, LP, et al. 1998, Wright, TC 2006}.

### 1.7.2 Hybrid Capture II test

Σε γυναίκες άνω των 30 ετών, για την ανίχνευση του HPV μαζί με το Test Pap συνιστάται και το Hybrid Capture II test. Το Hybrid Capture II test είναι μια μη ραδιενεργή μέθοδος που βασίζεται στην ενίσχυση σήματος, από τον υβριδισμό ιχνηθετημένων DNA ανιχνευτών με το DNA του HPV στόχου. Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται DNA ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες 12 τύπων HPVs υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπων HPVs χαμηλής επικινδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44). Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των τύπων HPVs με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση λοιμώξεων από τους HPVs σε σχέση με το Test Pap και το Hybrid Capture II test {Clavel, C, et al. 1998}.

## 1.8 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Η PCR είναι η πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση των μολύνσεων από τους HPVs. Γενικά, υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων DNA των HPVs. Πάντως, στις PCR αντιδράσεις χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια που ενισχύουν την συντηρημένη περιοχή L1 του ιού. Τέτοια συστήματα για την ανίχνευση των HPVs είναι οι συνδυασμοί των

εκκινητικών μορίων MY09 και MY11 (MY-PCR) ή των εκκινητικών μορίων GP5+ και GP6+. Τα δύο αυτά συστήματα έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία, ωστόσο διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης κάποιων τύπων HPVs {Qu, W, et al, 1997}.

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

Πέρα από τις κλασσικές μεθόδους PCR για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPVs, χρησιμοποιείται και η 'real time PCR'. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια της μεθόδου είναι σχεδιασμένα, έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των HPVs υψηλής επικυνδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους ογκογόνους τύπους των HPVs και παραμένουν άθικτα και στην επισωματική μορφή και στην ενσωματωμένη τους μορφή στο γένωμα του ξενιστή. Εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου, η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των HPVs είναι δυνατόν να γίνει και με Nested Multiplex PCR. Χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPVs υψηλού κινδύνου. Από τη διαδικασία αυτή, δημιουργείται ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων των γονιδίων E6 και E7, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετά διαθέσιμο υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με μία ακόλουθη Nested Multiplex PCR. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού. Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές, συνήθως, χρησιμοποιούνται σε μείγματα και οργανώνονται σε αυτά έτσι, ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού τους να είναι κατά το δυνατόν παραπλήσια {Sotlar, K, et al. 2004}.

Σήμερα, επίσης, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με τον πλέον αξιόπιστο τρόπο η διερεύνηση των ενσωματωμένων τύπων του ιού HPV με τη βοήθεια της τεχνολογίας NASBA ή των τεχνικών RT-PCR. Αυτό, επιτυγχάνεται με τη μελέτη της έκφρασης του mRNA των E6 και E7 γονιδίων των τύπων HPVs υψηλού κινδύνου. Η μελέτη αυτή είναι πολύ χρήσιμη στην κλινική πράξη, επειδή τα E6 και E7 γονίδια σχετίζονται άμεσα με την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων του



τραχήλου της μήτρας. Πιο συγκεκριμένα, η σημαντικότητα του mRNA test φαίνεται από το γεγονός ότι η περαιτέρω μεταγραφή και μετάφραση των ογκογονιδίων των HPVs οδηγεί με μεγαλύτερη πιθανότητα σε αυξημένη ογκογονική δραστηριότητα και κατ' επέκταση στην εξέλιξη της τραχηλικής νεοπλασίας (CIN). Μάλιστα, σε πολλές μελέτες έχει εξακριβωθεί ότι το mRNA test δίνει περισσότερα θετικά αποτελέσματα σε αλλοιώσεις CIN III ή σοβαρότερες παρά σε αλλοιώσεις CIN II {Molden, T, et al. 2005, Trope, A, et al. 2009}.

Η p16 είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που παράγουν τα φυσιολογικά κύτταρα για να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο πριν τη φάση της σύνθεσης και της περαιτέρω διαίρεσής τους. Αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες (biomarkers) των κυττάρων που είναι μολυσμένα από HPVs υψηλού κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της p16 μπορεί να υποδείξει την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων. Η δράση της p16 πρωτεΐνης είναι ογκοκατασταλτική. Στα φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχει ένα σημείο αναμονής (restriction point) στο τέλος της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, στο οποίο λαμβάνεται η απόφαση για το αν το κύτταρο είναι έτοιμο να προχωρήσει στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η p16 επεμβαίνει ρυθμιστικά και αποτρέπει τη σύνδεση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) με τις κυκλίνες (cyclins). Όταν επιτευχθεί μια τέτοια σύνδεση CDK/cyclin (συγκεκριμένα σύνδεση της CDK4 ή 6 με την cyclin D), τότε ενεργοποιείται η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στις επόμενες φάσεις του. Εν προκειμένω, ενεργοποιούνται οι παράγοντες μεταγραφής του DNA με απώτερο στόχο την περαιτέρω διαίρεση του κυττάρου.

Στα κύτταρα που έχουν υποστεί λοίμωξη από HPVs παρατηρείται αυξημένη έκφραση κυκλινών, οι οποίες ανταγωνίζονται την p16. Προσπαθούν, δηλαδή, να συνδεθούν με τις CDKs, ώστε να ευνοηθεί η συνέχιση του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια, η σύνδεση CDK4-6/cyclinD φωσφορυλιώνει το ρετινοβλάστωμα pRb. Έτσι, απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F που επιτρέπει τη μετάβαση από τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στην S (φάση σύνθεσης). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη που οδηγεί σε καρκίνο. Μια μελέτη απέδειξε ότι η p16 σε συνδυασμό με τις προηγούμενες μεθόδους αποτελεί ιδιαίτερα χρήσιμο βιολογικό δείκτη της εξέλιξης των LGSIL αλλοιώσεων σε HGSIL. Ειδικότερα, οι ασθενείς με ASCUS ή LGSIL αλλοίωση και ύπαρξη κάποιου τύπου HPV υψηλού κινδύνου που έδωσαν θετικό p16 είχαν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν HGSIL απ' ότι εκείνοι με αρνητικό p16 {Carozzi, FM 2008}.

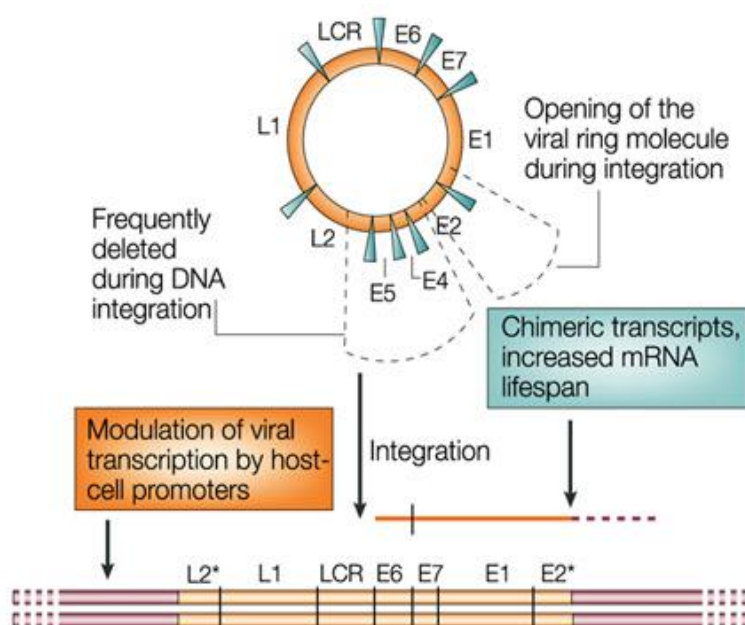
## 1.9 ΤΟ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ ΣΤΟΥΣ HPVs

Το γένωμα του HPV-16, όπως και όλων τύπων HPVs υψηλού κινδύνου περιέχει δύο βασικούς υποκινητές. Για παράδειγμα, στον HPV-16, ο P97 υποκινητής που βρίσκεται ανοδικά του E6 γονιδίου είναι υπεύθυνος για σχεδόν όλη την πρώιμη γονιδιακή έκφραση {Smotkin, D, et al. 1986}, ενώ ο P670 υποκινητής βρίσκεται εντός της περιοχής του E7 γονιδίου και είναι υπεύθυνος για την όψιμη γονιδιακή έκφραση.

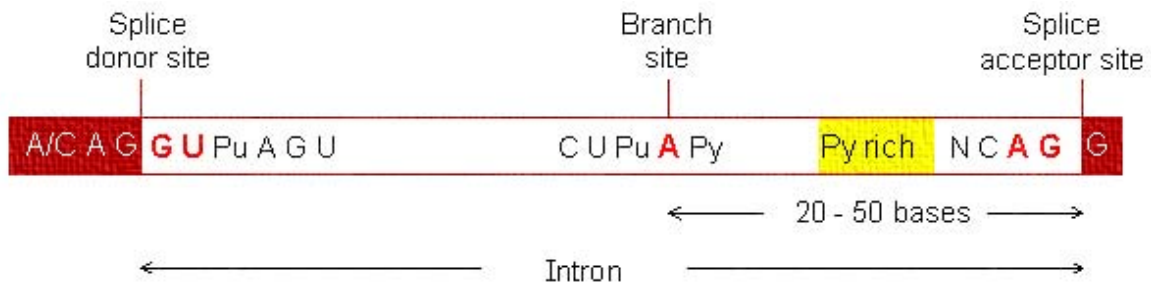
Αλλαγές στην σταθερότητα των πρώιμων mRNAs μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο, αυξάνοντας την έκφραση των E6 και E7

πρωτεϊνών στα τελευταία στάδια της κακοήθους εξέλιξης {Zheng, ZM & Baker, CC 2006}. Το γένωμα των HPVs αντιγράφεται σε επισωματική μορφή στα κύτταρα του ξενιστή, αλλά στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, το DNA του ιού συχνά εντοπίζεται ενσωματωμένο στα χρωμοσώματα του ξενιστή. Η ενσωμάτωση διαταράσσει, γενικά, τις E1 και E2 περιοχές, με αποτέλεσμα τα E6 και E7 mRNAs να εκφράζονται ως χίμαιρες. Η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο DNA των κυττάρων του ξενιστή φαίνεται να αντιστοιχεί στην ανάπτυξη υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου, ως συνέπεια του υψηλού επιπέδου έκφρασης των E6 και E7 γονιδίων. Αν η ενσωμάτωση γίνει ανοδικά της πολύ (A) περιοχής ενός κυτταρικού γονιδίου με σταθερά mRNAs, τα χιμαιρικά ιικά mRNAs θα είναι πιο σταθερά από τα ιικά mRNAs που εκφράζονται από τα εξωχρωμοσωματικά ιικά γενώματα, οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων των ιικών mRNAs στις περιπτώσεις καρκίνου (Εικόνα 24) {Vinokurova, S, et al. 2008, Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

**Εικόνα 24.** Μηχανισμός Υπερέκφρασης των γονιδίων E6 και E7.

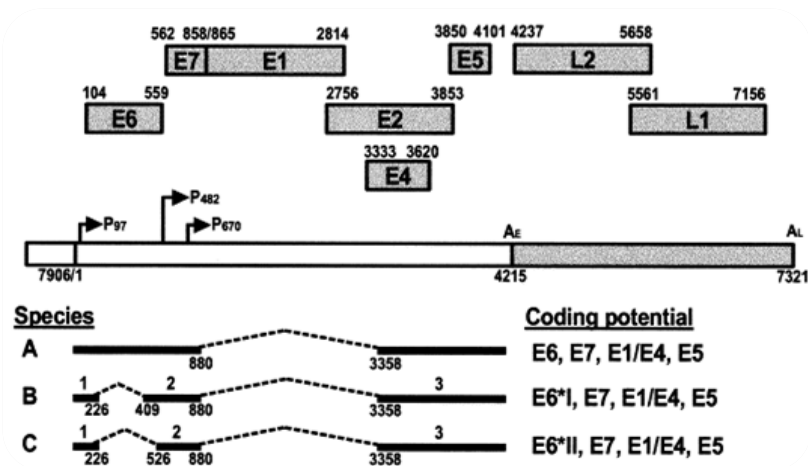


Τα μετάγραφα των Papilloma ιών είναι σχεδόν όλα πολυκιστρονικά, με πολλά εξώνια και εσώνια. Αυτά τα πολυκιστρονικά μετάγραφα χαρακτηρίζονται από κατάλληλα σήματα ματίσματος και υποβάλλονται σε εκτεταμένο εναλλακτικό μάτισμα. Με τον όρο εναλλακτικό μάτισμα αναφερόμαστε στη διαδικασία με την οποία τα εξώνια (δηλαδή οι περιοχές που κωδικοποιούν για αμινοξέα) ενός πρόδρομου μορίου mRNA, συρράπτονται με πολλαπλούς τρόπους κατά το μάτισμα του RNA. Ως σήματα ματίσματος χαρακτηρίζονται οι συντηρημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που απαραίτητα πρέπει να εντοπίζονται στα mRNAs, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί το μάτισμα του mRNA από τα μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια του κυττάρου ξενιστή που αποτελούνται από snRNA και πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25**, στα περισσότερα γεγονότα ματίσματος η περιοχή που αφαιρείται (χαρακτηρίζεται ως εσώνιο ή ιντρόνιο) ξεκινά με την αλληλουχία GU και τελειώνει με την αλληλουχία AG. Το γεγονός αυτό χαρακτηρίζεται ως κανόνας GT-AG στη βιβλιογραφία.

