

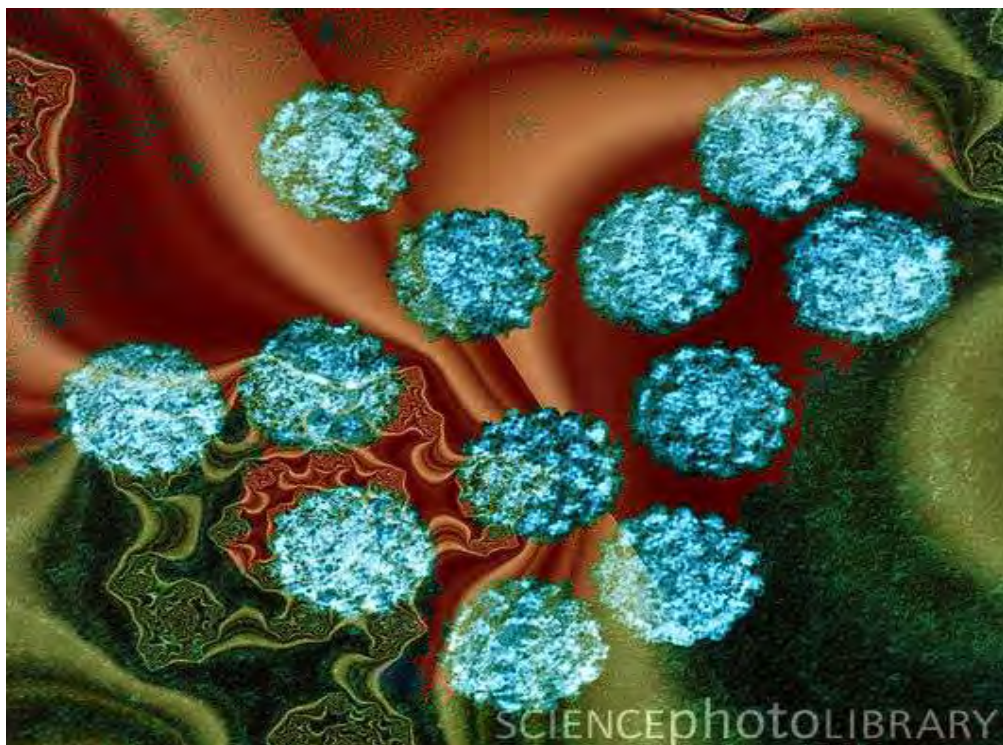
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

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

ΤΟΣΚΑ ΕΛΕΝΗ

**“Δημιουργία «PCR μικροσυστοιχειών» για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό 8
HPV ιών υψηλού κινδύνου (16,18,33,35,45,51,58 και 66)”**



Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

2012

“Δημιουργία «PCR μικροσυτοιχειών» για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό 8 HPV ιών υψηλού κινδύνου (16,18,33,35,45,51,58 και 66)”

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Π.Μαρκουλάτος: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Κ.Ματθιόπουλος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας

Δ.Μόσιαλος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βιολογία των Human Papillomaviruses (HPVs)

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	8
1.2 Ταξινόμηση των Papillomaviruses.....	11
1.2.1 Alpha –papillomaviruses.....	13
1.2.2 Beta – papillomaviruses.....	13
1.2.3 Gamma, Mu, Nu, papillomaviruses.....	14

2. Δομή του Human Papillomaviruses

2.1 Δομή καψιδίου.....	14
2.2 Οργάνωση γενόματος.....	17
2.2.1 Η ιϊκή πρωτεΐνη E1.....	19
2.2.2 Η ιϊκή πρωτεΐνη E2.....	20
2.2.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4.....	21
2.2.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5.....	23
2.2.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6.....	23
2.2.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7.....	26

3. Ο κύκλος ζωής των HPVs

3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	29
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενόματος.....	30
3.3 Μεταγραφή του ιικού γενόματος.....	32
3.4 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού.....	33
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	34

4. Κλινικές εκδηλώσεις

4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPVs.....	38
4.2 Διάγνωση των HPV λοιμώξεων.....	39
4.2.1 Test Pap.....	39
4.2.2 Ιστοπαθολογία.....	41
4.2.3 Μοριακή Διάγνωση HPV λοιμώξεων	42

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Κλινικά δείγματα.....	47
---------------------------	----

5.2 Απομόνωση DNA.....	51
5.2.1 Απομόνωση DNA από δείγματα που φυλάσσονται σε thinprep.....	51
5.2.2 Απομόνωση DNA από τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένες σε παραφίνη.....	51
5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH.....	52
5.4 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου L1.....	53
5.5 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1.....	55
5.5.1 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-16.....	55
5.5.2 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-18.....	56
5.5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-45.....	57
5.5.4 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-66.....	59
5.5.5 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-33.....	61
5.5.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-35.....	62
5.5.7 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-51.....	64
5.5.8 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV-58.....	65
5.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
6.1 Αποτελέσματα PCR με GAPDH εκκινητές.....	68
6.2 Αποτελέσματα PCR με τυποειδικούς εκκινητές.....	69
6.2.1 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV16F/ HPV16R.....	69
6.2.2 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV18F/ HPV18R.....	71
6.2.3 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV45F/ HPV45R.....	72
6.2.4 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV66F/ HPV66R.....	74
6.2.5 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV33F/ HPV33R.....	75
6.2.6 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV35F/ HPV35R.....	77
6.2.7 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV51F/ HPV51R.....	78
6.2.8 Αποτελέσματα PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV58F/ HPV58R.....	79
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

Πρόλογος

Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση και την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας με θέμα << **Δημιουργία «PCR μικροσυστοιχειών» για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό 8 HPV ιών υψηλού κινδύνου (16,18,33,35,45,51,58 και 66)** >>. Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αλλά κυρίως για την υπομονή που έδειξε μέχρι το τέλος της διατριβής καθώς και για τις γνώσεις που μου παρείχε τόσο κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος όσο και κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ γιατί μου έδωσε την δυνατότητα με τον τρόπο αυτό να εισαχθώ στο χώρο της έρευνας και της επιστήμης και να αποκτήσω ιδιαίτερο ενδιαφέρον γι αυτήν.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, μέλος του Ειδικού Τεχνικού και Διδακτικού προσωπικού του Τμήματος, τους υποψήφιους διδάκτορες Ρούτερ Ειρήνη, Δημητρίου Τηλέμαχο για την συνεργασία τους και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε το χρειάστηκα στο εργαστήριο και κυρίως τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Τσακογιάννη Δημήτρη για τη βοήθειά του καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου. Τέλος ένα ευχαριστώ στους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής μου που δέχτηκαν να συμμετάσχουν σε αυτήν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των θηλωμάτων ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} από τον Francis Peyton Rous και ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Αποτελούν μια ομάδα επιθηλιο-τροπικών ιών με δίκλωνο κυκλικό DNA που στερούνται εξωτερικού περιβλήματος. Προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου του δέρματος και του βλεννογόνου και ευθύνονται για την πρόκληση κοινών θηλωμάτων και κονδυλωμάτων που μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήθεις όγκους. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τους papilloma ιούς αναπτύχθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι αυτοί προκαλούσαν μια σειρά δερματικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο και ιδιαίτερα όταν συσχετίστηκαν με την πρόκληση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής, ενώ μια ομάδα 30 στελεχών του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλει το ουρογεννητικό σύστημα. Έχουν παγκόσμια κατανομή και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα από καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις στον άνθρωπο. Περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV έχουν μέχρι σήμερα πλήρως αναγνωρισθεί. Οι HPV κατηγοριοποιούνται σε δερματικούς τύπους, οι οποίοι προκαλούν κυρίως καλοήθεις βλάβες όπως το κοινό και το ακροχορδώδες θήλωμα και σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι διαχωρίζονται περαιτέρω σε τύπους υψηλής επικινδυνότητας, ενδιάμεσης επικινδυνότητας και χαμηλής επικινδυνότητας ανάλογα με τη συσχέτισή τους με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι κυριότεροι τύποι υψηλής επικινδυνότητας είναι οι HPV-16,-18,-31 και -45 οι οποίοι σύμφωνα με μοριακές και επιδημιολογικές μελέτες ευθύνονται για το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι κύριοι τύποι χαμηλής επικινδυνότητας είναι οι HPV-6 και -11 που ανευρίσκονται κυρίως σε καλοήθη γεννητικά θηλώματα. Οι τύποι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου προκαλούν επίσης αλλοιώσεις στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα και τον οισοφάγο ενώ σχετίζονται ακόμη με τον καρκίνο της μήτρας, του πέους και του πρωκτού.

Παρόλο που η εφαρμογή προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) τα τελευταία χρόνια ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά παραμένουν υψηλά. Η ετερογένεια του φάσματος των HPV και το γεγονός ότι οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωτικές καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη τη διάγνωση αυτών. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των HPV ή η βελτίωση των ήδη υπάρχοντων. Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση

μιας HPV μόλυνσης, ειδικά από στελέχη υψηλής επικινδυνότητας που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπισή της και επομένως τη θεραπεία των ασθενών. Εκτός από τις κυτταρολογικές και ιστολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται (test pap, βιοψία), τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί και διάφορες μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση των DNA αλληλουχιών των HPV. Αυτές βασίζονται είτε στον υβριδισμό νουκλεϊκών οξέων (Hybrid Capture II) είτε στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών και εκφυλισμένων εκκινητών για την ενίσχυση των ιικών γονιδίων E6,E7 και L1 αντίστοιχα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της L1 γενωμικής περιοχής 8 στελεχών HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16,-18,-45,-66,-33,-35,-51 και -58). Στόχος μας ήταν να αναπτύξουμε μια μέθοδο υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας για την ταυτοποίηση των κύριων HPV στελεχών υψηλής επικινδυνότητας. Η L1 αποτελεί την πιο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV και για το λόγο αυτό έγινε η επιλογή της για το σχεδιασμό των εκκινητών.