**Εικόνα 25.** Κανόνας GT-AG και σήματα ματίσματος.

Οι HPVs εκμεταλλευόμενοι τον μηχανισμό του εναλλακτικού ματίσματος, παρά το μικρό μέγεθος του γενόματός τους, καταφέρνουν να κωδικοποιούν πολλαπλές πρωτεΐνες και επωφελούνται από το εναλλακτικό μάτισμα για να εκφράσουν διαφορεικά αυτές τις πρωτεΐνες σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης και σε καθορισμένο χρονικό διάστημα {Barksdale, S & Baker, CC 1995}.

Τόσο στον HPV-16, όσο και στον HPV-18, αλλά και γενικότερα στους τύπους HPVs υψηλού κινδύνου που έχουν ως τώρα μελετηθεί, τα γονίδια E6 και E7 μεταγράφονται ως ένα ενιαίο δικιστρωνικό E6/E7 μετάγραφο, όπως συμβολίζεται, μέσω του πρώιμου υποκινητή τους και της πρώιμης πολυαδενυλιωμένης περιοχής τους, σε αντίθεση με τους HPVs χαμηλού κινδύνου, όπου τα δύο αυτά ογκογονίδια μεταγράφονται από δύο ανεξάρτητους υποκινητές (Εικόνα 26) {Boyer, SN, et al. 1996}.

**Εικόνα 26.** Υποκινητές των γονιδίων E6 & E7 από τύπους HPVs υψηλού & χαμηλού κινδύνου. Πλήρες μετάγραφο E6/E7 και εναλλακτικά μετάγραφα του HPV-16.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο υποκινητής P97, ανοδικά του E6 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στον HPV-16 και ο υποκινητής P105, ανοδικά του E6 ORF στον HPV-18, είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της μεταγραφής του εκάστοτε ιού {Tang, S, et al. 2006}. Τα γονίδια E6 και E7 στον HPV-16 μεταγράφονται από τον ίδιο P97 υποκινητή ως δικιστρωνικά E6/E7 πρόδρομα mRNAs, και έχουν ένα ιντρόνιο στην E6 κωδικοποιούσα περιοχή με μία 5' θέση ματίσματος και τρεις εναλλακτικές 3' θέσεις ματίσματος. Μάτισμα των E6/E7 πρόδρομων mRNAs στις

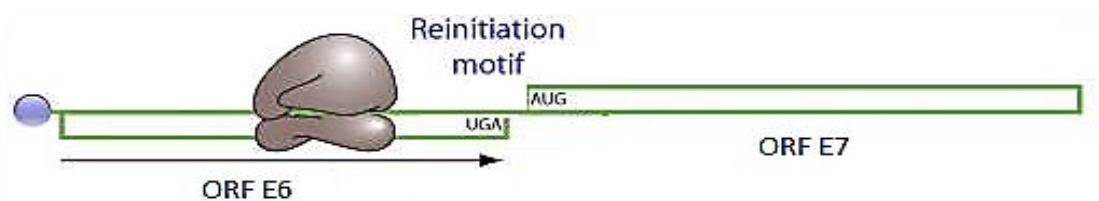
τρεις αυτές εναλλακτικές θέσεις ματίσματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των  $E6 * I$ ,  $E6 * II$ , και  $E6 \wedge E7$  mRNAs (**Εικόνα 26**) {**Baker, CC 1997**}. Το σύμβολο  $\wedge$  μεταξύ δύο ονομάτων από γονίδια υποδεικνύει ένα προϊόν σύντηξης, ενώ το σύμβολο  $*$  υποδεικνύει μία περικομμένη μορφή κάποιας πρωτεΐνης {**Baker, C & Calef, C 1996**}.

Ειδικότερα, το ιντρόνιο 1 (που βρίσκεται κοντά στην 5' καλύπτρα), τοποθετείται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του  $E6$  γονιδίου, τόσο στα πρόδρομα mRNAs του HPV-16, όσο και του HPV-18. Θεωρητικά, η απομάκρυνση του ιντρονίου 1 μέσω ματίσματος του mRNA, θα διέκοπτε το πλαίσιο ανάγνωσης του  $E6$  και θα εμπόδιζε την  $E6$  πρωτεΐνη με πλήρες μήκος από το να εκφραστεί. Το πώς, όμως, ένα δικιστρονικό  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA διαφεύγει του ματίσματος στο ιντρόνιο 1, για να κωδικοποιήσει μία ογκογόνο  $E6$  πρωτεΐνη, παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητο.

Στον HPV-18 το πρόδρομο  $E6/E7$  mRNA έχει μία 5' και μία 3' θέση ματίσματος, (**Πίνακας 2**). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το μάτισμα του ιντρονίου 1 στο  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA του HPV-16 είναι αποδοτικό και η πλειοψηφία των μεταγράφων σε καρκινικούς ιστούς και καρκινικές κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας, είναι της μορφής  $E6 * I$ , ένα προϊόν ματίσματος χωρίς το ιντρόνιο 1, από το νουκλεοτίδιο 226 στην 5' θέση ματίσματος ως το νουκλεοτίδιο 409 στην 3' θέση ματίσματος {**Tang, S, et al. 2006**}.

Το ερώτημα είναι, γιατί το αποτελεσματικό μάτισμα του ιντρονίου 1 στο  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA του HPV-16 ή του HPV18 είναι αναγκαίο για την ιική γονιδιακή έκφραση, αφού το μάτισμα βλάπτει την έκφραση του  $E6$  γονιδίου; Έχει προταθεί, ότι το μάτισμα του ιντρονίου 1 στο  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA του HPV-16 μπορεί να επωφελεί την έκφραση του  $E7$  γονιδίου {**Stacey, SN, et al. 1995**}, επειδή ο χώρος μεταξύ της αλληλουχίας λήξης της μετάφρασης του  $E6$  και της επανέναρξης της μετάφρασης του  $E7$  σε ένα  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA που περιέχει το ιντρόνιο 1 είναι περιορισμένος, με μόνο 2 νουκλεοτίδια μεταξύ τους (**Εικόνα 27**). Μάτισμα του ιντρονίου 1 δημιουργεί μία αλλαγή πλαισίου, και το  $E6 * I$  mRNA που προκύπτει, αποκτά ένα πρόδρομο κωδικόνιο λήξης αμέσως καθοδικά της θέσης σύνδεσης και κατά συνέπεια, δημιουργεί αρκετό χώρο για τον τερματισμό της μετάφρασης και την επανέναρξή της από το ριβόσωμα {**Tang, S, et al. 2006**}.

**Εικόνα 27.** Ο χώρος μεταξύ της αλληλουχίας λήξης της μετάφρασης του  $E6$  και της επανέναρξης της μετάφρασης του  $E7$  σε ένα  $E6/E7$  πρόδρομο mRNA που περιέχει το ιντρόνιο 1 είναι περιορισμένος.



Άλλες μελέτες, έδειξαν ότι η μετάφραση της  $E7$  ογκοπρωτεΐνης από το δικιστρονικό mRNA είναι ανεξάρτητη από το μάτισμα του ιντρονίου 1 {**Stacey, SN, et al. 1995, Stacey, SN, et al. 2000**}. Ωστόσο, οι **Tang, S, et al. 2006**,

απέδειξαν ότι μάτισμα του ιντρονίου 1 στο E6/E7 πρόδρομο mRNA, όντως ενισχύει την μετάφραση του. Κατά συνέπεια, το εναλλακτικό μάτισμα επιτρέπει την παραγωγή πολλαπλών mRNAs από ένα πρόδρομο mRNA και είναι απαραίτητο για τη διαφορική έκφραση των γονιδίων σε ένα μικρού σχετικά μεγέθους γένωμα, όπως αυτό των HPVs, διαδραματίζοντας, πιθανόν, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των E6 και E7 πρωτεϊνών στα στελέχη υψηλού κινδύνου. Το εναλλακτικό μάτισμα, σίγουρα, επηρεάζει το ποσό της E6 πρωτεΐνης με πλήρες μήκος και μπορεί να παράγει, επίσης, E6 πρωτεΐνες με τροποποιημένες λειτουργίες. Επιπρόσθετα, το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί, ακόμη, να ρυθμίζει τη μετάφραση της E7 πρωτεΐνης από το E7 ORF {Zheng, ZM & Baker, CC 2006}.

Η μεγαλύτερη μελέτη επάνω στο εναλλακτικό μάτισμα που υφίστανται τα mRNAs από τα ογκογονίδια E6 και E7 από τύπους HPVs υψηλού κινδύνου έχει γίνει από τον **K. Sotlar και τους συνεργάτες του**. Στον **Πίνακα 2** φαίνονται τα αποτελέσματα των 5' και 3' θέσεων ματίσματος, καθώς και το μέγεθος των ιντρονίων που αφαιρούνται με το μάτισμα στους τύπους HPV-16, HPV-18, HPV-31 και HPV-33 {Sotlar, K, et al. 2004 b, Sotlar, K, et al. 2005}.

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα 5' θέσεων ματίσματος (Donor) και 3' θέσεων ματίσματος (Acceptor) από τέσσερις τύπους HPVs υψηλού κινδύνου, καθώς και το μέγεθος των ιντρονίων (Intron) που αφαιρείται, σύμφωνα με τους **Sotlar, K, et al. 2004 b**.

HPV	DONOR	ACCEPTOR	INTRON
16	...226 nt ...226 nt	409 nt... 526 nt...	182 bp 299 bp
18	...233 nt	416 nt...	182 bp
31	...210 nt	413 nt...	202 bp
33	...231 nt	509 nt...	277 bp

Προφανώς, συμπληρωματικές μελέτες θα πρέπει να γίνουν, με στόχο να ανακαλυφθούν οποιαδήποτε εναλλακτικά μεταγγραφα υπάρχουν σε δείγματα ασθενών με καρκίνο και διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN), όπου ο HPV-16, ο HPV-18, ο HPV-31 και ο HPV-33 είναι παρόντες. Στόχος της μελέτης αυτής, θα μπορούσε να είναι η εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης των εναλλακτικών αυτών μεταγράφων και ο συσχετισμός τους με την κλινική εικόνα των ασθενών. Με άλλα λόγια, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί το κατά πόσον τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν ένα μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I σε CIN III και καρκίνο {Cattani, P, et al. 2009}.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν **60** κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο και διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας CIN, όπου ο HPV-16, ο HPV-18, ο HPV-31 και ο HPV-33 ήταν παρόντες. Τα δείγματα αυτά, συλλέχθηκαν κατά την χρονική περίοδο 2010-2012 και αφορούσαν, είτε τραχηλικά επιχρίσματα σε υγρό μέσο PBS ή ThinPrep, προερχόμενα και από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Άγιος Σάββας (δείγματα με τετραπήφια αριθμητική κωδικοποίηση), το Αττικό Νοσοκομείο (δείγματα με κωδικοποίηση «ΑΤΤ») και το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (δείγματα με κωδικοποίηση «ΠΝΛ»), είτε έτοιμα εκχυλίσματα DNA/RNA τραχηλικών επιχρισμάτων από το Νοσοκομείο Άγιος Σάββας (δείγματα με τετραπήφια αριθμητική κωδικοποίηση). Η ταυτοποίηση των τύπων HPVs που ήταν παρόντες στα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ή/και στο εκάστοτε Νοσοκομείο προέλευσης των δειγμάτων. Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, το έτος συλλογής τους, το υλικό μέσο στο οποίο συλλέχθηκαν ή εάν επρόκειτο για εκχυλίσματα DNA/RNA, η μέθοδος απομόνωσης DNA/RNA που πιθανόν χρησιμοποιήθηκε, οι τύποι HPVs που ήταν παρόντες, καθώς και η κλινική εικόνα του ασθενούς από τον οποίο προήρχετο το δείγμα.

**Πίνακας 3.** Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων, έτος συλλογής, υλικό μέσο στο οποίο συλλέχθηκαν ή εάν επρόκειτο για εκχυλίσματα DNA/RNA, μέθοδος εκχύλισης DNA/RNA, τύποι HPVs που ήταν παρόντες, καθώς και κλινική εικόνα του ασθενούς από τον οποίο προήρχετο το δείγμα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΟΣ	ΥΛΙΚΟ ΜΕΣΟ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΥΠΟΙ HPVs	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ΠΝΛ1	2010	PBS	CASAS	16, 52, 51 & 18	CIN III - HGSIL
ΠΝΛ2	2010	PBS	CASAS	16 & 66	HGSIL
ΠΝΛ3	2010	PBS	CASAS	16, 58 & 18	HGSIL
ΠΝΛ4	2010	PBS	CASAS	16 & 66	CIN III - HGSIL
ΠΝΛ5	2010	PBS	CASAS	16 & 66	CIN III - HGSIL
ΠΝΛ6	2010	PBS	CASAS	16 & 66	CIN II - III - HGSIL
ΠΝΛ7	2010	PBS	CASAS	16, 66 & 35	Ca in situ - HGSIL
ΠΝΛ8	2010	PBS	CASAS	16, 66, 35 & 18	CIN II - HGSIL
ΠΝΛ9	2010	PBS	CASAS	16 & 35	CIN I-II - LGSIL
ΠΝΛ10	2010	PBS	CASAS	16 & 66	CIN III - HGSIL
ΠΝΛ11	2010	PBS	CASAS	16, 66 & 18	CIN III - HGSIL
ΠΝΛ12	2010	PBS	CASAS	16 & 18	CIN II - III - HGSIL

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΟΣ	ΥΛΙΚΟ ΜΕΣΟ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΥΠΟΙ HPV <sub>s</sub>	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ΠΝΑ13	2010	PBS	CASAS	16	CIN III - HGSIL
ΠΝΑ14	2010	PBS	CASAS	16	CIN III - HGSIL
ΠΝΑ15	2010	PBS	CASAS	16 & 66	CIN III - HGSIL
ΠΝΑ16	2010	PBS	CASAS	16 & 66	Ca τραχήλου - HGSIL
ΠΝΑ18	2011	PBS	XS Kit	31	CIN III - HGSIL
ΠΝΑ22	2011	PBS	XS Kit	31 & 51	CIN I - LGSIL
ΠΝΑ24	2011	PBS	XS Kit	68, 35 & 31	HGSIL
ΠΝΑ25	2011	PBS	XS Kit	68, 6, 11 & 18	-
ΠΝΑ26	2011	PBS	XS Kit	31 & 45	HGSIL
ΠΝΑ28	2011	PBS	XS Kit	68 & 31	LGSIL
ΠΝΑ29	2011	PBS	XS Kit	31, 68 & 35	LGSIL
ΠΝΑ30	2011	PBS	XS Kit	31 & 68	LGSIL
ΠΝΑ31	2011	PBS	XS Kit	31 & 52	LGSIL
ΠΝΑ32	2011	PBS	XS Kit	31	LGSIL
ΠΝΑ33	2011	PBS	XS Kit	31 & 35	-
ΠΝΑ35	2011	PBS	XS Kit	31	-
ΠΝΑ34	2011	PBS	XS Kit	31	-
ΠΝΑ36	2011	PBS	XS Kit	31	-
ΠΝΑ38	2011	PBS	XS Kit	18, 45 & 35	-
ΠΝΑ39	2011	PBS	XS Kit	18, 35 & 45	CIN III - HGSIL
ΠΝΑ41	2011	PBS	XS Kit	18 & 45	-
ΑΤΤ64	2011	ThinPrep	XS Kit	33 & 54	LGSIL
ΑΤΤ70	2011	ThinPrep	XS Kit	18	LGSIL
ΑΤΤ83	2011	ThinPrep	XS Kit	33 & 54	HGSIL
ΑΤΤ84	2011	ThinPrep	XS Kit	45 & 18	LGSIL
ΑΤΤ99	2011	ThinPrep	XS Kit	18	-
2186	2010	ThinPrep	XS Kit	16 & 18	LGSIL
2290	2010	ThinPrep	CASAS	16, 6, 11, 66 & 51	LGSIL
2148	2010	ThinPrep	CASAS	16 & 68	LGSIL
2127	2010	ThinPrep	CASAS	16, 6 & 11	LGSIL
2279	2010	ThinPrep	CASAS	16 & 66	LGSIL
2216	2010	ThinPrep	CASAS	16 & 66	LGSIL
2209	2010	ThinPrep	CASAS	16 & 51	LGSIL
2121	2010	ThinPrep	CASAS	16 & 66	CIN I - LGSIL
3029	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		16 & 31	LGSIL
3031	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		18	Αδενοκαρκίνωμα - HGSIL
3045	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		31 & 45	CIN I - LGSIL
3070	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		31	LGSIL
3101	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		31	LGSIL
3107	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		33	LGSIL
3113	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		18	Ca τραχήλου - HGSIL
3135	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		18	LGSIL
3168	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		18	LGSIL
3197	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		31	LGSIL
3200	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		31	LGSIL
3246	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		33	CIN I - II - LGSIL
3260	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		33	LGSIL
3297	2012	Εκχύλισμα DNA/RNA		18	CIN I - LGSIL

## 2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA/RNA

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα έγινε ως επί το πλείστον με τη βοήθεια του ειδικού kit εκχύλισης, Nucleospin RNA XS Kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας, με εξαίρεση το στάδιο κατά το οποίο γίνεται χρήση DNAσης για πέψη του DNA, με σκοπό να απομονωθούν ταυτόχρονα και τα δύο είδη νουκλεϊκών οξέων.

\* \* \*

Σε ένα υποσύνολο των δειγμάτων από τα τραχηλικά επιχρίσματα, για την εκχύλιση του DNA και του RNA πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης {Casas, I, et al. 1995}. Σε πλαστικό σωλήνα των 2 ml αναμιγνύονται 100 µl δείγματος, 10 µl γλυκογόνου (100 mg/ml) και 300 µl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των ιϊκών νουκλεοκαψιδίων για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων. Κατόπιν, προστίθενται 400 µl ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20°C). Μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex), τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στις 13.000 x g (σε θερμοκρασία 4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδυναλύνεται με ισχυρή ανάδευση σε 500 µl αιθανόλης 70% (διατηρημένης στους -20°C). Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση στις 14.000 x g για 10 min. Η αιθανόλη απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδυναλύνεται σε 100 µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O), (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Το εκχύλισμα DNA/RNA κάθε δείγματος φυλάσσεται στους -20°C.

## 2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε μερικά από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είχαν ταυτοποιηθεί οι τύποι των HPVs που είναι παρόντες από το νοσοκομείο προέλευσής τους, ενώ τα υπόλοιπα ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας με τη μέθοδο της Nested Multiplex PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες του **K. Sotlar και των συνεργατών του** {Sotlar, K, et al. 2004 a}. Αρχικά, τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν σε ενίσχυση PCR με έναν «forward primer» GPE6-3F και δύο back primers GPE6-5B και GPE6-6B για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και E7 όλων των HPVs που μπορεί να περιλαμβάνονται στα κολπικά επιχρίσματα. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους primers είναι της τάξης των 630bp (Πίνακας 4).



**Πίνακας 4.** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και E7 όλων των HPVs που περιλαμβάνονται στα κολπικά επιχρίσματα.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυόμενο τμήμα
<b>GPE6-3F</b>	GGG W GK KAC TGA AAT CGG T	<b>630 bp</b>
<b>GPE6-5B</b>	CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA	
<b>GPE6-6B</b>	TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC	

Ακολούθως, για την ενίσχυση της ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε Nested Multiplex PCR. Τα GPE6 PCR προϊόντα των κλινικών δειγμάτων ενισχύθηκαν με Nested PCR με τύπο-ειδικούς εσωτερικούς εκκινητές, οι οποίοι επιλέχθηκαν για να επιτευχθεί η ακριβής τυποποίηση των τύπων HPVs που είναι παρόντες σε κάθε κλινικό δείγμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει σχεδιαστεί, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ακριβής ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος HPVs γονοτύπων, συμπεριλαμβανομένων όλων των τύπων υψηλού κινδύνου. Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά μίγματα τύπο-ειδικών εκκινητών, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 5**.

**Πίνακας 5.** Μίγματα εκκινητών για την πραγματοποίηση της Nested Multiplex PCR.

Μίγμα εκκινητών	Εκκινητές	Αλληλουχίες	HPV γονότυπος	Ενισχυόμενο τμήμα (bp)
<b>1</b>	<b>16F</b> <b>16R</b>	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	<b>16</b>	<b>457</b>
	<b>68F</b> <b>68R</b>	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	<b>68</b>	<b>333</b>
	<b>31F</b> <b>31R</b>	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	<b>31</b>	<b>263</b>
	<b>59F</b> <b>59R</b>	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	<b>59</b>	<b>215</b>

Μίγμα εκκινητών	Εκκινητές	Αλληλουχίες	HPV γονότυπος	Ενισχυόμενο τμήμα (bp)
2	33F 33R	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	33	398
	6/11F 6/11R	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	6/11	334
	58F 58R	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	58	274
	52F 52R	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	52	229
3	35F 35R	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	35	358
	18F 18R	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	18	322
	51F 51R	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	51	223
	66F 66R	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	66	172
	45F 45R	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	45	151

## 2.4 ΠΕΨΗ ΜΕ DNASE

Προκειμένου να μειωθεί ο ανταγωνισμός των εκκινητικών μορίων για υβριδισμό με το DNA ή το RNA στις αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν, για κάθε κλινικό δείγμα επιδρούμε ένα τμήμα του DNA/RNA εκχυλίσματος με DNase της εταιρίας PROMEGA. Συγκεκριμένα, επιδρούμε σε 3 µl εκχυλίσματος, 1 µl RQ1 Buffer 10x, 2 µl ενζύμου RQ1 DNase και 4 µl ddH<sub>2</sub>O (nuclease free, SIGMA, USA). Επωάζουμε τα δείγματα στους 37° C για 30 min και εν συνεχεία, προσθέτουμε για να σταματήσει η αντίδραση πέψης 1 µl RQ1 DNase stop solution σε κάθε δείγμα και επωάζουμε για άλλα 10 min στους 65° C.

## 2.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Ακολουθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής στην οποία, για κάθε κλινικό δείγμα τοποθετούμε ξεχωριστά στην αντίδραση, τόσο υλικό που περιλαμβάνει DNA και RNA από το αρχικό εκχύλισμα, όσο και υλικό από το ίδιο κλινικό δείγμα που προηγουμένως έχει υποστεί πέψη με DNase και περιλαμβάνει μόνο RNA. Η διαδικασία ξεκινά με την επώαση 5 µl απομονωμένου RNA ή/και DNA, με 1 µl των εκκινητικών μορίων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6** (για κάθε τύπο HPV που εξετάζουμε κάθε φορά και τα οποία δεσμεύονται στο μέσον του E7 ORF), 1 µl dNTPs 40 mM, καθώς και με 5 µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O Nuclease-free, SIGMA, USA) στους 65°C, για 5 min. Μετά την διακοπή της αντίδρασης (με άμεση μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο) προστίθεται σε κάθε ένα από τα δείγματα, μείγμα αποτελούμενο από: 4 µl διαλύματος 5x first strand buffer, 2 µl DTT 0,1M, 40 units αναστολέα ριβονουκλεασών RNase out και 200 units αντίστροφης μεταγραφάσης RT, Invitrogen. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 42°C για 52 min για την σύνθεση του cDNA και έπειτα, στους 70°C για 15 min για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

**Πίνακας 6.** Εκκινητικά μόρια για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής {Sotlar, K, et al. 2004 b}.

ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ		ΘΕΣΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
HPV16/668	5' TCCTCCTCCTCTGAGCTGTC 3'	668-649 nt
HPV18/692	5' CTGAGTCGCTTAATTGCTCG 3'	692-673 nt
HPV31/666	5' TCCTCCTCATCTGAGCTGTC 3'	666-647 nt
HPV33/679	5' TCATCCTCATCTGAGCTGTC 3'	679-660 nt

## 2.6 PCR

Τα τμήματα των παραγόμενων μονόκλωνων cDNAs που περιλαμβάνουν το E6 και μέρος του E7 ORF, ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR. Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζονται τα ονόματα, οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τύπο HPV, οι θέσεις δέσμευσής τους, καθώς και η θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόστηκε για κάθε ζευγάρι εκκινητικών μορίων στην εκάστοτε αντίδραση PCR.