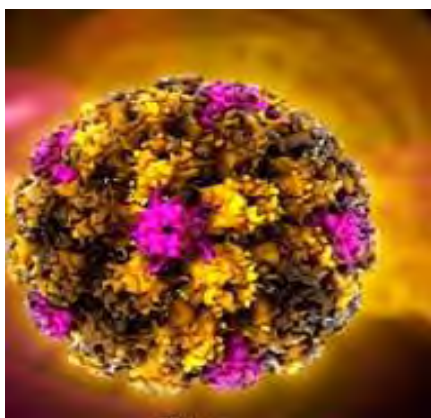
Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος primer 3. Αφού ήταν πλέον διαθέσιμες οι αλληλουχίες των εκκινητών πραγματοποιήθηκαν με αυτές αντιδράσεις PCR σε 122 κλινικά δείγματα, τα οποία είχαν ήδη ταυτοποιηθεί για τα παραπάνω στελέχη HPV με άλλες μεθόδους (Nested Multiplex PCR, HPV microarrays). Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι έγιναν κάποιοι συμπληρωματικοί έλεγχοι με PCR για να διαπιστώσουμε εάν οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για κάθε ένα από τα παραπάνω στελέχη ενισχύουν μη ειδικά τη γενωμική περιοχή L1 άλλων HPV στελεχών. Από την πειραματική διαδικασία προέκυψε ότι τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας ήταν αποτελεσματικά για την ενίσχυση της περιοχής L1 των 8 στελεχών που αναφέρονται παραπάνω καθώς επίσης ότι δεν ενισχύουν την ίδια περιοχή άλλων HPVs στελεχών, είναι δηλαδή τυποειδικά. Η εργασία αυτή αποτελεί το πρωταρχικό μέρος της ευρύτερης προσπάθειας για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης μεθόδου ανίχνευσης HPV μολύνσεων βασισμένη στην ενίσχυση της L1 γενωμικής περιοχής. Μελλοντική προοπτική είναι η χρήση των τυποειδικών αυτών εκκινητών σε ένα πρωτόκολλο Multiplex PCR, πλεονέκτημα του οποίου θα είναι η δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών HPV μολύνσεων σε μία μόνο αντίδραση PCR.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Η Βιολογία των Human Papillomaviruses

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από τη λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) αποτελούν την οικογένεια των Papillomaviridae. Πρόκειται για ιούς με δίκλωνο κυκλικό DNA μεγέθους περίπου 7900bp που χαρακτηρίζονται από την έλλειψη εξωτερικού περιβλήματος. Προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Ενοχοποιούνται για την πρόκληση βλαβών που μπορεί να κυμαίνονται από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο του πέους (Zur Hausen 1996).



Εικόνα 1.1: *Human Papilloma virus(HPV)*

Η μεταδοτική φύση των θηλωμάτων σε ανθρώπους και ζώα αποδείχτηκε στις αρχές του 20ου αιώνα (Zur Hausen,1996). Πρώτες πειραματικές προσπάθειες προκειμένου να συσχετιστούν αυτές οι μολύνσεις με την ανάπτυξη καρκίνου πραγματοποιήθηκαν από τον Rous και τους συνεργάτες του τη δεκαετία του 1930 και τις 2 δεκαετίες που ακολούθησαν (Rous et al 1934). Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Βασίζόμενος σε αρχικές παρατηρήσεις του Shope, ο Rous συσχέτισε τη μόλυνση οικόσιτων κουνελιών του γένους *sylvilagus* από papilloma ιούς με την ανάπτυξη όγκων. Η καρκινογόνος δράση του papilloma ιού Shope (αργότερα μετονομάστηκε σε papilloma ιός

των κουνελιών του γένους *sylvilagus* ή CRPV) επιβεβαιώθηκε μετέπειτα από τον Ito και τους συνεργάτες του, οι οποίοι προκάλεσαν καρκινώματα σε οικόσιτα κουνέλια με απομονωμένο DNA από CRPV ή με DNA που εκχυλίστηκε από θηλώματα και καρκινώματα που είχαν προκληθεί από τον ιό CRPV.

Η πρώτη παρατήρηση σωματιδίων papilloma ιών σε ανθρώπινα θηλώματα με ηλεκτρονική μικροσκοπία αναφέρθηκε το 1949 (Strauss et al, 1949). Η δομή του γενώματος των papilloma ιών αποκαλύφθηκε το 1963 από τους Crawford και Crawford (Crawford, L.V. and Crawford, E.M, 1963). Όμως η έλλειψη συστημάτων καλλιέργειας ιστών και η καλοήθης φύση των ανθρώπινων θηλωμάτων είχε ως αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν ελάχιστα επιπλέον πειράματα στα χρόνια που ακολούθησαν.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκε σταδιακά το ενδιαφέρον για τους papilloma ιούς, όπως αποδείχτηκε από τις πρώτες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν επάνω σε αυτούς. Σε αυτό συνέβαλε εν μέρει η υπόθεση ότι οι papilloma ιοί μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (zur Hausen et al, 1974, 1976). Η έρευνα για τους papilloma ιούς επίσης παρακινήθηκε από την αναγνώριση νέων τύπων HPV σε αλλοιώσεις ασθενών με την κληρονομική ασθένεια Epidermodysplasia verruciformis (EV) (Orth et al. 1977, 1979).

Στη δεκαετία του 1980 η κατάσταση άλλαξε ξαφνικά: η απομόνωση νέων τύπων HPV (HPV 6 και 11) από γεννητικά θηλώματα και στη συνέχεια απευθείας από βιοψίες καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, όπως οι HPV 16 και 18 (Durst, M. et al 1983, Boshart, M., et al 1984), είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη εξάπλωση των πειραματικών εργασιών και των επιδημιολογικών προσεγγίσεων. Όμως παρά τις πολλές προσπάθειες από διάφορα εργαστήρια, χρειάστηκε τουλάχιστον μια δεκαετία για να γίνει ευρέως αποδεκτός ο ρόλος συγκεκριμένων τύπων HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, που είναι πλέον μία από τις πιο διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως (Schiffman, M.H., et al 1993, Munoz, N., et al 1992, Matsukura, T. and Sugase, M. 1995). Σήμερα το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στους μηχανισμούς με τους οποίους οι papilloma ιοί επάγουν την καρκινογένεση, όπως για παράδειγμα με ποιο τρόπο τα γονίδια των ιών αυτών επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και πώς οι ογκοπρωτεΐνες τους αλληλεπιδρούν με στοιχεία του κυττάρου-ξενιστή. Οι papilloma ιοί έχουν αναδειχτεί οι πιο κοινοί ογκογόνοι ιοί και φαίνεται να διαδραματίζουν έναν 'κρυφό' ρόλο ως βασικοί παθογόνοι παράγοντες στην πρόκληση καρκίνου (zur Hausen, H. 1983).

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται κυρίως μέσω δερματικής επαφής, ενώ μια ομάδα 30 στελεχών του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλει

το ουρογεννητικό σύστημα (Gillison 2001). Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στιβάδας. Περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί και πλήρως αλληλουχηθεί, κάθε ένας από τους οποίους σχετίζεται με μολύνσεις σε συγκεκριμένες θέσεις του επιθηλίου, ενώ περισσότεροι από 120 θεωρητικά καινούργιοι τύποι έχουν εν μέρει χαρακτηριστεί (Zur Hausen 2000). Οι HPV μπορούν γενικά να κατηγοριοποιηθούν σε δερματικούς τύπους και σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου βάσει του ιστού για τον οποίο εκδηλώνουν τροπισμό. Οι δερματικοί τύποι βρίσκονται στο γενικό πληθυσμό και προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι HPV τύποι που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας, στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα, τον οισοφάγο και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι HPV της τελευταίας κατηγορίας μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες ανάλογα με την συσχέτισή τους με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (πίνακας 1). Στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση διηθητικού καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος. Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk) τα μέλη της οποίας σπάνια εντοπίζονται σε καρκίνο, σχετίζονται όμως συχνά με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz N. et al 2003). Οι πιο κοινοί τύποι χαμηλής επικινδυνότητας είναι οι HPV-6 και-11 που ανιχνεύονται πιο συχνά σε καλοήγη γεννητικά θηλώματα. Οι κύριοι τύποι υψηλής επικινδυνότητας είναι οι HPV-16, -18, 31 και -45 και είναι υπεύθυνοι περίπου για το 80% των περιπτώσεων καρκινώματος των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας, ενώ ο HPV-16 μόνος του ευθύνεται περίπου για τις μισές περιπτώσεις παγκοσμίως (Clifford GM et al 2003).

Ομάδα επικινδυνότητας	Τύπος HPV
Υψηλού κινδύνου (High risk)	HPV16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68,73,82,83
Ενδιαμέσου κινδύνου (Middle risk)	HPV-26,53,66
χαμηλού κινδύνου (Low risk)	HPV-6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81

Πίνακας 1.1: Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων

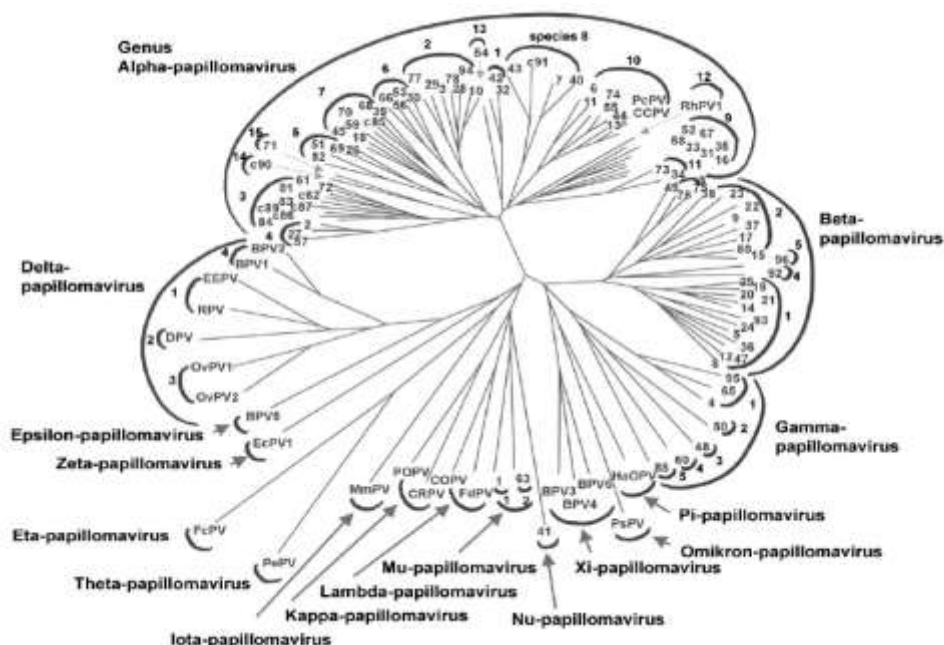
Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV επίσης σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους papilloma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

1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses

Αρχικές εκτιμήσεις για τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (papillomaviruses) κατέληξαν στην ταξινόμηση αυτών στην οικογένεια των Papovaviridae μαζί με τους polyoma ιούς και τον SV40. Η αρχική αυτή ταξινόμηση έγινε κυρίως βάσει της ομοιότητας που εμφάνιζαν όλοι οι παραπάνω ιοί στην δομή του καψιδίου, της έλλειψης εξωτερικού περιβλήματος καθώς επίσης βάσει της παρατήρησης ότι διέθεταν όλοι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA (Danos O et al 1989). Αργότερα όμως οι ιοί των θηλωμάτων διαχωρίστηκαν από τους polyoma ιούς και τον SV40 και ταξινομήθηκαν από τη διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) σε μια ξεχωριστή οικογένεια, την οικογένεια των Papillomaviridae, η οποία δεν σχετίζεται με τους παραπάνω ιούς. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι παρατηρήθηκαν εμφανείς διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία, το μέγεθος καθώς και στην οργάνωση ανάμεσα στους papilloma ιούς και τα μέλη της οικογένειας των Papovaviridae (de Villiers E.M et al 2004).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των διάφορων ικών τύπων βασίζεται στην προέλευση του στελέχους και το βαθμό συγγένειας των ικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al 1995). Ειδικότερα οι papilloma ιοί ταξινομούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προκύπτουν από ένα γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου. Υπάρχουν συνολικά 12 γένη, από τα οποία τα Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu

περιέχουν ιϊκά στελέχη των ανθρώπινων θηλωμάτων ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) περιλαμβάνουν ζωικά στελέχη (Hoory T. et al 2008). Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants) βάσει της ομοιότητας της αλληλουχίας του L1 γονιδίου. Το L1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, που κωδικοποιεί για την καψιδιακή πρωτεΐνη L1, αποτελεί την πιο συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των papilloma ιών και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των ιών αυτών καθώς και για τον καθορισμό νέων ιϊκών τύπων. Όλα τα μέλη ενός γένους εμφανίζουν ομοιότητα 60% στην L1 αλληλουχία. Κάθε νέος papilloma ιός που απομονώνεται αποτελεί διαφορετικό τύπο όταν η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από αυτήν του κοντινότερου γνωστού τύπου τουλάχιστον 10%. Διαφορές στην αλληλουχία αυτή σε ποσοστό 2-10% καθορίζουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορά 2% καθορίζει μια παραλλαγή (variant), (de Villiers E.M et al 2004). Στην εικόνα 1. παρουσιάζονται τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu που όπως αναφέρθηκε παραπάνω περιέχουν στελέχη που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο καθώς και τα υπόλοιπα γένη ((Pi, Xi, Lamda κ.α.) που περιέχουν στελέχη που προέρχονται από μεγάλη ποικιλία πτηνών και θηλαστικών (Charles E. et al 2007, A.Antonson et al 2006).



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

1.2.1 Alpha-papillomavirus

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι ιοί του γένους Alpha ανευρίσκονται μόνο σε ανθρώπους και πρωτεύοντα και η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τους HPV τύπους που σχετίζονται πιο συχνά με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Έχουν βρεθεί περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, ενώ ένα υποσύνολο αυτών έχει συσχετιστεί με αλλοιώσεις που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο. Αυτοί οι τύποι έχουν χαρακτηριστεί ως HPV υψηλής επικινδυνότητας. Ο HPV 16 είναι ο επικρατέστερος μεταξύ των ιών υψηλής επικινδυνότητας στον πληθυσμό και είναι υπεύθυνος για το 50% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ ο HPV 18 έχει ενοχοποιηθεί περίπου για το 20% των περιπτώσεων. Οι υπόλοιποι τύποι που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου έχουν κατηγοριοποιηθεί ως HPV ενδιάμεσης και χαμηλής επικινδυνότητας, ανάλογα με τη συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται σε όγκους. Οι HPV χαμηλής επικινδυνότητας, όπως οι HPV6 και 11 που είναι οι καλύτερα μελετημένοι τύποι αυτής της κατηγορίας, σχετίζονται μόνο σπάνια με την πρόκληση καρκίνου. Ωστόσο εξακολουθούν να είναι κλινικά σημαντικοί επειδή έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση εξωτερικών γεννητικών θηλωμάτων. Τα γεννητικά θηλώματα αποτελούν την κυριότερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια σε πολλές χώρες και μπορεί να προσβάλλει νέα άτομα σε ποσοστό 1-2%. Αν και δεν αποτελούν κίνδυνο για τη ζωή, είναι δύσκολο να θεραπευτούν αποτελεσματικά σε πολλούς ασθενείς (G. Persson et al 1996). Το γένος Alpha περιλαμβάνει επίσης HPV τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV2, οι οποίοι προκαλούν κοινά θηλώματα και πολύ σπάνια σχετίζονται με την πρόκληση καρκίνου(de Villiers et al 2004).

1.2.2 Beta-papillomavirus

Οι ιοί που ανήκουν στο γένος Beta διακρίνονται εξελικτικά από αυτούς που ανήκουν στο γένος Alpha και προκαλούν μη εμφανείς ή ασυμπτωματικές μολύνσεις στο γενικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά έχει αποδειχτεί ότι σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια Epidermodysplasia Verruciformis (EV), οι ιοί του γένους αυτού μπορούν να εξαπλωθούν ανεξέλεγκτα και εμπλέκονται στην ανάπτυξη μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος (C.A. Harwood and C.M Proby 2002, H.Pfister 2003).

1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Οι υπόλοιποι HPV τύποι προέρχονται από τα γένη Gamma, Mu, Nu και προκαλούν εμφανή δερματικά θηλώματα τα οποία γενικά δεν εξελίσσονται σε καρκίνο. Μόνο 2 HPV τύποι του γένους Mu είναι γνωστοί, οι HPV-1 και HPV-63, ενώ το γένος Nu αποτελείται από ένα μόνο μέλος (Doorbar J. 2006). Στον παρακάτω πίνακα (1.2) παρουσιάζονται τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu:

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

Πίνακας 1.2: Αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV

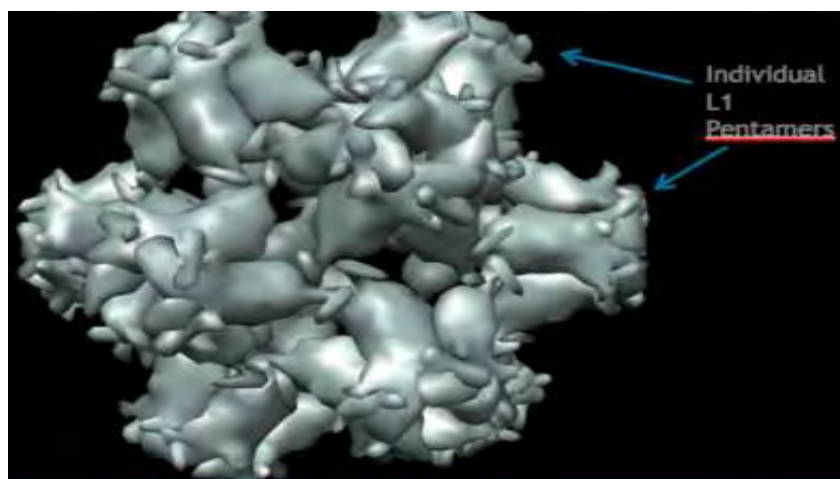
2. Δομή των ανθρώπινων papilloma ιών (HPVs)

2.1 Δομή του καψιδίου

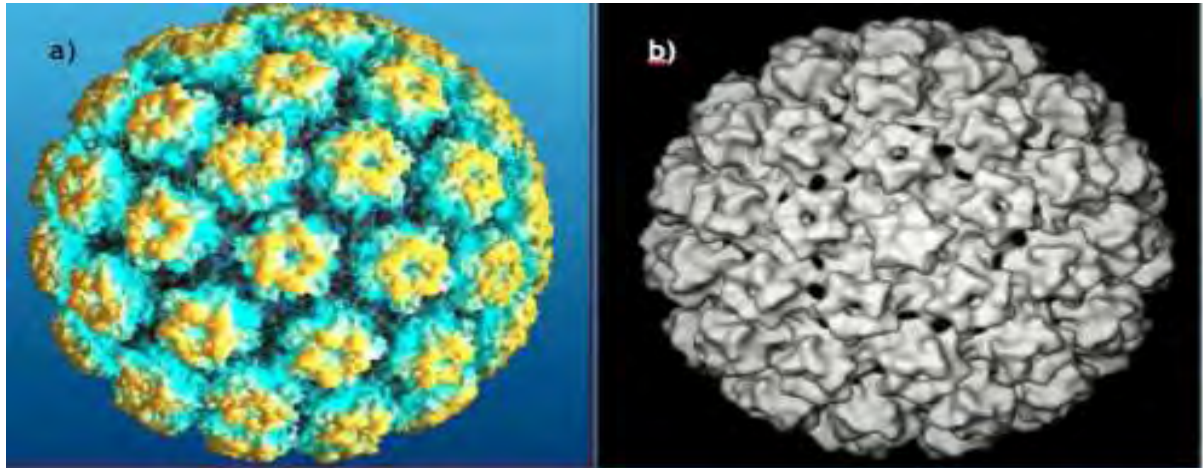
Οι papilloma ιοί αποτελούν μια ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών, έχουν σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 52-55nm. Χαρακτηρίζονται από την απουσία εξωτερικού περιβλήματος (φάκελος) ενώ περιβάλλονται εξωτερικά από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 2 κύριες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη L1 είναι το βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου και τα μολυσματικά ιϊκά σωματίδια περιέχουν 360 αντίγραφα της πρωτεΐνης αυτής που οργανώνονται σε 72 πενταμερικά καψομερή (Modis et al 2002). Τα καψομερή της πρωτεΐνης L1 συγκροτούν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με triangulation number T=7 (Baker et al 1991). Η πρωτεΐνη L2 αποτελεί το δεύτερο απαραίτητο συστατικό για το σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου, παράγεται σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με την L1 και τοποθετείται εσωτερικά του καψιδίου. Ο δομικός ρόλος της L2 σε σχέση με την L1 μέσα στα ιϊκά σωματίδια παραμένει άγνωστος, πιστεύεται όμως ότι μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της μπορεί να αλληλεπιδρά με κατάλοιπα στην κεντρική κοιλότητα των L1 πενταμερών (Finnen R.L et al 2003). Βασικός ρόλος της L2 είναι η συμβολή, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη E2, στο πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσυντιθέμενων ιϊκών

σωματιδίων (Buck C.B et al 2004). Επιπρόσθετα μία επικράτεια της L2 μπορεί να εκτίθεται στην επιφάνεια του καψιδίου, σχηματίζοντας έτσι έναν επίτοπο για την αναγνώριση από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή. Η περιοχή της L2 που εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά με έναν κυτταρικό υποδοχέα για να διευκολυνθεί η είσοδος των ιικών σωματιδίων εντός των κυττάρων (Kawana Y. et al 2001). Οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 είναι συντηρημένες μεταξύ διαφορετικών papilloma ιών και μαζί με τις E1 και E2 αποτελούν κύρια ιικά γονιδιακά προϊόντα που πιστεύεται ότι βρίσκονταν στους κοινούς προγόνους όλων των ζωικών στελεχών των papilloma ιών (M.Teraï et al 2002). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην μολυσματική ικανότητα των ιών (Moddis et al 2002, Trus B.L. et al 1997).