**Πίνακας 7.** Εκκινητικά μόρια για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR {Sotlar, K, et al. 2004 b}.

ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ		ΘΕΣΕΙΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ
HPV16/F	5' CACAGTTATGCACAGAGTTGC 3'	141-161 nt	55° C
HPV16/668	5'TCCTCCTCCTCTGAGCTGTC 3	668-649 nt	
HPV18/112	5' GCTTTTGAGGATCCAACACGG3'	112-131 nt	53° C
HPV18/692	5' CTGAGTCGCTTAATTGCTCG 3'	692-673 nt	
HPV31/F	5' GAAATTGCATGAACTAAGCTC 3'	137-158 nt	53° C
HPV31/666	5' TCCTCCTCATCTGAGCTGTC 3'	666-647 nt	
HPV33/F	5' ACTATACACAACATTGAACTA 3'	172-192 nt	47° C
HPV33/679	5' TCATCCTCATCTGAGCTGTC 3'	679-660 nt	

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR, για κάθε κλινικό δείγμα, τοποθετούνται τρία επιμέρους δείγματα που περιλαμβάνουν: το πρώτο cDNA μόνο (προέρχεται από εκχύλιση, έπειτα πέψη του DNA με DNase και μετά RT), το δεύτερο cDNA και DNA (προέρχεται από εκχύλιση και έπειτα RT) και το τρίτο DNA και RNA προερχόμενο από την αρχική εκχύλιση προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του DNA και η ταυτοποίηση του τύπου HPV που είναι παρόν στο δείγμα για ακόμη μία φορά. Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3  $\mu$ l cDNA ή cDNA/DNA ή DNA/RNA του κάθε κλινικού δείγματος,, όπως αναλύθηκε παραπάνω, 2  $\mu$ l εκκινητικών μορίων (1  $\mu$ l από το κάθε εκκινητικό μόριο με συγκέντρωση 50 pmol), 5  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος (Paq buffer 10x), 5  $\mu$ l μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10 mM, Invitrogen, UK), 5 units Taq DNA πολυμεράσης (Paq 5.000, Stratagene, USA) και ddH<sub>2</sub>O (SIGMA, USA) μέχρι τελικό όγκο 50  $\mu$ l.

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων που περιέχονται στο εκάστοτε δείγμα στους 95°C για 5 min και ακολουθούν 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, υβριδοποίησης στη θερμοκρασία που αναφέρεται στον **Πίνακα 7** για το εκάστοτε ζεύγος εκκινητικών μορίων για 30 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 1 min. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

## 2.7 NESTED PCR

Τα προϊόντα της PCR, ακολούθως, υποβάλλονται σε Nested PCR. Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται τα ονόματα, οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τύπο HPV, οι θέσεις δέσμευσής τους, καθώς και η θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόστηκε για κάθε ζευγάρι εκκινητικών μορίων στην εκάστοτε αντίδραση Nested PCR.

**Πίνακας 8.** Εκκινητικά μόρια για την πραγματοποίηση της Nested PCR {Sotlar, K, et al. 2004 b}.

ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ		ΘΕΣΕΙΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΑΡΙΔΙΣΜΟΥ
HPV16/192	5' GTGTGTACTGCAAGCAACAG 3'	192-211 nt	50° C
HPV16R	5' CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA 3'	597-573 nt	
HPV18/F	5' CACTTCACTGCAAGACATAGA 3'	170-190 nt	52° C
HPV18/R	5' GTTGTGAAATCGTCGT'TTTTCA 3'	491-470 nt	
HPV31/158	5' GGCAT'TGGAAATACCCTACG 3'	158-177 nt	53° C
HPV31/548	5' GGT'TTCAGTACGAGGTCTTC 3'	548-529 nt	
HPV33/201	5' GGAATGCAAAAAACCT'TTGCAA 3'	201-222 nt	52° C
HPV33/R	5' GTT'TTTACACGTCACAGTGCA 3'	569-549 nt	

Σε όλες τις αντιδράσεις Nested PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl PCR προϊόντων (για κάθε κλινικό δείγμα τοποθετούνται τα τρία επιμέρους δείγματα, όπως περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο και περιελάμβαναν cDNA ή cDNA/DNA ή DNA/RNA), 2 μl εκκινητικών μορίων (1 μl από το κάθε εκκινητικό μόριο με συγκέντρωση 50 pmol), 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Paq buffer 10x), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10 mM, Invitrogen, UK), 5 units Taq DNA πολυμεράσης (Paq 5.000, Stratagene, USA) και ddH<sub>2</sub>O (SIGMA, USA) μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Για κάθε αντίδραση Nested PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων που περιέχονται στο εκάστοτε δείγμα στους

95°C για 5 min και ακολουθούν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, υβριδοποίησης στη θερμοκρασία που αναφέρεται στον **Πίνακα 8** για το εκάστοτε ζεύγος εκκινητικών μορίων για 30 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 1 min. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

## 2.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested PCR σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 g αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60 ml TBE 1% (Tris, Boric acid, EDTA) προστίθενται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη και αφήνεται να κρυώσει (περίπου στους 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr<sub>2</sub>), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει η αγαρόζη.

Από το προϊόν της Nested PCR, 10 µl αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης, σε 40% w/v σουκροζης, σε TBE) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της Nested PCR χρησιμοποιείται ο μάρτυρας μοριακών βαρών, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120 Volts, 50 mA για 1 h περίπου. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

## 2.9 ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αντιδράσεις έχουν σχεδιαστεί, έτσι ώστε να ενισχύεται το E6 ή/και μέρος του E7 ORF του mRNA των τύπων HPVs που μελετήθηκαν. Είναι προφανές, ότι οποιοδήποτε προϊόν Nested PCR με μικρότερο μέγεθος από αυτό του πλήρους μεταγράφου E6 και E7 ORF που είναι δυνατόν να ενισχυθεί με τους εκάστοτε εκκινητές, αφορά εναλλακτικό μετάγραφο του εκάστοτε τύπου ιού. Συνήθως, αφαιρούνται κάποιες περιοχές από το E6 ORF. Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων που ενισχύονται, όταν αφορούν DNA του ιού ή πλήρες μετάγραφο



του ιού, καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων από τα εναλλακτικά μετάγραφα που εντόπισε ο K. Sotlar και οι συνεργάτες του {Sotlar, K, et al. 2004 b}.

**Πίνακας 9.** Αναμενόμενα προϊόντα κατά Sotlar, K, et al. 2004 b.

HPV	DNA / πλήρες μετάγραφο RNA	RNA εναλλακτικά μετάγραφα
HPV-16	406 bp	224 bp & 108 bp
HPV-18	322 bp	140 bp
HPV-31	391 bp	189 bp
HPV-33	369 bp	92 bp

## 2.10 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

### 2.10.1 AUTONESTED GO TAQ PCR

Σε πρώτη φάση στα προϊόντα της Nested PCR εισάγονται poly (A) μονόκλωνα άκρα στα 3' και 5' άκρα των ήδη ενισχυμένων τμημάτων με σκοπό τη ένθεση τους σε πλασμιδιακό φορέα που διαθέτει αντίστοιχα μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα. Η εισαγωγή αυτή επιτυγχάνεται με την πραγματοποίηση μιας ειδικής AutoNested PCR με τη βοήθεια του ενζύμου Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). Το ένζυμο αυτό προσθέτει poly (A) ουρές στα άκρα των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα με τελικό όγκο 50 μl που περιελάμβανε: 3μl Nested PCR προϊόντος, 2 μl από το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε και στην Nested PCR, 6 μl dNTPs 10 mM, 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος Go Taq Flexi Buffer 5x, 4 μl διαλύματος MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,25 units/tube ενζύμου Go Taq DNA Πολυμεράση και ddH<sub>2</sub>O (SIGMA, USA) μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου των 50μl.

Για κάθε αντίδραση AutoNested Go Taq PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 2 min και ακολουθούν 25 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, υβριδοποίησης στη θερμοκρασία που αναφέρεται στον **Πίνακα 8** για το εκάστοτε ζεύγος εκκινητικών μορίων για 30 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης αξιολογήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο.

### 2.10.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για να απομονώσουμε και να καθαρίσουμε τα προϊόντα της αντίδρασης AutoNested Go Taq PCR από τα πηκτώματα αγαρόζης, ηλεκτροφορούμε όλη την ποσότητα από κάθε προϊόν. Στη συνέχεια, οι επιθυμητές μπάντες αποκόπτονται από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια των 2 ml. Η απομάκρυνση της αγαρόζης και ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος ULTRAPrep® Mini PREP Kit Agarose Gel Extraction, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 2.10.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ (LIGATION)

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

### 2.10.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Επόμενο βήμα είναι ο μετασχηματισμός δεκτικών σε πλασμίδια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (JM109) με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Σε 200 μl από το απόθεμα των δεκτικών κυττάρων που διαθέτουμε, μεταφέρουμε 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση και τα σωληνάρια τοποθετούνται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, μεταφέρονται σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και αμέσως μετά, τοποθετούνται ξανά στον πάγο για δύο λεπτά (heat shock). Με τον

τρόπο αυτό δημιουργούνται οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από τις οποίες είναι δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Εν συνεχεία, μεταφέρεται όλη την ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα σωληνάρια σε αντίστοιχα falcons που περιέχουν 800 µl θρεπτικού υλικού LB Broth. Ακολουθεί επώαση στους 37°C σε 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα (επαναφορά κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων -“επούλωση”).

### 2.10.5 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ & ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Από κάθε falcon ελήφθησαν 200 µl υγρής καλλιέργειας και επιστρώθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν, επίσης, 12 µl X-gal (50 mg/ml, Promega, USA) και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία X-gal, η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος που χρωματίζει τις αποικίες. Ωστόσο, όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι λευκές, διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαρρηγνύεται. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατός ο οπτικός έλεγχος της επιτυχίας ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στα πλασμίδια κάθε αποικίας.

Από κάθε τρυβλίο συλλέχθηκαν τρεις λευκές αποικίες, δηλαδή τρεις κλώνοι από κάθε αλληλουχία. Στη συνέχεια, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB Broth (20 g/L) το οποίο περιείχε αμικικιλίνη σε ποσότητα 1 µl ανά ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

### 2.10.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

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).

### 2.10.7 ΠΕΨΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη μικρής ποσότητας των φορέων με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, η αλληλουχία που αποκόπτεται από τον φορέα με το ένζυμο αφορά μόνο το ένθεμα. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από κάθε εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x H Buffer, 1 μl ενζύμου Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15 μl ddH<sub>2</sub>O (SIGMA, USA), ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl.

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

### 2.11 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Από το εκχύλισμα DNA του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα αποστέλλεται ποσότητα ίση με 20 μl στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας όπου και πραγματοποιείται η αλληλούχιση του εκάστοτε ενθέματος με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων T7 σε ειδικό μηχάνημα αλληλούχισης (Sequencer).