Η αδυναμία των HPV να σχηματίζουν καψίδια *in vitro* καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την κρυσταλλογραφία ακτίνων X καθώς και άλλες μεθόδους οπτικοποίησης. Συνεπώς λόγω αυτής της δυσκολίας δεν έχει αποσαφηνιστεί η πλήρης δομή T=7 του ιικού καψιδίου. Είναι παρόλα αυτά διαθέσιμη η δομή της μικρότερης δομικής μονάδας T=1 (εικόνα 2.1), η οποία έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει 12 L1 πενταμερή (Bishop B. 2007). Όσον αφορά την πλήρη δομή T=7, έχει γίνει ευρέως αποδεκτή η υποθετική δομή όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2:



Εικόνα 2.1: Δομή T=1 αποτελούμενη από 12 πενταμερή της L1

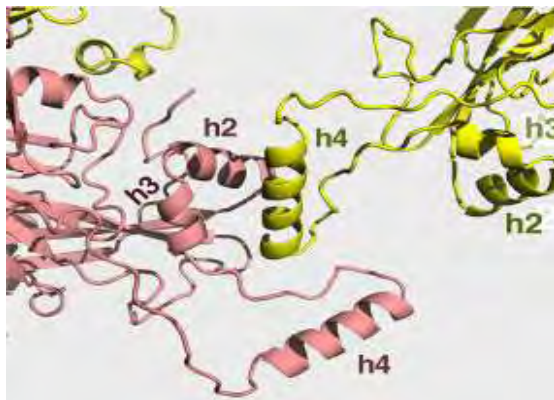


Εικόνα 2.2: Πλήρης δομή $T=7$ του καψιδίου του HPV. Διακρίνονται οι δομές των L1 πενταμερών (M.E Hagensee et al 1994, University of Bristol staff 2004)

Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής $T=1$ αποκαλύπτει τη δομή του L1 πενταμερούς καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών που είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση της δομικής μονάδας $T=1$. Τα πενταμερή L1 διαθέτουν 5 πλευρικές προεξοχές οι οποίες αποτελούνται περίπου από 100 κατάλοιπα του C-τελικού άκρου της L1 (εικόνα 2.3). Κάθε προεξοχή αποτελείται από μία α -έλικα που είναι «αγκυροβολημένη» στον πυρήνα της δομής του πενταμερούς μέσω 2 άλλων ελίκων, των h-2 και h-3 (εικόνα 2.4). Τα πενταμερή είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς μεταξύ της έλικας 4 του ενός πενταμερούς με την έλικα 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς (εικόνα 2.4). Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της L1 για να σχηματίσουν την έλικα 5 (Bishop B. et al 2007).



Εικόνα 2.3:(α) δομή την πρωτεΐνης L1(αριστερά). Διακρίνονται με διαφορετικά χρώματα οι έλικες h-2 και h-3 καθώς και η α-έλικα h-4 με την οποία οι 2 παραπάνω σχηματίζουν υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (β) Δομή του πενταμερούς L1(δεξιά). Η στενή σύνδεση των μονομερών πρωτεϊνών L1 προσδίδει στο πενταμερές το συγκεκριμένο σχήμα. Οι έλικες-2 και -3 αλληλεπιδρούν με την έλικα-4 γειτονικών πενταμερών, προκειμένου να δημιουργηθούν δια-πενταμερικοί δεσμοί. Μέσω των υδροφοβικών αυτών αλληλεπιδράσεων τα πενταμερή σχηματίζουν τη συνολική δομή του καψιδίου(Schadlich L. et al 2009)

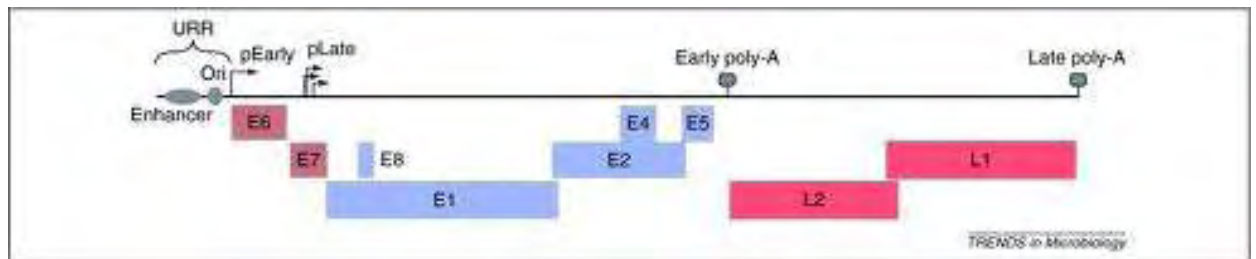


Εικόνα 2.4: Η δια-πενταμερής έλικα-έλικα αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πενταμερών στο T=1. Η έλικα 4 του ενός πενταμερούς (κίτρινο) αλληλεπιδρά με την έλικα 2 και 3 του άλλου.

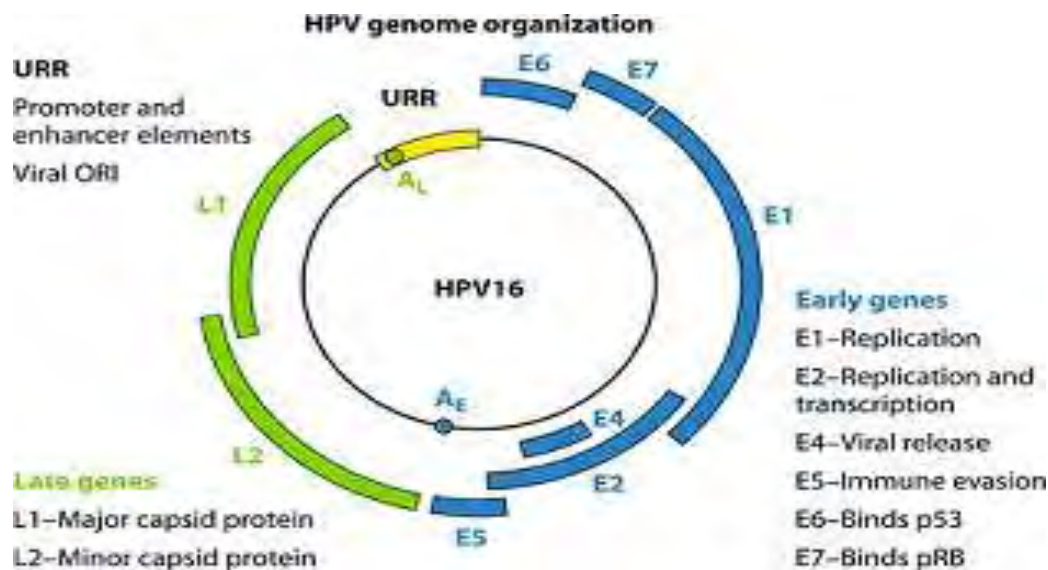
2.2 Οργάνωση του γενόματος των papilloma ιών

Όλοι οι papilloma ιοί περιέχουν ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA μεγέθους περίπου 8kb, το οποίο αντιγράφεται ως εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων. Το ιϊκό DNA είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες που μοιάζουν με ιστόνες και περιβάλλεται από 72 καψομερή. Το γένωμα των papilloma ιών αποτελείται από 8 βασικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης(ORFs), τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNAs που

μεταγράφονται από έναν κλώνο DNA, και μπορεί να διαχωριστεί σε 3 βασικές περιοχές βάσει των λειτουργικών δραστηριοτήτων: πρώιμη (E= Early region), όψιμη (L=late region) και μία περιοχή ελέγχου LCR ή URR (Upstream regulatory region). Οι 3 αυτές περιοχές σε όλους τους papilloma ιούς χωρίζονται από 2 θέσεις πολυαδενυλίωσης (pA): την πρώιμη (A_E) και την όψιμη (A_L).



Εικόνα 2.5: Οργάνωση του γενόματος των HPV σε γραμμική μορφή. Διακρίνονται ο πρώιμος υποκινητής (pEarly), ο εξαρτώμενος από τη διαφοροποίηση όψιμος υποκινητής (pLate) και 2 θέσεις πολυαδενυλίωσης (Early poly-A, Late poly-A).



Εικόνα 2.6: Δίκλωνο κυκλικό μόριο του HPV 16

Η πρώιμη περιοχή του γενόματος των papilloma ιών καταλαμβάνει πάνω από 50% του ιικού γενόματος. Περιλαμβάνει 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos et al 1982). Η όψιμη περιοχή όλων των papilloma ιών, που καταλαμβάνει περίπου το 40% του

ικού γενώματος, βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής. Περιλαμβάνει τα L1 και L2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα τις L1 και L2 όψιμες δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το καψίδιο του ιού. Τέλος η ρυθμιστική περιοχή LCR, ένα τμήμα περίπου 850 bp, δεν περιέχει ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης αλλά περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς επίσης πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που είναι απαραίτητοι στη ρύθμιση της μεταγραφής από τους πρώιμους και όψιμους υποκινητές του ιού (Bernard HU 2002). Το γένωμα του HPV16 ειδικότερα περιέχει δύο βασικούς υποκινητές: τον P97, που βρίσκεται ανοδικά του E6 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων σχεδόν των πρώιμων γονιδίων (Smotkin D., Wettstein FO. 1986) και τον P670 που βρίσκεται μέσα στην περιοχή του E7 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K. et al, 1996). Έχουν βρεθεί και περιγραφεί άλλοι δευτερεύοντες υποκινητές στις πρώιμες περιοχές του γενώματος, όμως οι δραστηριότητές τους στα πλαίσια του επισωμικού DNA γενώματος παραμένουν άγνωστες (Rosenstierne MW et al 2003).

2.2.1 Ίικη πρωτεΐνη E1

Τα πιο συντηρημένα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης μεταξύ των papilloma ιών είναι αυτά που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη E1. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, έχει μέγεθος περίπου 68 kDa και παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε HPV-θετικά κύτταρα. Παρουσιάζει ομολογία σε έναν αριθμό ιδιοτήτων με το μεγάλο T-αντιγόνου του SV40 (Seo, Y-S et al 1993, Sun S. et al 1990). Είναι απαραίτητη για την έναρξη της ιϊκής αντιγραφής και εμφανίζει δραστικότητα ATPάσης και 3'-5' ελικάσης.

Η E1 αναγνωρίζει και προσδέεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε AT στο σημείο έναρξης της αντιγραφής των HPV, οι οποίες βρίσκονται πολύ κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των πρώιμων ιϊκών γονιδίων (Frattini M.G.and L.A.Laimins 1994, Muller F.et al 1997). Η E1 μόνη της προσδέεται με χαμηλή συγγένεια στις αλληλουχίες που αναγνωρίζει. Η πρόσδεσή της διευκολύνεται από την πρωτεΐνη E2, με την οποία και αλληλεπιδρά σχηματίζοντας σύμπλοκο. Οι θέσεις πρόσδεσης της E2 είναι παρακείμενες των θέσεων αναγνώρισης της E1, επομένως η E2 δρα έτσι ώστε να συνδεθεί η E1 στο σημείο έναρξης. Από τη στιγμή της πρόσδεσης οι E1 πρωτεΐνες σχηματίζουν εξαμερή με υψηλή συγγένεια για το DNA (Sedman J.and A. Stenlund 1998). Τα εξαμερή της E1 δρουν σαν ελικάσες και ξετυλίγουν επιτυχώς το υπερελικωμένο DNA, καθώς αυτό διέρχεται διαμέσου του κέντρου του εξαμερικού δακτυλίου (Liu J.S et al 1998). Σε αυτό συμβάλλει και μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (chaperone proteins).

Οι πρωτεΐνες E1 αλληλεπιδρούν επίσης με την DNA πολυμεράση α και βοηθούν στη στρατολόγηση κυτταρικών αντιγραφικών συμπλόκων στην ιική θέση έναρξης της αντιγραφής. Στρατολογούν ακόμη σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, για να διαμορφωθεί η θέση του νουκλεοσώματος και να επιτραπεί η αποτελεσματική έναρξη της αντιγραφής (Swindle, C.S. and J.A. Engler 1998). Μία ακόμη σημαντική αλληλεπίδραση είναι αυτή της E1 με τις κυκλίνες A και D και αυτή μπορεί να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της E1. Η επικράτεια της E1 που προσδένεται στο DNA αποτελείται από μία εκτεταμένη θηλιά και μία α -έλικα που είναι σημαντικές για την αναγνώριση του DNA (Enemark E.J. et al 2000). Ακόμη η E1 περιλαμβάνει 4 θέσεις φωσφορυλίωσης κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, οι μεταλλάξεις των οποίων μπορούν να μειώσουν δραστικά την αντιγραφική δραστηριότητα της E1 (Ma, T. et al 1999).

2.2.2 Η Ιική πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 είναι απαραίτητη τόσο για την αντιγραφή του ιικού γενώματος όσο και για την ρύθμιση της μεταγραφής, έχει μέγεθος 50 kD και λειτουργεί ως διμερές (Laimins L.A. 1998). Διακρίνονται 3 περιοχές της E2: Η καρβοξυ-τελική, η οποία κωδικοποιεί μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA και σχηματίζει μία διμερή δομή β -βαρελίου (Hedge et al 1992), μία ενδιάμεση περιοχή η οποία ονομάζεται περιοχή-αρμός (hinge region) και η αμινο-τελική περιοχή, η οποία αποτελείται από μία α -έλικα πλούσια σε γλουταμίνη πακεταρισμένη σε ένα πλαίσιο β -πτυχωτού φύλλου (Antson et al 2000). Το C-τελικό άκρο αλληλεπιδρά με την E1 πρωτεΐνη ενώ το N-τελικό άκρο αποτελεί μία περιοχή ενεργοποίησης (Chen G. and A. Stenlund 2000).

Η πρωτεΐνη E2 διαδραματίζει διάφορους ρόλους κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης και στα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι απαραίτητη για την έναρξη της ιικής αντιγραφής και το διαχωρισμό του γενώματος. Στο DNA αναγνωρίζει και συνδέεται σε συντηρημένες παλινδρομικές αλληλουχίες (ACCN6GGT), που ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης της E2 (Laimins L.A. 1998). Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες περιοχές πρόσδεσης (E2BSs) εντός της ρυθμιστικής περιοχής (LCR) του ιικού γενώματος, ενώ τρεις από αυτές περιβάλλουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής (Howley P. M. 1996). Η πρόσδεσή της E2 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής, η οποία με τη σειρά της προσδένεται σε κυτταρικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA (Loo, Y. M. and Melendy, T. 2004, Han, Y. et al 1999). Ακολούθως η E2 αποσυνδέεται από τη θέση έναρξης, επιτρέποντας τη συναρμολόγηση διπλού εξαμερούς δακτυλίου από την E1.

Στα κύτταρα της βασικής στιβάδας το ιϊκό γένωμα αντιγράφεται μαζί με το κυτταρικό DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S και τα αντίγραφα που προκύπτουν μοιράζονται ισότιμα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Η E2 συμβάλλει στην πρόσδεση (αγκυροβόληση) των ιϊκών επισωμάτων στα μιτωτικά χρωμοσώματα, εξασφαλίζοντας έτσι το σωστό διαχωρισμό τους στα θυγατρικά κύτταρα (You, J. et al 2004).

Εκτός από το ρόλο της στην αντιγραφή και το διαχωρισμό του γενόματος, η E2 δρα επίσης ως ρυθμιστής της μεταγραφής. Ρυθμίζει τους πρώιμους ιϊκούς υποκινητές (p97 στον HPV-16, p99 στον HPV-31) και ελέγχει την έκφραση κυρίως των ιϊκών ογκογονιδίων E6 και E7, δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al., 1987). Ειδικότερα, Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται στις θέσεις αναγνώρισής της που βρίσκονται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Σε αυτή την περίπτωση οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger and Corbach, 1997). Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις η E2 προσδένεται σε θέσεις (E2BSs) οι οποίες επικαλύπτουν τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Sp1 και TFIID (Demeret et al., 1997; Dostatni et al., 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνδεσης των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων και συνεπώς την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων E6 και E7.

Επιπρόσθετα η E2 μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκο με τους C/EBP μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλούς υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση (Hadaschik D. et al 2003). Ακόμη υπερέκφραση της E2 μπορεί να επάγει την απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου της p53 (Dowhanick et al 1995).

2.2.3 Η ιϊκή πρωτεΐνη E4

Στα διαφοροποιούμενα επιθηλιακά κύτταρα, η πρωτεΐνη E4 (και η E5) εκφράζεται ως το πρώτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) των όψιμων μεταγράφων. Επομένως η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPV, ενώ παράλληλα παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τις υπόλοιπες ιϊκές πρωτεΐνες (Howley P.M. 1996). Το E4 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται από ματισμένα μετάγραφα συντηγμένο με τα 5 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης E1 και προκύπτει η E1^{E4} πρωτεΐνη σύντηξης. Αυτό συμβαίνει επειδή απουσιάζει το κωδικόνιο έναρξης AUG από το E4 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, χρησιμοποιείται επομένως η αλληλουχία του E1 προκειμένου να ξεκινήσει η μετάφραση (Howley P.M. 1996). Όλοι οι papilloma ιοί

εκφράζουν τις E1^{E4} πρωτεΐνες στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής τους, εμφανίζουν όμως περιορισμένη ομολογία ως προς την αλληλουχία.

Στην πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV-16 διακρίνονται τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με ένα μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL), η κεντρική περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη και η C-τελική περιοχή (Roberts et al 1994). Έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη E1^{E4} διευκολύνει την έξοδο των νεοσχηματισμένων ιικών σωματιδίων από τα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει καθώς η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα κύτταρα και μπορεί να επάγει (κυρίως σε περίπτωση υπερέκφρασής της) την κατάρρευση/καταστροφή του δικτύου και επομένως την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων (Doorbar J. et al 1991). Πιο συγκεκριμένα το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του (Roberts et al 1994).

Έχει ακόμη αποδειχτεί ότι υπερέκφραση της E1^{E4} σε πολλούς HPV τύπους, όπως ο HPV-11 και ο HPV-16, μπορεί να επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 σε διάφορους τύπους κυττάρων (Davy C.E et al 2002). Δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος της επαγόμενης αυτής παύσης του κυτταρικού κύκλου στον κύκλο ζωής του ιού. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι συμβαίνει προκειμένου να εξισορροπηθούν οι επιδράσεις της E7 ογκοπρωτεΐνης, η οποία ωθεί τα κύτταρα στη φάση S και επομένως προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Chang, Y.E. and L.A.Laimins 2000, Flores E. et al 2000).

Η E1^{E4} αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της αντιγραφής του ιικού γενόματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού (Wilson R et al 2005) αν και άλλες μελέτες αναφέρουν την E1^{E2} ως ρυθμιστή της όψιμης και της πρώιμης φάσης της ζωής των HPV. Παρόλα αυτά όμως η λειτουργία της E1^{E4} μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών (Fang L et al 2006).

Η E4 πρωτεΐνες των HPV υψηλού κινδύνου μπορεί επίσης να συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς αλληλεπιδρούν με μία RNA-ελικάση, E4-DBD, η οποία είναι μέλος μιας οικογένειας ελικασών που εμπλέκονται στο μάτισμα του mRNA, τη μεταφορά καθώς και την έναρξη της μετάφρασης (Yoshioka N. et al 2000). Ακόμη, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι E4 πρωτεΐνες των HPV-16 και HPV-18 μπορούν να συνδέονται με την E2, προτείνοντας έτσι ένα νέο μηχανισμό μέσω του οποίου μπορεί να δρα η πρωτεΐνη αυτή (Sorathia R. et al 2004). Τέλος η E1^{E4} πρωτεΐνη του HPV-16 έχει την δυνατότητα να επάγει την απόπτωση καθώς έχει μελετηθεί η σύνδεση και αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια (Raj et al 2004).

2.2.4 Η ιϊκή πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 83 αμινοξέα, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στο σύμπλεγμα Golgi αλλά περιστασιακά συναντάται και στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et al 1993). Στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών, η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et al 1986). Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με την ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών (BVP) και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά.