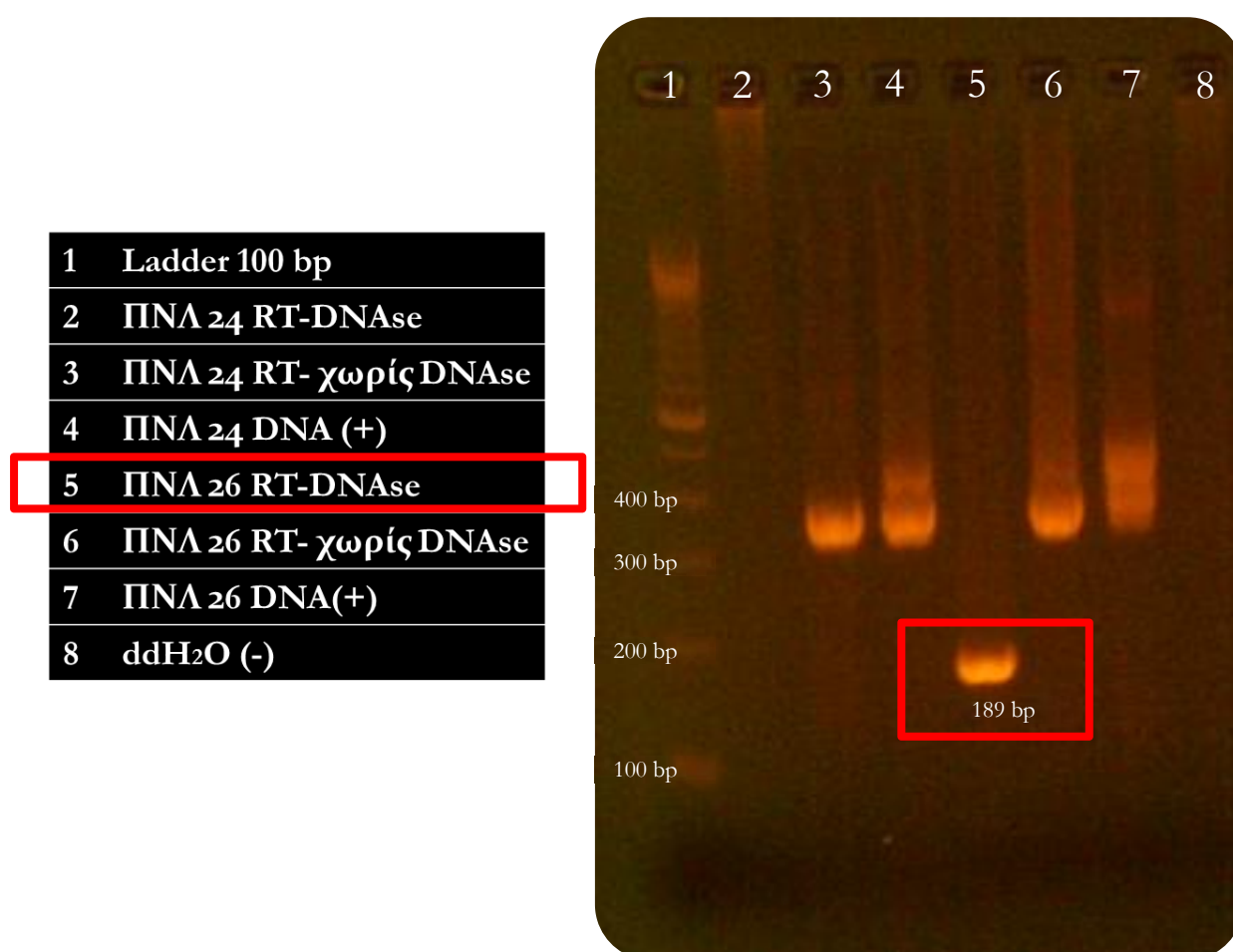
### 2.12 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Οι αλληλουχίες τους συγκρίνονται με τις πρότυπες αλληλουχίες των τύπων HPVs που υπάρχουν κατατεθειμένες στη παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST. Η επεξεργασία και η διόρθωση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GeneRunner. Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών προκειμένου να εντοπιστούν οι περιοχές που απουσιάζουν λόγω εναλλακτικού ματίσματος, αλλά και ο προσδιορισμός των 5' και 3' θέσεων ματίσματος πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύεται το E6 και μέρος του E7 ORF από τα mRNAs των τύπων HPVs που μελετήθηκαν. Είναι προφανές, ότι οποιοδήποτε προϊόν Nested PCR με μικρότερο μέγεθος από αυτό του πλήρους μεταγράφου E6 και E7 ORF που είναι δυνατόν να ενισχυθεί με τους εκάστοτε εκκινητές, αφορά εναλλακτικό μετάγραφο του εκάστοτε τύπου ιού.

**Εικόνα 28.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-31 μήκους 189 bp από το δείγμα ΠΝΛ26.



Ενδεικτικά, στην **Εικόνα 28** φαίνεται ένα από τα εναλλακτικά μετάγραφα που εντοπίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας για τον HPV-31 σε πήκτωμα αгарόζης 2%.

### 3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-16

Ο HPV-16 ήταν παρών σε **24** κλινικά δείγματα από γυναίκες ασθενείς με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας από τα 60 που εξετάστηκαν συνολικά. Στον **Πίνακα 10** παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, η κλινική τους εικόνα, οι τύποι HPVs που είναι παρόντες σε κάθε δείγμα, το μέγεθος των εναλλακτικών μεταγράφων που ανιχνεύτηκαν, καθώς και οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος των μεταγράφων αυτών.

**Πίνακας 10.** Κωδικοποίηση δειγμάτων HPV-16, κλινική εικόνα, τύποι HPVs που ανιχνεύτηκαν, μέγεθος εναλλακτικών μεταγράφων και 5' και 3' θέσεις ματίσματος.

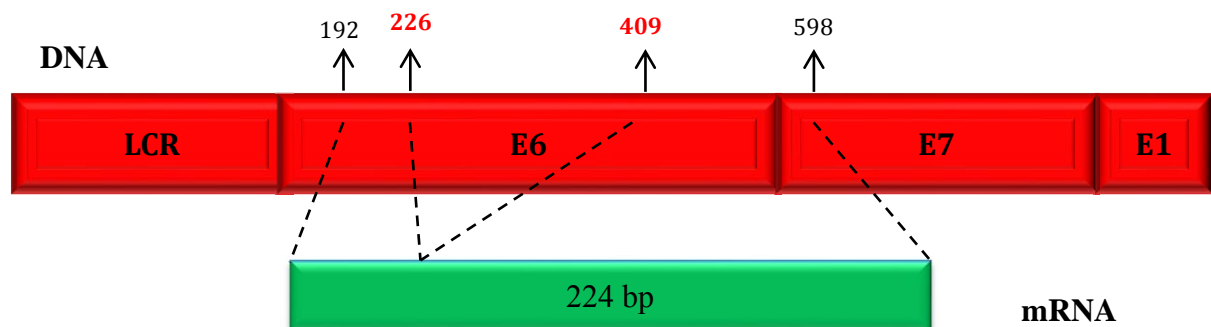
ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
ΠΝΛ1	CIN III - HGSIL	16, 52, 51 & 18	(-)	(-)
ΠΝΛ2	HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ3	HGSIL	16, 58 & 18	<b>224 bp</b>	<b>226...409</b>
ΠΝΛ4	CIN III - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ5	CIN III - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ6	CIN II - III - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ7	Ca - HGSIL	16, 66 & 35	(-)	(-)
ΠΝΛ8	CIN II - HGSIL	16, 66, 35 & 18	(-)	(-)
ΠΝΛ9	CIN I-II - LGSIL	16 & 35	(-)	(-)
ΠΝΛ10	CIN III - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ11	CIN III - HGSIL	16, 66 & 18	(-)	(-)
ΠΝΛ12	CIN II - III - HGSIL	16 & 18	(-)	(-)
ΠΝΛ13	CIN III - HGSIL	16	<b>224 bp</b>	<b>226...409</b>
ΠΝΛ14	CIN III - HGSIL	16	<b>224 bp</b>	<b>226...409</b>
ΠΝΛ15	CIN III - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ16	Ca - HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
2186	LGSIL	16 & 18	(-)	(-)
2290	LGSIL	16, 6, 11, 66 & 51	(-)	(-)
2148	LGSIL	16 & 68	(-)	(-)
2127	LGSIL	16, 6 & 11	(-)	(-)
2279	LGSIL	16 & 66	<b>224 bp &amp; 108 bp</b>	<b>226...526 &amp; 226...409</b>
2216	LGSIL	16 & 66	(-)	(-)
2209	LGSIL	16 & 51	(-)	(-)
2121	CIN I - LGSIL	16 & 66	(-)	(-)
3029	LGSIL	16 & 31	<b>224 bp &amp; 108 bp</b>	<b>226...526 &amp; 226...409</b>



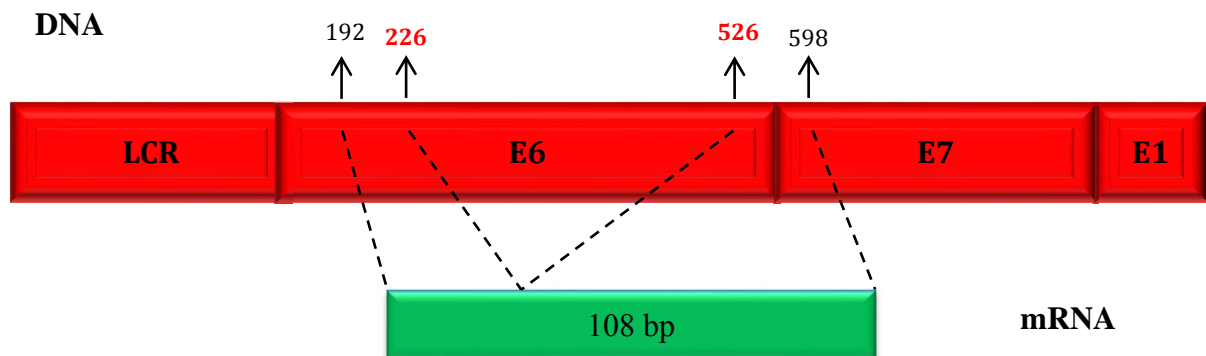
Παρατηρούμε ότι σε **5** από τα **24** κλινικά δείγματα, δηλαδή σε ποσοστό περίπου **21%** βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα μήκους **224 bp** και **109 bp** που αντιστοιχούν στις 5' και 3' θέσεις ματίσματος **226...526** (Εικόνα 29) και **226...409** (Εικόνα 30), αντίστοιχα. Επίσης, το μετάγραφο πλήρους μήκους δεν εντοπίστηκε σε κανένα δείγμα.

Το εναλλακτικό μετάγραφο μήκους **224 bp** εμφανίζεται αυτό καθ' αυτό και μόνο σε **3** από τα **5** δείγματα που φέρουν εναλλακτικά μετάγραφα και είναι αποκλειστικά κλινικής εικόνας **HGSIL**. Στα υπόλοιπα **2** κλινικά δείγματα, όπου και συνυπάρχουν 2 διαφορετικά είδη εναλλακτικών μεταγράφων, αυτά έχουν μήκος **224 bp** και **109 bp** και αφορούν κλινική εικόνα **LGSIL**.

**Εικόνα 29.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-16, μήκους 224 bp και με 5' και 3' θέσεις ματίσματος τις 226...409.



**Εικόνα 30.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-16, μήκους 108 bp και με 5' και 3' θέσεις ματίσματος τις 226...526.



## 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-18

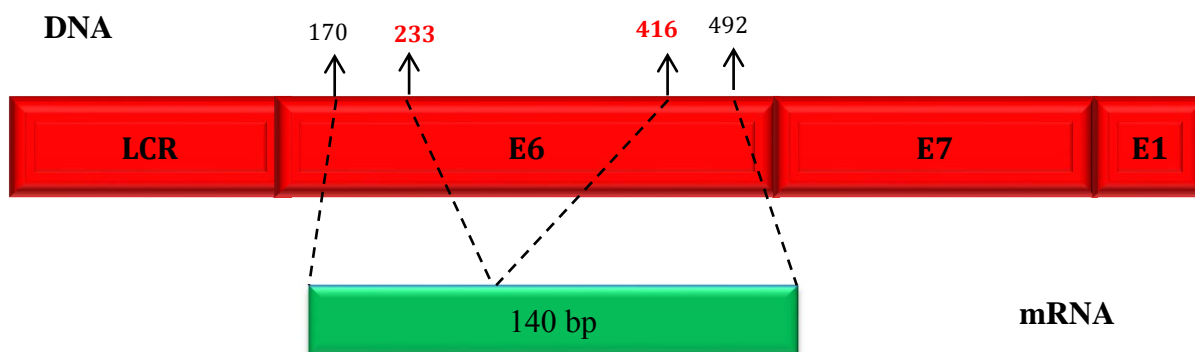
Ο HPV-18 ήταν παρών σε **12** κλινικά δείγματα από γυναίκες ασθενείς με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας από τα 60 που εξετάστηκαν συνολικά. Στον **Πίνακα 11** παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, η κλινική τους εικόνα, οι τύποι HPVs που είναι παρόντες σε κάθε δείγμα, το μέγεθος των εναλλακτικών μεταγράφων που ανιχνεύτηκαν, καθώς και οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος των μεταγράφων αυτών.