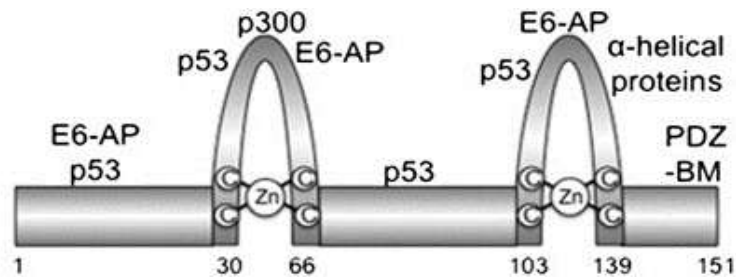
Η πρωτεΐνη E5 μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ATPάση και να καθυστερήσει τη διαδικασία οξύνισης στα ενδοσώματα (G.L. Disbrow et al 2005, E.S. Hwang et al 1995, S.W.Straight et al 1995), η οποία επηρεάζει την ανακύκλωση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια του επιθηλίου. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της διαμεσολαβούμενης από τον EGF σηματοδότησης, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει (μαζί με τις πρωτεΐνες E6 και E7) στην διατήρηση ενός περιβάλλοντος ικανού για αντιγραφή κατά τη διάρκεια ενίσχυσης του γενώματος (K.Crusius et al 2000).

Η E5 είναι πιθανό να εκφράζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης του κύκλου ζωής του ιού στα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV-31 η E5 έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει μόνο σε ελάχιστο βαθμό τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του υποδοχέα του EGF τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrmman et al 2003). Επιπρόσθετα, απώλεια της E5 είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη ενεργοποίηση των όψιμων ιϊκών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε αυτή την κατηγορία κυττάρων (Flores E.R et al 2000). Τέλος, πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al 2006).

2.2.5 Η ιϊκή πρωτεΐνη E6

Οι E6 πρωτεΐνες τόσο των ιών υψηλού όσο των ιών χαμηλού κινδύνου έχουν μέγεθος περίπου 150 αμινοξέα και περιέχουν δύο περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Η E6 των ιών υψηλού κινδύνου κατανέμεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο

κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων και έχει αναφερθεί ότι προσδένεται σε περισσότερες από 12 διαφορετικές πρωτεΐνες (Zur Hausen H. 2002).

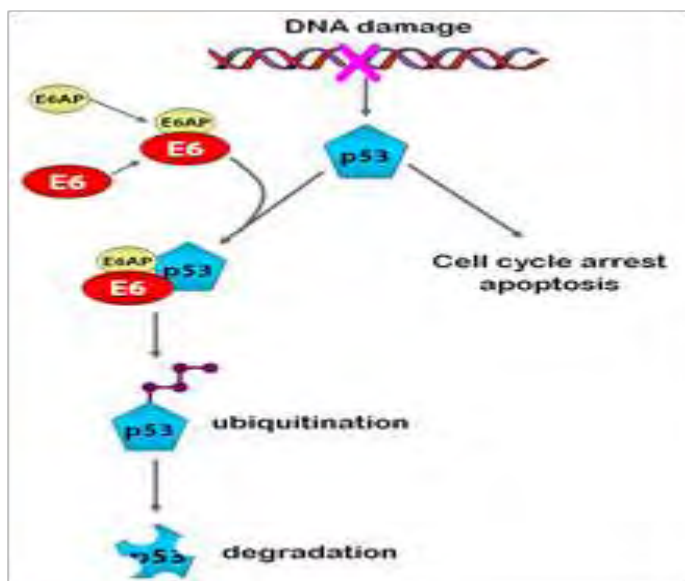


Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης E6 του HPV-16. Διακρίνονται οι 2 περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου

Η E6 πρωτεΐνη συμπληρώνει τη λειτουργία της E7. Οι δύο πρωτεΐνες προκαλούν αθανασία και εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων και στους τύπους HPV υψηλού κινδύνου εκφράζονται μαζί από ένα πολυκιστρονικό mRNA (Stacey S.N. et al 2000). Η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής από μόνη της οδηγεί στο μετασχηματισμό NIH 3T3 κυττάρων καθώς επίσης και στην αθανασία ανθρώπινων μαστικών κυττάρων (Kiyono, T., et al 1998, Liu, Y., et al 1999). Όμως η αποτελεσματική αθανασία ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την έκφραση και των δύο πρωτεϊνών E6 και E7 (Hawley-Nelson et al. 1989).

Ένας πρωταρχικός ρόλος της πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την p53. Η p53, προϊόν του αντίστοιχου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, είναι ένας πολύ καλά χαρακτηρισμένος καταστολέας όγκων. Ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης, p21. Μετά από έκθεση σε βλάβες του DNA ή σε άλλους στρεσογόνους παράγοντες για το κύτταρο, η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση υψηλών επιπέδων του παράγοντα p21, με αποτέλεσμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου προκειμένου το κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες. Σε περίπτωση αδυναμίας επιδιόρθωσης των βλαβών, η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Ko, L and C. Prives 1996). Η ενεργοποίηση του αποπτωτικού αυτού μονοπατιού είναι ένας τρόπος με τον οποίο πολλές φορές τα προσβεβλημένα από HPV κύτταρα εμποδίζουν την εξάπλωση των ιών στα γειτονικά κύτταρα. Στην περίπτωση της μόλυνσης από HPV, η ιϊκή πρωτεΐνη E6 συνδέεται στην p53 σε ένα τριμερές σύμπλοκο με μία ουβικουιτινική λιγάση που ονομάζεται E6AP, προκειμένου να παρεμποδίσει τη δράση της p53 και να επιτραπεί η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Huibregtse, J. M. et al 1991). Ειδικότερα ο σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουιτινίωση της p53 και κατά συνέπεια την αποδόμησή της από το πρωτεάσωμα 26S, μειώνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής της στα κερατινοκύτταρα από μερικές ώρες σε

λιγότερο από 20 λεπτά (Hubbert, N. L. et al 1992, Huibregtse, J. M. et al 1993). Εφόσον η p53 ρυθμίζει τόσο το σημείο ελέγχου G1/S όσο και το G2/M του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή της δράσης της έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση του ελέγχου αυτού που οδηγεί σε χρωμοσωμικούς διπλασιασμούς και ανωμαλίες των κεντροσωμάτων (Foster, S. A et al 1994, Kesis, T. D. et al 1993, Thomson, D. A. et al 1997). Η E6 μπορεί επίσης να μειώσει έμμεσα τη δράση της p53 μέσω της σύνδεσής με την p300/CBP, συνενεργοποιητή της p53 (Lechner, M. S. and L. A. Laimins 1994, Meyerson, M., et al 1997).



Εικόνα 2.7: Αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 μέσω της δράσης της E6 των HPV

Μία ακόμη σημαντική λειτουργία της E6 που είναι απαραίτητη για την αθανασία των κυττάρων είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών PDZ. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν μια συντηρημένη περιοχή η οποία συνδέεται με τις πρωτεΐνες PSD-95, Dlg και ZO-1. Η επικράτεια PDZ συναντάται συνήθως σε πρωτεΐνες που βρίσκονται σε περιοχές κυτταρικής επαφής, όπως οι στεγανοί σύνδεσμοι στα επιθηλιακά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες PDZ δρουν πιθανόν ως μοριακά κριώματα στη μεταγωγή σήματος (Craven, S. E. and D. S. Bredt 1998, Gomperts, S. N. 1996). Τα μέλη αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών συνδέονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου, με αποτέλεσμα την αποδόμησή τους. Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης επιβεβαιώθηκε σε πειράματα με ποντίκια, τα οποία εξέφραζαν την E6 χωρίς την περιοχή πρόσδεσης στην PDZ. Διαπιστώθηκε ότι τα ποντίκια αυτά δεν ανέπτυσαν επιδερμική υπερπλασία όπως συνέβαινε στα ποντίκια άγριου τύπου (Nguyen, M. L. et al 2003).



Εικόνα 2.8: Διαμεσολαβούμενη από την E6 των HPV υψηλού κινδύνου αποδόμηση των PDZ πρωτεϊνών

Τέλος, μία ακόμη βασική λειτουργία των E6 πρωτεϊνών υψηλού κινδύνου είναι η ικανότητά τους να ενεργοποιούν την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, hTERT (Masterson, P.J. et al 1998). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο τεσσάρων υπομονάδων, το οποίο προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων. Η δράση της απουσιάζει από τα σωματικά κύτταρα και η έλλειψή της συνεπάγεται τη βράχυνση των τελομερών με τις συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα τη γήρανση και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Στους περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου επανενεργοποιείται η έκφραση της hTERT και ανακτάται η τελομερική δραστηριότητα (Liu, J. P., 1999). Η E6 ενεργοποιεί την μεταγραφή της hTERT μέσω της συνδυαστικής δράσης του Myc και του Sp-1 (Greenberg, R. A. et al 1999). Μελέτες έχουν δείξει ότι η E6 μπορεί να προσδεθεί στο Myc και τον συμπαράγοντα Max οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της hTERT (Veldman, T., et al 2003). Η συνεχής αυτή ενεργοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την διατήρηση των τελομερικών άκρων κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων και συνεπώς την αναστολή της γήρανσης και την αθανασία των κυττάρων (Artandi S.E et al 2005).

2.2.6 Η ιϊκή πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι η δεύτερη HPV ογκοπρωτεΐνη που είναι απαραίτητη τόσο για την αθανασία των κυττάρων όσο και για την ιϊκή παθογένεια. Οι E7 πρωτεΐνες των τύπων HPV υψηλού και χαμηλού κινδύνου βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και έχει μέγεθος περίπου 100 αμινοξέα. Η βαθύτερη γνώση για τη δράση της προήλθε αρχικά από τη διαπίστωση ότι εμφανίζει λειτουργικές ομοιότητες με το προϊόν του γονιδίου 12S E1A του αδενοϊού. Εκτός από τις λειτουργικές αυτές ομοιότητες, η E7 του HPV-16 εμφανίζει ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία με τμήματα των AdE1A πρωτεϊνών και του μεγάλου T αντιγόνου του SV40. Κεντρικός ρόλος της E7 πρωτεΐνης είναι η ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Dyson, N. et al 1989), η οποία περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Rb, p107 και p130. Όλες οι πρωτεΐνες E7 των τύπων υψηλού

κινδύνου περιλαμβάνουν 3 συντηρημένες περιοχές, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η σύνδεση των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος: την περιοχή CR1 στο N-τελικό άκρο, την CR2 που περιέχει ένα μοτίβο LXCXE το οποίο συμβάλει στην πρόσδεσή της με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και τέλος την περιοχή CR3 που αποτελείται από 2 μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Οι περιοχές CR1 και CR2 εμφανίζουν ομολογία ως προς την αλληλουχία με τις αντίστοιχες περιοχές της E1A του αδενοϊού, οι οποίες προσδέονται επίσης στις πρωτεΐνες Rb (Phelps, W. C. et al 1988).