**Πίνακας 11.** Κωδικοποίηση δειγμάτων HPV-18, κλινική εικόνα, τύποι HPVs που ανιχνεύτηκαν, μέγεθος εναλλακτικών μεταγράφων και 5' και 3' θέσεις ματίσματος.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
ΠΝΛ25	-	68, 6, 11 & 18	(-)	(-)
ΠΝΛ38	-	18, 45 & 35	(-)	(-)
ΠΝΛ39	CIN III - HGSIL	18, 35 & 45	<b>140 bp</b>	<b>233...416</b>
ΠΝΛ41	-	18 & 45	(-)	(-)
ΑΤΤ70	LGSIL	18	(-)	(-)
ΑΤΤ84	LGSIL	18 & 45	(-)	(-)
ΑΤΤ99	-	18	(-)	(-)
3031	Ca - HGSIL	18	<b>140 bp</b>	<b>233...416</b>
3113	Ca - HGSIL	18	<b>140 bp</b>	<b>233...416</b>
3135	LGSIL	18	<b>140 bp</b>	<b>233...416</b>
3168	LGSIL	18	(-)	(-)
3297	LGSIL	18	(-)	(-)

Διαπιστώνουμε ότι σε **4** από τα **12** κλινικά δείγματα, δηλαδή σε ποσοστό περίπου **27%** βρέθηκαν εναλλακτικά μέταγραφα μήκους **140 bp** που αντιστοιχούν στις 5' και 3' θέσεις ματίσματος **233...416**, αντίστοιχα (**Εικόνα 31**). Τα **3** από τα **4** δείγματα αφορούν **HG αλλοιώσεις**, ενώ το **1** από αυτά αφορά **LG αλλοιώσεις**. Επίσης, κι εδώ το μέταγραφο πλήρους μήκους δεν εντοπίστηκε σε κανένα δείγμα.

**Εικόνα 31.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-18, μήκους 140 bp και με 5' και 3' θέσεις ματίσματος τις 233...416.



### 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-31

Ο HPV-31 ήταν παρών σε **19** κλινικά δείγματα από γυναίκες ασθενείς με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας από τα 60 που εξετάστηκαν συνολικά. Στον **Πίνακα 12** παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, η κλινική τους εικόνα, οι τύποι HPVs που είναι παρόντες σε κάθε δείγμα, το μέγεθος των εναλλακτικών μεταγράφων που ανιχνεύτηκαν, καθώς και οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος των μεταγράφων αυτών.

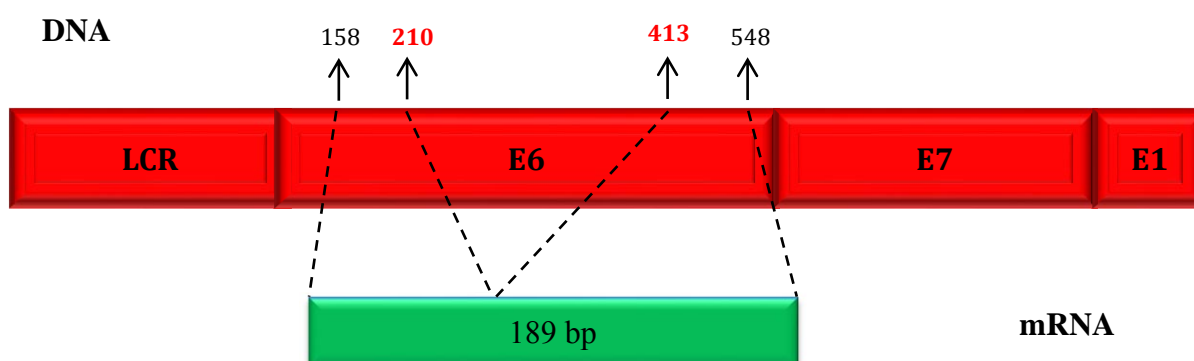
**Πίνακας 12.** Κωδικοποίηση δειγμάτων HPV-31, κλινική εικόνα, τύποι HPVs που ανιχνεύτηκαν, μέγεθος εναλλακτικών μεταγράφων και 5' και 3' θέσεις ματίσματος.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
ΠΝΛ18	CIN III - HGSIL	31	(-)	(-)
ΠΝΛ22	CIN I - LGSIL	31 & 51	(-)	(-)
ΠΝΛ24	HGSIL	68, 35 & 31	(-)	(-)
ΠΝΛ26	HGSIL	16 & 66	(-)	(-)
ΠΝΛ28	LGSIL	31 & 68	(-)	(-)
ΠΝΛ29	LGSIL	31, 68 & 35	(-)	(-)
ΠΝΛ30	LGSIL	31 & 68	(-)	(-)
ΠΝΛ31	LGSIL	31 & 52	(-)	(-)
ΠΝΛ32	LGSIL	31	(-)	(-)
ΠΝΛ33	-	31 & 35	(-)	(-)
ΠΝΛ34	-	31	<b>189 bp</b>	<b>210...413</b>
ΠΝΛ35	-	31	(-)	(-)
ΠΝΛ36	-	31	(-)	(-)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
3029	LGSIL	16 & 31	189 bp & 391 bp	210...413 & πλήρες μετάγραφο
3045	CIN I - LGSIL	31 & 45	189 bp & 391 bp	210...413 & πλήρες μετάγραφο
3070	LGSIL	31	189 bp	210...413
3101	LGSIL	31	189 bp	210...413
3197	LGSIL	31	189 bp & 391 bp	210...413 & πλήρες μετάγραφο
3200	LGSIL	31	(-)	(-)

Διαπιστώνουμε ότι σε **6** από τα **19** κλινικά δείγματα, δηλαδή σε ποσοστό περίπου **32%** βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα μήκους **189 bp** που αντιστοιχούν στις 5' και 3' θέσεις ματίσματος **210...413**, αντίστοιχα (**Εικόνα 32**). Τα **5** από τα **6** δείγματα αφορούν **LG αλλοιώσεις**, ενώ για το 1 δείγμα δεν υπάρχει διαθέσιμο ιστορικό. Το **μετάγραφο πλήρους μήκους** εντοπίστηκε για πρώτη φορά εδώ, στα **3** από τα **5** δείγματα που αφορούν **LG αλλοιώσεις**.

**Εικόνα 32.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-31, μήκους 189 bp και με 5' και 3' θέσεις ματίσματος τις 210...413.



### 3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV-33

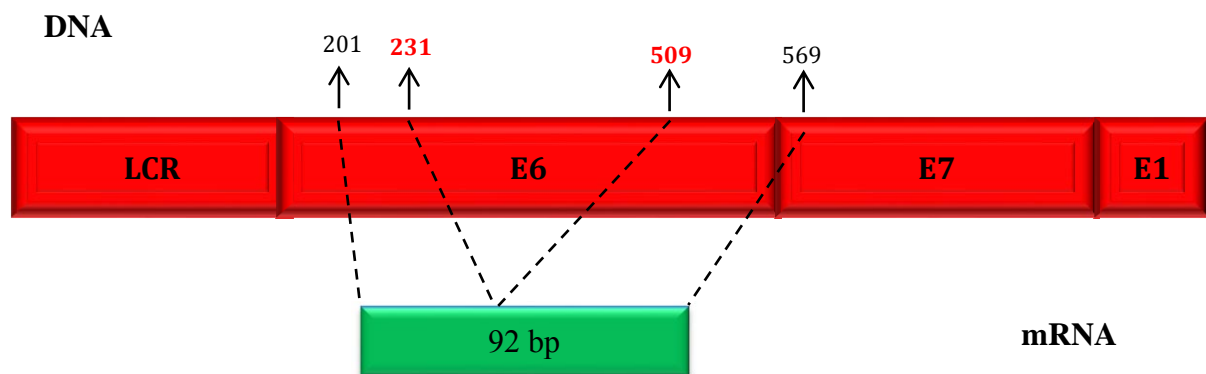
Ο HPV-33 ήταν παρών σε **5** μόνο κλινικά δείγματα από γυναίκες ασθενείς με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας από τα 60 που εξετάστηκαν συνολικά. Στον **Πίνακα 13** παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, η κλινική τους εικόνα, οι τύποι HPVs που είναι παρόντες σε κάθε δείγμα, το μέγεθος των εναλλακτικών μεταγράφων που ανιχνεύτηκαν, καθώς και οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος των μεταγράφων αυτών.

**Πίνακας 13.** Κωδικοποίηση δειγμάτων HPV-33, κλινική εικόνα, τύποι HPVs που ανιχνεύτηκαν, μέγεθος εναλλακτικών μεταγράφων και 5' και 3' θέσεις ματίσματος.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
ATT64	LGSIL	68, 6, 11 & 18	(-)	(-)
ATT83	LGSIL	18, 45 & 35	(-)	(-)
3107	LGSIL	18, 35 & 45	(-)	(-)
3246	CIN I - II - LGSIL	18 & 45	(-)	(-)
3260	LGSIL	18	(-)	(-)

Όπως ήταν αναμενόμενο και λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων και λόγω του χαμηλού βαθμού αλλοίωσης που αυτά παρουσιάζουν, δε βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα.

**Εικόνα 33.** Εναλλακτικό μετάγραφο HPV-33, μήκους 92 bp και με 5' και 3' θέσεις ματίσματος τις 231...509.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ογκογονικό δυναμικό των στελεχών HPVs υψηλού κινδύνου, όπως ήδη αναφέρθηκε, στηρίζεται στην υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση των μεταγράφων των ογκογονιδίων αυτών θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένας παράγοντας προσδιορισμού του κινδύνου μία γυναίκα να εμφανίσει Τραχηλική Ενδοεπιθηλική Νεοπλασία (CIN).

Ο K. Sotlar και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν πολλαπλές προσπάθειες ανίχνευσης των μεταγράφων των ογκογονιδίων E6 και E7 από τους τύπους HPVs υψηλού κινδύνου. Για τον HPV-16 εντόπισαν δύο είδη εναλλακτικών μεταγράφων που προκύπτουν μέσω του μηχανισμού του εναλλακτικού ματίσματος από ένα πλήρες δικιστρονικό μετάγραφο E6/E7 το οποίο συντίθεται με τη βοήθεια του πρώιμου υποκινητή του ιού. Για τους υπόλοιπους τύπους HPVs εντοπίστηκαν από ένα κάθε φορά εναλλακτικό μετάγραφο για κάθε τύπο ιού. Έχει προταθεί ότι οι HPVs εκμεταλλευόμενοι τον μηχανισμό του εναλλακτικού ματίσματος, παρά το μικρό μέγεθος του γενώματός τους, καταφέρνουν να κωδικοποιούν πολλαπλές πρωτεΐνες και επωφελούνται από το εναλλακτικό μάτισμα για να εκφράσουν διαφορεικά αυτές τις πρωτεΐνες σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης και σε καθορισμένο χρονικό διάστημα.

Ο **K. Sotlar και οι συνεργάτες του 2005**, στην τελευταία τους μεγάλη μελέτη επάνω στα μετάγραφα E6 και E7 των τύπων HPVs υψηλού κινδύνου, μελέτησαν 459 περιπτώσεις γυναικών με διάφορους βαθμούς Τραχηλικής Ενδοεπιθηλικής Νεοπλασίας, όπου τα κυτταρολογικά και τα ιστολογικά ευρήματα συμπίπτανε. Παρατήρησαν στα αποτελέσματά τους, ότι η παρουσία εναλλακτικών μεταγράφων του ιού ήταν πιο έντονη, καθώς ο βαθμός των αλλοιώσεων αυξανόταν από CIN 0 σε CIN III. Συγκεκριμένα, σε δείγματα όπου απουσίαζε οποιαδήποτε τραχηλική δυσπλασία, αλλά ο ιός ήταν παρών (CIN 0), ανιχνεύτηκαν εναλλακτικά μετάγραφα HR-HPVs σε ποσοστό μόλις 18%, σε περιστατικά CIN I βρέθηκαν σε ποσοστό 58%, σε περιστατικά CIN II ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 77% και σε περιπτώσεις CIN III βρέθηκαν σε ποσοστό 84%. Γίνεται, επομένως, φανερό ότι αυτή η μελέτη έβαλε τους πρώτους λίθους για να ξεκινήσει και να συνεχιστεί η



προσπάθεια συσχετισμού της παρουσίας εναλλακτικών μεταγράφων από τα ογκογονίδια E6 και E7 των τύπων HR-HPVs με την πιθανότητα που έχει μία ασθενής να εμφανίσει στο μέλλον κάποιον βαθμό Τραχηλικής Ενδοεπιθηλιακής Νεοπλασίας (CIN).