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η πρωτεΐνη Rb μπορεί να βρίσκεται είτε σε φωσφορυλιωμένη είτε σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή. Η αποφωσφορυλιωμένη της μορφή σχηματίζει σύμπλοκα με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1, οι οποίοι συνδέονται στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην εξέλιξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου ή στην απόπτωση, οδηγώντας τελικά στην καταστολή της μεταγραφής (Edmons, C., and K. H. Vousden 1989, Weintraub, S. J. et al 1995). Κατά την εξέλιξη από τη G1 στη φάση S σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την Rb, με αποτέλεσμα αυτή να απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα των μεταγραφικών παραγόντων E2F/DP1 και να πραγματοποιείται κανονικά η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA. Η E7 προσδέεται στην Rb απομακρύνοντάς την από το σύμπλοκο E2F/DP1, με συνέπεια την ενεργοποίησή του και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων (Edmonds C. and K. H. Vousden 1989, Weintraub, S. J. et al 1995). Η E7 μεσολαβεί επίσης στην αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουιτινικού πρωτεοσώματος (Wang, J. et al 2001). Συνεπώς τα επίπεδά της μειώνονται σημαντικά στα κύτταρα που εκφράζουν την E7, γεγονός που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Εκτός από την πρόσδεσή της στα μέλη της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος, η E7 πρωτεΐνη συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Οι κινάσες και οι αντίστοιχες κυκλίνες προωθούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη Rb και η E7 με την πρόσδεσή της ενισχύει τη δράση των πρωτεϊνών αυτών. Ειδικότερα οι πρωτεΐνες E7 υψηλού κινδύνου αυξάνουν τα επίπεδα των κυκλινών A και E επάγοντας με τον τρόπο αυτό την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ οι αντίστοιχες πρωτεΐνες χαμηλού κινδύνου δεν έχουν την ίδια δράση (Martin, L. G. et al 1998). Η E7 προσδέεται επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στους αναστολείς των cdks p21 και p27 εμποδίζοντας έτσι τη δράση τους και ενισχύοντας περισσότερο τη δράση των cdks (Funk, J. O. et al 1997).

Μία ακόμη ομάδα πρωτεϊνών στις οποίες συνδέονται οι E7 υψηλού κινδύνου είναι οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Οι HDACs δρουν μαζί με την Rb για την καταστολή των επαγόμενων από τον E2F υποκινητών (Brehm, A. et al 1998). Πιο συγκεκριμένα σε κύτταρα αρνητικά για HPV η πρωτεΐνη Rb συνδέεται στις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές που επάγονται από τον παράγοντα E2F, αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή. Οι αποακετυλάσες των ιστονών εκφράζονται γενικά σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η απομάκρυνση των ακετυλομάδων από τις πλούσιες σε λυσίνη αμινοτελικές ουρές των ιστονών που συγκροτούν το νουκλεόσωμα. Οι HDACs μπορούν επίσης να απακετυλιώσουν απευθείας τους παράγοντες E2F, με αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας τους (Marks, P. et al 2001). Όσον αφορά την πρωτεΐνη E7, αυτή συνδέεται στις HDACs ανεξάρτητα από την πρόσδεσή της στην Rb, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για το ρόλο της E7 στην αθανασία των κυττάρων και στη διατήρηση του επισώματος (Longworth, M.S. and L. A. Laimins 2004)

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

Πίνακας 2.1: Αναφορά των πρωτεϊνών των ιών HPVs

3. Κύκλος ζωής των HPV

3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Όλοι οι papilloma ιοί, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, πρέπει να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους στον επιθηλιακό ιστό που προσβάλλουν και να παράγουν μολυσματικά σωματίδια τα οποία τελικά θα απελευθερωθούν από την επιφάνεια του επιθηλίου. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται η έγκαιρη και συντονισμένη έκφραση των διαφορετικών γονιδιακών προϊόντων καθώς το προσβεβλημένο κύτταρο μεταναστεύει προς την επιφάνεια του επιθηλίου. Αυτό το αυστηρά ρυθμιζόμενο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης επιτρέπει την ολοκλήρωση των διαφορετικών σταδίων του κύκλου ζωής του ιού. Ο κύκλος ζωής των HPV είναι συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή ενώ η παραγωγή των ώριμων ιικών σωματιδίων περιορίζεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων.

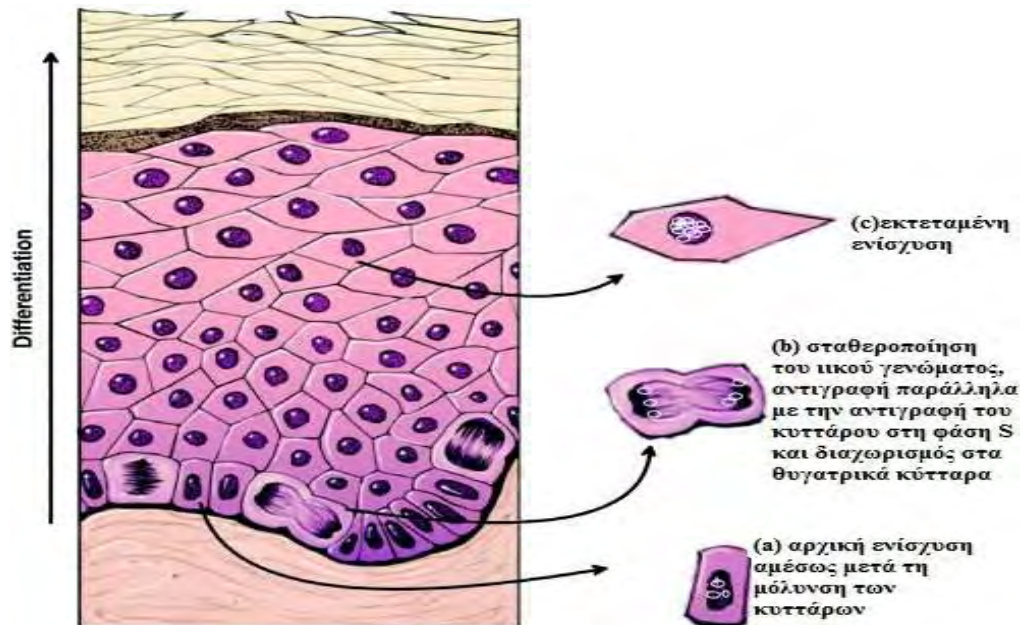
Η μόλυνση από τους papilloma ιούς ξεκινάει όταν τα ιικά σωματίδια αποκτούν πρόσβαση στην βασική στιβάδα του επιθηλίου, η οποία αποτελείται από μιτωτικά ενεργά κύτταρα. Στις περισσότερες θέσεις του επιθηλίου η πρόσβαση στα κύτταρα της βασικής στιβάδας απαιτεί τη διακοπή της ακεραιότητας του επιθηλίου. Αυτό προϋποθέτει την παρουσία μικροτραυματισμών ή περισσότερο εμφανών βλαβών στην επιθηλιακή στιβάδα. Παρόλα αυτά πολλοί papilloma ιοί προσβάλλουν σημεία όπου η πρόσβαση στη βασική στιβάδα διευκολύνεται φυσικά, όπως για παράδειγμα οι ρίζες των τριχών ή η μεταβατική ζώνη στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας. Ο ιός εισέρχεται εντός των κυττάρων της βασικής στιβάδας μέσω σύνδεσής του με την θειϊκή ηπαρίνη, η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών της κυτταρικής μεμβράνης (Shafti Keramat S et al 2003). Όπως και σε άλλους ιούς, η μόλυνση από HPV φαίνεται ότι απαιτεί την παρουσία δευτερογενών υποδοχέων και αυτό το ρόλο έχει προταθεί ότι διαδραματίζει η α6-ιντεγκρίνη (Yoon Cs et al 2001). Η λαμινίνη-5 μπορεί ακόμα να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp TD et al 2006).

Μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, ο ιός εισέρχεται εντός του κυττάρου. Η είσοδος των προσδεμένων ιικών σωματιδίων είναι μια πολύ αργή διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει ώρες και πραγματοποιείται μέσω ενδοκύττωσης σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης ανάλογα με τον ιικό τύπο. Για παράδειγμα η ενδοκύττωση του HPV16 συμβαίνει μέσω των κυστιδίων κλαθρίνης ενώ ο HPV31 εισέρχεται με κυστίδια καβεολίνης (Day P.M. et al 2004). Τα σωματίδια των papilloma ιών αποσυναρμολογούνται στα όψιμα

ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και η διαδικασία αυτή μπορεί να διευκολύνεται από την διάσπαση των ενδοκαψομερικών δισουλφιδικών δεσμών στο αναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου (Li et al 1998). Επιτρέπεται έτσι η μεταφορά του ιϊκού DNA στον πυρήνα, διαδικασία που πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης L2 (Day P.M. et al 2004).

3.2 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης το γένωμα των HPV έχει παρατηρηθεί ότι αντιγράφεται σε 3 διαφορετικές φάσεις και με διαφορετική συχνότητα στην κάθε μία. Η πρώτη φάση αντιγραφής έχει προταθεί ότι πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας μολύνονται από τον ιό. Η μόλυνση οδηγεί στην ενεργοποίηση της έκφρασης ενός καταρράκτη ιϊκών γονιδίων, με αποτέλεσμα μια πρώτη εκτεταμένη ενίσχυση του ιϊκού γενώματος και παραγωγή 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο που έχει μολυνθεί (Fields et al 1996). Αυτός ο αριθμός αντιγράφων διατηρείται σταθερός στα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στιβάδας σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας της μόλυνσης. Στη φάση αυτή το ιϊκό γένωμα παραμένει στον πυρήνα σε επισωμική μορφή. Έχει παρατηρηθεί γενικά ότι το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να βρίσκεται είτε σε μορφή επισώματος είτε ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται συνήθως μέσω διάρρηξης της συνέχειας του γονιδίου E2. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιϊκού γενώματος συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στιβάδας στη φάση S. Σε αυτή τη φάση το DNA του ιού αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας σε κάθε κύκλο αντιγραφής 2 αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Τέλος, η τρίτη φάση αντιγραφής του ιϊκού γενώματος λαμβάνει χώρα στα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων που έχουν μολυνθεί από τον ιό. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιϊκού γενώματος με σκοπό τη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων ιϊκού DNA που θα εισέλθουν στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια (Hoffmann R et al 2006). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται οι 3 φάσεις αντιγραφής του ιϊκού γενώματος:



Εικόνα 3.1: α) Πρώτη ενίσχυση του ιικού γενώματος γίνεται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, με την παραγωγή 50-400 αντιγράφων του σε κάθε κύτταρο β) Σταθεροποίηση του ιικού γενώματος και αντιγραφή του παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S γ) Παρατεταμένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων με στόχο την παραγωγή πολυάριθμων μορίων ιικού DNA για την σύνθεση νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων.