Με αφορμή τις μελέτες του K. Sotlar και των συνεργατών του, ξεκινήσαμε μία αντίστοιχη προσπάθεια συσχετισμού της παρουσίας εναλλακτικών μεταγράφων E6 και E7 των τύπων HPV-16, HPV-18, HPV-31 και HPV-33, συλλέγοντας κλινικά δείγματα από τρία μεγάλα Νοσοκομεία της Ελλάδας. Στα χρονικά πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, μελετήθηκαν 60 κλινικά περιστατικά γυναικών με διάφορους βαθμούς Τραχηλικής Ενδοεπιθηλιακής Νεοπλασίας. Σε 14 από τα 60 αυτά περιστατικά βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα των E6 και E7 ογκογονιδίων. Τα 6 από αυτά αφορούν περιστατικά Υψηλού Βαθμού Τραχηλικών Αλλοιώσεων HGSIL, 1 περιστατικό δεν συνοδευόταν από κάποιο διαθέσιμο ιστορικό, ενώ τα υπόλοιπα αφορούν Χαμηλού Βαθμού Τραχηλικές αλλοιώσεις LGSIL. Όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα διαθέτουν τα συντηρημένα σήματα ματίσματος στις 5' και 3 θέσεις ματίσματος υπακούοντας στον κανόνα GT-AG.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι στην επιμέρους μελέτη για τα E6 και E7 μετάγραφα του HPV-16, βρέθηκαν 2 δείγματα που περιλαμβάνουν και τα δύο είδη εναλλακτικών μεταγράφων που έχουν περιγραφθεί στην βιβλιογραφία και αυτά τα δείγματα αφορούν κλινική εικόνα LGSIL, ενώ τα υπόλοιπα 3 περιστατικά όπου εντοπίζεται μόνο το E6\*I μετάγραφο αφορούν Υψηλού Βαθμού Δυσπλασίες HGSIL. Η λειτουργία του E6\*II μεταγράφου δεν είναι γνωστή, ενώ για το E6\*I μετάγραφο έχει προταθεί ότι ρυθμίζει τα επίπεδα της E6 ογκοπρωτεΐνης και είναι ως επί το πλείστον υπεύθυνο για τη σύνθεση της E7 ογκοπρωτεΐνης.

Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει το γεγονός ότι στην επιμέρους μελέτη για τα E6 και E7 μετάγραφα του HPV-31, βρέθηκε να συνυπάρχουν σε Χαμηλού Βαθμού Τραχηλικές αλλοιώσεις LGSIL, τόσο εναλλακτικά μετάγραφα, όσο και πλήρη μετάγραφα που δεν έχουν υποστεί μάτισμα, υποδεικνύοντας, ίσως, πως αρχικά ο ιός συνθέτει μετάγραφα πλήρους μήκους σε Χαμηλού Βαθμού Τραχηλικές Δυσπλασίες και εν συνεχεία αυτά υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα και τροποποιείται με αυτόν τον τρόπο η ποσοτική έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών ή/και ταυτόχρονα παράγονται ογκοπρωτεΐνες με επιπλέον ιδιότητες,

ώστε να εμφανιστούν αμέσως αργότερα πιο σοβαρές αλλοιώσεις. Μάλιστα, στο δείγμα 3029, όπου συνυπάρχουν ο HPV-16 και ο HPV -31, παρ' ότι η κλινική εικόνα είναι LGSIL, εντοπίστηκαν εναλλακτικά μετάγραφα E6\*I και E6\*II, καθώς και πλήρη E6/E7 μετάγραφα του HPV-31.

Προφανώς, συμπληρωματικές μελέτες θα πρέπει να ακολουθήσουν, σε περισσότερα δείγματα, με στόχο να ανακαλυφθούν οποιαδήποτε εναλλακτικά μετάγραφα υπάρχουν σε δείγματα ασθενών με καρκίνο και διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN), όπου ο HPV-16, ο HPV-18, ο HPV-31 και ο HPV-33 είναι παρόντες. Επίσης, πρέπει οπωσδήποτε να απαντηθούν ερωτήματα, όπως, «γιατί παρότι υπάρχει κάποια σοβαρή αλλοίωση, στο δείγμα δεν εντοπίστηκαν εναλλακτικά μετάγραφα του ιού;» Σαφώς, υπάρχουν και κάποιοι παράγοντες που αλλοιώνουν τα αποτελέσματα, όπως ο τρόπος δειγματοληψίας του τραχηλικού επιχρίσματος ή η ασυμφωνία μεταξύ κυτταρολογικών και ιστολογικών ευρημάτων. Μπορεί η λήψη να είναι ιδιαίτερα επιφανειακή, εκεί όπου εκφράζονται μόνο τα όψιμα γονίδια του ιού και επομένως, είναι λογικό να μην βρεθούν εναλλακτικά μετάγραφα για τα E6 και E7 γονίδια. Επιπλέον, καθοριστικής σημασίας είναι το γεγονός ότι σε πολλά δείγματα υπάρχει ταυτόχρονη μόλυνση από περισσότερους από έναν τύπους HPVs και πιθανόν η αλλοίωση που εμφανίζει το εκάστοτε περιστατικό να οφείλεται στη δράση ενός τύπου ιού που δεν εξετάζεται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Η μελέτη αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον και θα συνεχιστεί στο πλαίσιο μίας διδακτορικής διατριβής με σκοπό να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα, να βρεθούν πιθανά νέα εναλλακτικά μετάγραφα που δεν έχουν εντοπισθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία και να υπάρχουν περισσότερο κλινικά δείγματα που θα πλαισιώνουν την έρευνα αυτή. Πάντως, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ κλινικής εικόνας και παρουσίας των E6 και E7 εναλλακτικών μεταγράφων, οπότε είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για να αξιολογηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό το κατά πόσον τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν ένα μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I σε CIN III και καρκίνο.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ashrafi, GH, Brown, DR, Fife, KH and Campo, MS 2006, 'Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins', *Virus Research*, vol. 1-2, pp. 208-11.
2. Baker, C and Calef, C 1996, 'Maps of Papillomavirus mRNA Transcripts', *mRNA Transcript Maps*, vol. 3, pp. 3-13.
3. Baker, CC 1997, 'Post-Transcriptional Regulation of Papillomavirus Gene Expression', *Post Transcriptional Regulation*, vol. 3, pp. 11-16.
4. Baker TS, Newcomb, WW, Olson, NH, Cowsert, LM, Olson, C and Brown, JC 1991, 'Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction', *Biophysical Journal*, vol. 60, pp. 1445-1456.
5. Barbosa, MS, Vass, WC, Lowy, DR and Schiller, JT 1991, 'In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential', *Journal of Virology*, vol. 1, pp. 292-8.
6. Barksdale, S and Baker, CC 1995, 'Differentiation-specific alternative splicing of bovine papillomavirus late mRNAs', *Journal of Virology*, vol. 69, pp. 6553-6556.
7. Berezutskaya, E, Yu, B, Morozov, A, Raychaudhuri, P and Bagchi, S 1997, 'Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein', *Cell Growth Differentiation*, vol. 8, pp. 1277-1286.
8. Bernard, HU 2002, 'Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches', *Antiviral Therapy*, vol. 7, pp. 219-237.
9. Boulet, G, Horvath, C, Vanden Broeck, D, Sahebali, S and Bogers, J 2007, 'Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, pp. 2006-2011.
10. Bouvard, V, Storey, A, Pim, D and Banks, L 1994, 'Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes', *EMBO Journal*, vol. 22, pp. 5451-9.
11. Boyer, SN, Wazer, DE and Band, V 1996, 'E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway', *Cancer Research*, vol. 56, pp. 4620-4624.
12. Brehm, A, Nielsen, SJ, Miska, EA, McCance, DJ, Reid, JL, Bannister, AJ and Kouzarides, T 1999, 'The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth' *EMBO Journal*, vol. 18, pp. 2449-2458.
13. Bryan, JT and Brown, DR 2001, 'Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells', *Virology*, vol. 281, pp. 35-42.

14. Buck, CB, Pastrana, DV, Lowy, DR and Schiller, JT 2004, 'Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors', *Journal of Virology*, vol. 2, pp.751-757.
15. Casas, I, Powell, L Klapper PE and Cleator GM 1995, 'New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay', *Journal of Virology*, vol. 53, pp. 25-36.
16. Charbonnier, S, Stier, G, Orfanoudakis, G, Kieffer, B, Atkinson, RA and Travé, G 2008, 'Defining the minimal interacting regions of the tight junction protein MAGI-1 and HPV16 E6 oncoprotein for solution structure studies', *Protein Expression and Purification*, vol. 60, pp. 64-73.
17. Carozzi, FM 2007, 'Combined analysis of HPV DNA and p16INK4a expression to predict prognosis in ASCUS and LSIL PAP smears', *Collegium Anthropologicum*, vol. 31, pp. 103-106.
18. Cattani, P, Siddu, A, D'Onghia, S, Marchetti, S, Santangelo, R, Vellone, VG, Zannoni, GF and Fadda, G 2009, 'RNA (E6 and E7) Assays versus DNA (E6 and E7) Assays for Risk Evaluation for Women Infected with Human Papillomavirus', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, pp. 2136-2141.
19. Ciuffo, G 1907, 'Innesto positive con filtrate di verruca volgare', *Giorn Ital Mal Venereol*, vol. 48, pp. 12-17.
20. Clavel, C, Masure, M, Putaud, I, Thomas, K, Bory, J, Gabriel, R, Quereux, C and Birembaut, P 1998, 'Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions', *Journal of Clinical Pathology*, vol. 51, pp. 737-740.
21. Clertant, P and Seif, I 1984, 'A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins', *Nature*, vol. 311, pp. 276-9.
22. Conrad, M, Bubb, VJ and Schlegel, R 1993, 'The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein', *Journal of Virology*, vol. 67, pp. 6170-6178.
23. Corden, SA, Sant-Cassia, LJ, Easton, AJ and Morris, AG 1999. 'The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma', *Molecular Pathology*, vol. 5, pp. 275-82.
24. Crawford, LV and Crawford, EM 1963, 'A comparative study of polyoma and papilloma viruses', *Virology*, vol. 21, pp. 258-263.
25. Cripe, TP, Haugen, TH, Turk, JP, Tabatabai, F, Schmid, PG, Durst, Gissmann, M, Roman, A and Turek, LP 1987, 'Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis' *EMBO Journal*, vol. 6, pp. 3745-3753.
26. Culp, TD and Christensen, ND 2004, 'Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions', *Virology*, vol. 319, pp. 152-61.
27. Danos, O, Katinka, M and Yaniv, M 1982, 'Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae', *The EMBO Journal*, vol. 1, pp. 231-236.

28. Day, PM, Roden, RBS, Lowy, DR and Schiller, JT 1998, 'The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domain'. *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 142-50.
29. Day, PM, Lowy, DR and Schiller, JT 2003, 'Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway', *Virology*, vol. 307, pp. 1-11.
30. De Geest, K, Turyk, ME, Hosken, MI, Hudson, JB, Laimins, LA and Wilbanks, GD 1993, 'Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines' *Gynecological Oncology*, vol. 49, pp. 303-10.
31. de Villiers, EM, Fauquet C, Broker, TR, Bernard, HU and zur Hausen, H 2004, 'Classification of papillomaviruses', *Virology*, vol. 324, pp. 17-27.
32. Dostatni, N, Lambert, PF, Sousa, R, Ham, J, Howley, PM and Yaniv, M 1991, 'The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex', *Genes and Development*, vol. 5, pp. 1657-1671.
33. Doorbar, J, Foo, C, Coleman, N, Medcalf, E, Hartley, O, Prospero, T, et al. 1997, 'Characterisation of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high affinity synthetic fabs to E4', *Virology*, vol. 238, pp. 40-52.
34. Doorbar, J 2006. 'Molecular biology of human papillomavirus', *Clinical Science*, vol. 110, pp. 525-541.
35. Dyson, N, Howley, PM, Munger, K and Harlow, E 1989, 'The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product', *Science*, vol. 243, pp. 934-937.
36. Dyson, N, Guida, P, Münger, K and Harlow, E 1992 ' Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins', *Journal of Virology*, vol. 66, pp. 6893-902.
37. Egawa, K 2003, 'Do human papillomaviruses target epidermal stem cells?', *Dermatology*, vol. 207, pp. 251-4.
38. Favre, M, Breitburd, F, Croissant, O, et al. 1975, 'Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papilloma viruses', *Journal of Virology*, vol. 15, pp. 1239-1247.
39. Fehrman, F, Klumpp, DJ and Laimins, LA 2003, 'Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation', *Journal of Virology*, vol. 77, pp. 2819-2831.
40. Florin, L, Sapp, C, Streeck, RE and Sapp, M 2002, 'Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins', *Journal of Virology*, vol. 76, pp. 10009-14.
41. Fournane, S, Charbonnier, S, Chapelle, A, Kieffer, B, Orfanoudakis, G, Travé, G, Masson, M and Nominé, Y 2010, 'Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of

- the tight junction protein MAGI-1', *Journal of Molecular Recognition*, vol. 24, pp. 511-523.
42. Frattini, MG, Lim, HB and Laimins. LA 1996, 'In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation dependent late gene expression', *Proceedings of National Academic Sciences*, vol. 93, pp. 3062-7.
43. Funk, JO, Waga, S, Harry, JB, Espling, E, Stillman, B and Galloway, DA 1997, 'Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein', *Genes Development*, vol. 11, pp. 2090-2100.
44. Gheit, T, Land, S, Gemignani, F, Snijders, PJ, Vaccarella, S, Franceschi, S, Canzian, F and Tommasino, M 2006, 'Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, pp. 2025-31.
45. Giroglou, T, Florin, L, Schafer, F, Streeck, RE and Sapp, M 2001, 'Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate', *Journal of Virology*, vol. 75, pp.1565-70.
46. Gissmann, L, Pfister, H, zur Hausen, H 1977, 'Human papilloma virus (HPV): characterization of 4 different isolates', *Virology*, vol. 76, pp. 569-580.
47. Grassmann, K, Rapp, B, Maschek, H, Petry, KU and 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' *Journal of Virology*, vol. 70, pp. 2339-49.
48. Ham, J, Steger, G and Yaniv, M, 1994 'Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure', *EMBO Journal*, vol. 1, vol. 147-57.
49. Hatama, S 2011, 'Cutaneous Papillomatosis in Cattle', *Journal of Disaster Research*, vol. 7, pp. 319-320.
50. Hawley, NP, Vousden, KH, Hubbert, NL, Lowy, DR and Schiller, JT 1989, 'HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes', *EMBO Journal*, vol. 12, pp. 3905-10.
51. Hoffmann, R, Hirt, B, Bechtold, V, Beard, P and Raj, K 2006, 'Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance', *Journal of Virology*, vol. 9, pp. 4431-9.
52. Joyce, JG, Tung, JS, Przysiecki, CT, Cook, JC, Lehman, ED, Sands, JA, 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', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 5810-22.
53. Kerkisiek, K 2009, 'A Virus in the Limelight - Papilloma and the Nobel Prize', *Infection Research, Perspectives*, 12 January 2009.



54. Kraus, I, Molden, T, Holm, R, Lie, K, Karlsen, F, Kristensen, GB and Skomedal, H 2006, 'Presence of E6 and E7 mRNA from Human Papillomavirus Types 16, 18, 31, 33 and 45 in the Majority of Cervical Carcinomas', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, pp. 1310-1317.
55. Laimins, LA 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.
56. Li, M, Beard, P, Estes, PA, Lyon, MK and Garcea, RL 1998, 'Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly', *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 2160-7.
57. Liu, JS, Kuo, SR, Broker, TR and Chow, LT 1995, 'The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication' *Journal of Biological Chemistry*, vol. 45, pp. 27283-91.
58. Liu, X, Dakic, A, Zhang, Y, Dai, Y, Chen, R and Schlegel, R 2009, 'HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, pp. 18780-18785.
59. Longworth, MS and Laimins, LA 2004, 'The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31', *Journal of Virology*, vol. 78, pp. 3533-3541.
60. Mammas, I, Sourvinos, G, Giannoudis, A and Spandidos, DA 2008, 'Human Papilloma Virus (HPV) and Host Cellular Interactions', *Pathology and Oncology Research*, vol. 14, pp. 345-354.
61. Mansky, KC, Batiza, A and Lambert, PF 1997, 'Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions', *Journal of Virology*, vol. 10, pp. 7600-8.
62. Modis, Y, Trus, BL and Harrison, SC 2002, 'Atomic model of the papillomavirus capsid', *EMBO Journal*, vol. 21, pp. 4754-62.
63. Molden, T, Kraus, I, Karsen, F, Skomedal, H, Nygard, JF and Hagmar, B 2005, 'Comparison of human Papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4136 women, 30 years of age with a 2-year follow up of High grade Squamous intraepithelial lesion', *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, vol. 14, pp 367-372.
64. Munger, K, Werness, B, Dyson, N, Phelps, W, Harlow, E and Howley, P 1989, 'Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product' *EMBO Journal*, vol. 8, pp. 4099-4105.
65. Muñoz, N, Bosch, FX, de Sanjosé, S, Herrero, R, Castellsagué, X, Shah, KV, Snijders, PJF and Meijer, CJLM 2003, 'Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer', *New England Journal of Medicine*, vol. 348, pp. 518-27.

66. Naib, ZM, Nahmias, AJ, Josey, WE and Kramer, JH 1969, 'Genital herpetic infections Association with cervical dysplasia and carcinoma', *Cancer*, vol. 23, pp. 940-945.
67. Nahmias, AJ, Josey, WE, Naib, ZM, Luce, CF and Guest, BA 1970, 'Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer', *American Journal of Epidemiology*, vol. 91, pp. 547-552.
68. Nominé, Y, Masson, M, Charbonnier, C, Zanier, K, Ristriani, T, Derycère, F, Sibler, AP, Desplancq, D, Atkinson, RA, Weiss, E, Orfanoudakis, G, Kieffer, B and Travé, G 2006, 'Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein: Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis', *Molecular Cell*, vol. 21, pp. 665-678.
69. Orth, G 2008, 'Papillomaviruses: General Features of Human Viruses', in Mahy, BWJ & Regenmortel, M, (ed.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd Edition, Elsevier Ltd., Institut Pasteur, Paris, France, pp. 8-18.
70. Ozbun, MA and Meyers, C 1998, 'Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b', *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 2715-22.
71. Pett, MR, Herdman, MT, Palmer, RD, Yeo, GS, Shivji, MK, Stanley, MA and Coleman, N 2006, 'Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response', *Proceedings of National Academic Sciences of United States of America*, vol. 10, pp. 3822-7.
72. Pfister, H, Gissman, L and zur Hausen, H 1977, 'Partial characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3' *Virology*, vol. 83, pp. 131-137.
73. Pim, D and Banks, L 2010, 'Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses', *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, vol. 118, pp. 471-493.
74. Rawls, WE, Tompkins, WA, Figueroa, ME and Melnick, JL 1968, 'Herpesvirus type 2: association with cancer of the cervix', *Science*, vol. 161, pp. 1255-1256.
75. Rebrikov, DV, Bogdanova, EA, Bulina, ME and Lukyanov, SA 2002, 'A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtractive hybridization', *Molecular Biology*, vol. 36, pp. 813-820.
76. Roberts, S, Ashmole, I, Gibson, LJ, Rookes, SM, Barton, GJ and Gallimore, PH 1994, 'Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells', *Journal of Virology*, vol. 10, pp. 6432-45.
77. Roden, RB, Lowy, DR and Schiller, JT 1997, 'Papillomavirus is resistant to desiccation', *Journal of Infectious Diseases*, vol. 176, pp. 1076-9.
78. Romanczuk, H, Thierry, F and Howley, PM 1990, 'Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters', *Journal of Virology*, vol. 64, pp. 2849-59.

79. Scheurer, M, Tortolero-Luna, G, Guillaud, M, Folle, M, Chen, Z, Dillon, LM and Adler-Storthz, K 2005, 'Correlation of Human Papillomavirus Type 16 and Human Papillomavirus Type 18 E7 Messenger RNA Levels with Degree of Cervical Dysplasia', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 14, pp. 1948-1952.
80. Selinka, HC, Giroglou, T and Sapp, M 2002, 'Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions', *Virology*, vol. 299, pp. 279-87.
81. Sherman, L, Jackman, A, Itzhaki, H, Stoppler, MC, Koval, D and Schlegel, R 1997, 'Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation', *Virology*, vol. 237, pp. 296-306.
82. Shope, RE and Weston, EW 1933, 'Infectious papillomatosis of rabbits', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 58, pp. 607-628.
83. Schmitt, A, Rochat, A, Zeltner, R, Borenstein, L, Barrandon, Y, Wettstein, FO, et al. 1996, 'The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells', *Journal of Virology*, vol. 70, pp. 1912-22.
84. Smotkin, D and Wettstein, FO 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', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, pp. 4680-4684.
85. Sotlar, K, Diemer, D, Dethleffs, A, Hack, Y, Stubner, A, Vollmer, N, Menton, S, Menton, M, Dietz, K, Wallwiener, D, Kandolf, R and Bultmann, B 2004 a, 'Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, pp. 3176-84.
86. Sotlar, K, Stubner, A, Diemer, D, Menton, M, Dietz, K, Waawiener, Kandolf, R and Bultmann, B 2004 b, 'Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction', *Journal of Medical Virology*, vol. 74, pp. 107-116.
87. Sotlar, K, Diemer, D, Stubner, A, Menton, S, Menton, M, Dietz, K, Wallwiener, D and Bultmann, B 2005, 'Detection of high-risk human papillomavirus (HPV) E6 and E7 oncogene transcripts increases the specificity of the detection of a cervical intraepithelial neoplasia (CIN)', *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, vol. 89, pp. 195-200.
88. Stacey, SN, Jordan, D, Snijders, PJF, Mackett, M, Walboomers, JMM and Arrand, JR 1995, 'Translation of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein from Bicistronic mRNA Is Independent of Splicing Events within the E6 Open Reading Frame', *Journal of Virology*, vol. 69, pp. 7023-7031.
89. Stacey, SN, Jordan, D, Williamson, AJ, Brown, M, Coote, JH and Arrand, JR 2000, 'Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA', *Journal of Virology*, vol. 74, pp. 7284-7297.

90. Stanley, MA, Browne, HM, Appleby, M and Minson, AC 1989, 'Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line' *International Journal of Cancer*, vol. 43, pp. 672-6.
91. Stauffer, Y, Raj, K, Masternak, K and Beard, P 1998, 'Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions', *Journal of Molecular Biology*, vol. 283, pp. 529-36.
92. Steger, G and Corbach, S 1997, 'Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein', *Journal of Virology*, vol. 71, pp. 50-58.
93. Straight, SW, Hinkle, PM, Jewers, RJ and McCance, DJ 1993, 'The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes', *Journal of Virology*, vol. 67, pp. 4521-4532.
94. Strauss, MJ, Shaw, EW, Bunting, H and Melnick, JL 1949, 'Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 72, pp.46-50.
95. Tan, SH, Gloss, B and Bernard, HU 1992, 'During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element', *Nucleic Acids Research*, vol. 20, pp. 251-256.
96. Tang, S, Tao, M, McCoy, P and Zheng, ZM 2006, 'The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6\*1 Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation', *Journal of Virology*, vol. 80, pp. 4249-4263.
97. Thorner, LK, Lim, DA and Botchan, MR 1993, 'DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects', *Journal of Virology*, vol. 67, pp. 6000-14.
98. Titolo, S, Welchner, E, White, PW and Archambault, J 2003, 'Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy', *Journal of Virology*, vol. 77, pp. 5512-5518.
99. Trope, A, Sjoborg, K, Eskild, A, Guschieri, K, Eriksen, T, Thoresen, S, Steinbakk, M, Laurak, V, Jonassen, CM, Westerhagen, U, Jacobsen, MB and Lie, AK 2009, 'Performance of human Papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, pp. 2458-2464.
100. Ustav, M and Stenlund, A 1991, 'Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames', *EMBO Journal*, vol. 10, pp. 449-57.
101. Wang, J, Sampath, A, Raychaudhuri, P and Bagchi, S 2001, 'Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells', *Oncogene*, vol. 20, pp. 4740-4749.

102. Qu, W, Jiang, G, Cruz, Y, Jen Chang, C, Ho, GYF, Klein, RS and Burk RD 1997, 'PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, pp. 1304-1310.
103. Wilson, VG, West, M, Woytek, K and Rangasamy, D 2002, 'Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features', *Virus Genes*, vol. 24, pp. 275-90.
104. Wilson, R, Fehrmann, F, Laimins, LA, 2005, 'Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31', *Journal of Virology*, vol. 11, pp. 6732-40.
105. Wright, TC 2006, 'Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system', *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, vol. 94, pp. 22-31.
106. Vinokurova, S, Wentzensen, N, Kraus, I, et al. 2008, 'Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions', *Cancer Research*, vol. 68, pp. 307-313.
107. You, J, Croyle, JL, Nishimura, A, Ozato, K and Howley, PM 2004, 'Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes', *Cell*, vol. 117, pp. 349-60.
108. Yugawa, T and Kiyono, T 2009, 'Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins', *Reviews in Medical Virology*, vol. 19, pp. 97-113.
109. Zheng, ZM and Baker, CC 2006, 'Papillomavirus genome structure expression and post-transcriptional regulation', *Frontiers in Bioscience*, vol. 11, pp. 2286-2302.
110. Zhou, J, Stenzel, DJ, Sun, XY and Frazer, IH 1993, 'Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro', *Journal of General Virology*, vol. 74, pp. 763-8.