Μεταξύ των πρώτων πρωτεϊνών που εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση είναι οι παράγοντες αντιγραφής E1 και E2. Οι πρωτεΐνες αυτές δημιουργούν ένα σύμπλοκο στη θέση έναρξης της αντιγραφής το οποίο στρατολογεί κυτταρικές πολυμεράσες και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες προκειμένου να ξεκινήσει η αντιγραφή (Conger K.L. et al 1999). Η E1, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, έχει επίσης δράση ελικάσης επιτρέποντας το διαχωρισμό των κλώνων του DNA μπροστά από το σύμπλοκο της αντιγραφής (Hughes F.J. and M.A. Romanos 1993). Η E2, εκτός του ότι βοηθάει στη στρατολόγηση της E1, συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της ιϊκής μεταγραφής από τον πρώιμο υποκινητή (Stubenrauch, F et al 1998). Σε χαμηλά επίπεδα η E2 ενεργοποιεί τον πρώιμο υποκινητή ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις τον καταστέλλει εμποδίζοντας την πρόσδεση κυτταρικών παραγόντων μεταγραφής (Steger, G., and S. Corbach. 1997). Οι E1 και E2 παράγοντες αντιγραφής ρυθμίζονται επίσης από τον πρώιμο υποκινητή, συνεπώς η ικανότητα της E2 να ενεργοποιεί και να καταστέλλει την έκφραση συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των ιικών αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα.

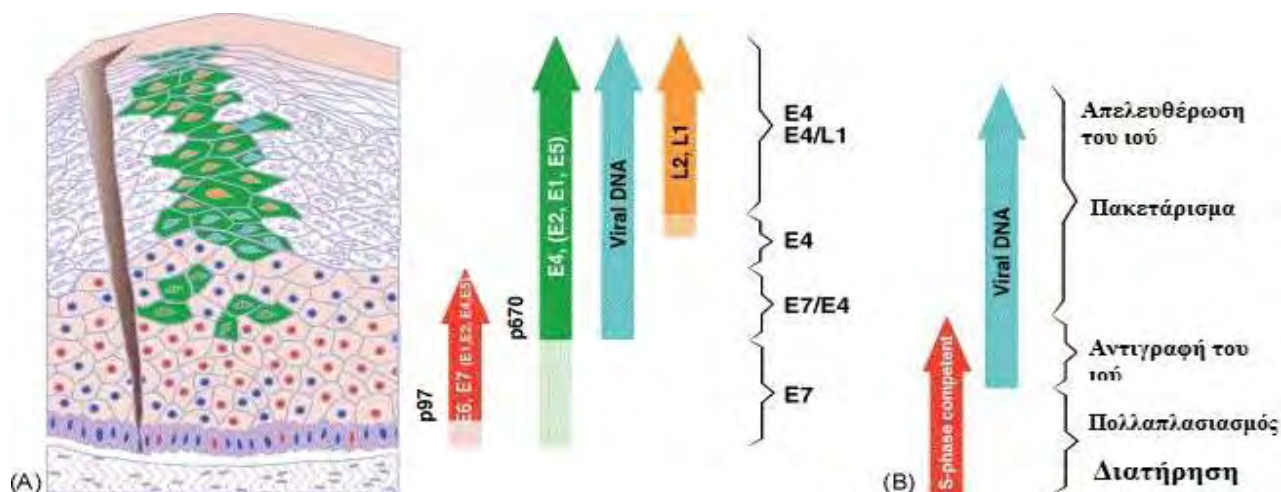
Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιϊκού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και

E7, οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου και τελικά την ανάπτυξη καρκίνου.

3.3 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Όσον αφορά τη μεταγραφή και έκφραση των ιικών γονιδίων, στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1,E2,E4,E5,E6 και E7) από την πρόιμη περιοχή του ιικού γενώματος. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων αυτών βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τους HPV-16 και HPV-31, p105 για τον HPV-18). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων.

Στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων (Grassmann K et al. 1996).



Εικόνα 3.2: Συνοπτική απεικόνιση της έκφρασης των ιικών γονιδίων. Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1,E2, E4,E5, E6,E7 εκφράζονται αμέσως μετά τη μόλυνση των κυττάρων της βασικής στιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97(κόκκινο βέλος). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1,E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E6,E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1 και L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων

αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος). Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο βέλος).

3.4 Σύνθεση των ικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

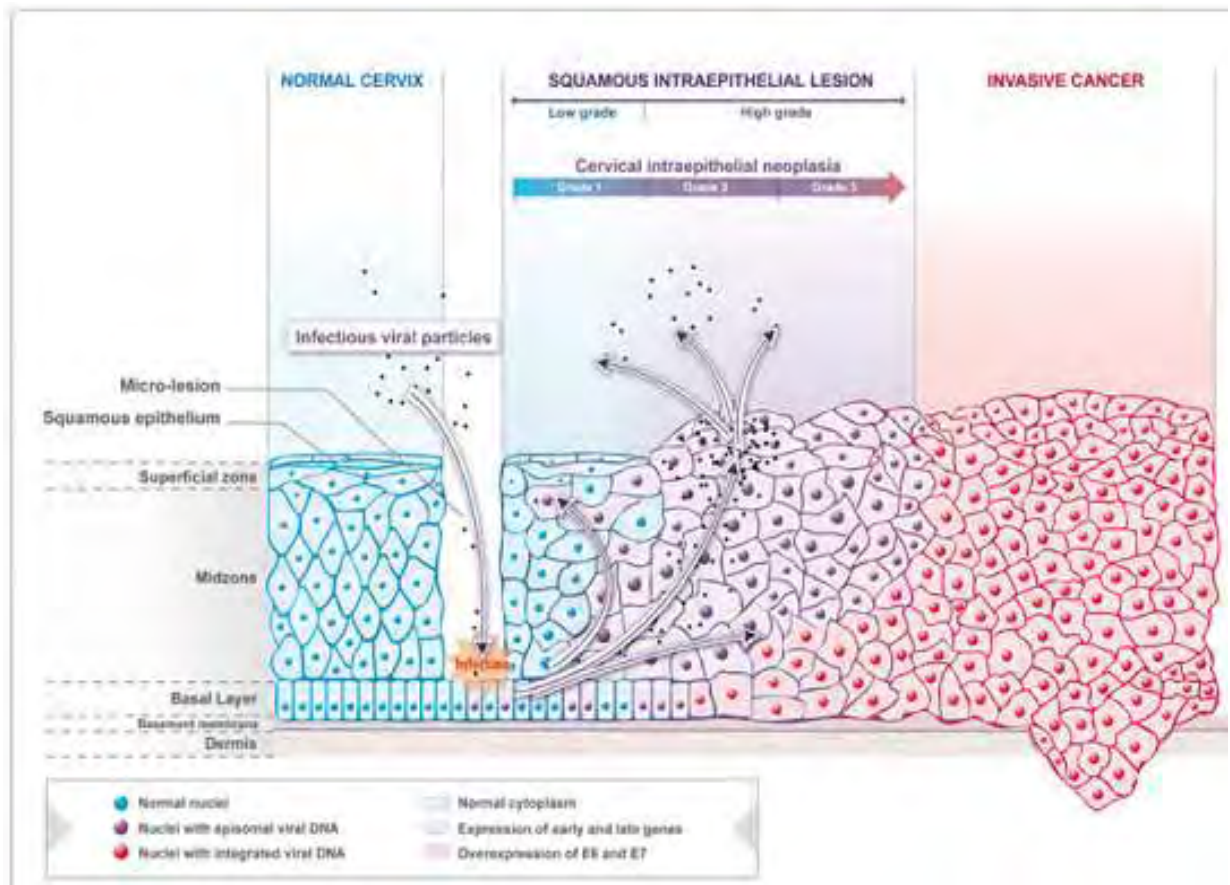
Στο τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των papilloma ιών πραγματοποιείται η σύνθεση των ικών καψιδίων και η ενσωμάτωση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος εντός των νεοσυντιθέμενων καψιδίων. Σχηματίζονται έτσι τα ολοκληρωμένα ιϊκά σωματίδια τα οποία τελικά απελευθερώνονται από τα κύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στιβάδας. Οι papilloma ιοί κωδικοποιούν δύο δομικές πρωτεΐνες, τις L1 και L2, οι οποίες εκφράζονται στις ανώτερες στιβάδες του μολυσμένου ιστού όταν έχει ολοκληρωθεί η ενίσχυση του ιικού γενώματος (Ozburn and Mayers 1998). Η βασική καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εκφράζεται μετά την L2 επιτρέποντας τη συγκρότηση των μολυσματικών σωματιδίων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (Florin et al 2002). Η συγκρότηση των μολυσματικών ικών σωματιδίων πιστεύεται ότι απαιτεί επίσης την πρωτεΐνη E2 εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, καθώς η E2 βοηθάει στην αποτελεσματική εισαγωγή των ικών γενωμάτων στα νεοσυντιθέμενα καψίδια (Zhao K. N. et al 2000, Buck C.B. et al 2004). Η πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα και εκεί αλληλεπιδρά με δομές που είναι γνωστές ως σωματίδια PML. Παρόλο που οι πρωτεΐνες L2 ορισμένων papilloma ιών μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με το DNA, η στρατολόγηση των ικών γενωμάτων στα σωματίδια PML πιθανόν να απαιτεί την E2 πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με το DNA μέσω των ειδικών θέσεων αναγνώρισής της. Η L1 συναρμολογείται σε καψομερή στο κυτταρόπλασμα πριν από τη μεταφορά της στον πυρήνα και στρατολογείται στα σωματίδια PML μόνο αφού η L2 έχει προσδεθεί (Florin L. et al 2002). Αν και τα σωματίδια των papilloma ιών μπορούν να συγκροτηθούν απουσία της πρωτεΐνης L2, η παρουσία της πιστεύεται ότι συμβάλλει στο αποτελεσματικό πακετάρισμα και ενισχύει τη μολυσματικότητα των ιών (Roden et al 2001).

Προκειμένου να είναι αποτελεσματικός ένας ιός πρέπει τελικά να απελευθερωθεί από τα μολυσμένα κύτταρα και να καταφέρει να επιβιώσει έξω από το περιβάλλον του κυττάρου μέχρι την επόμενη μόλυνση. Η επιβίωσή τους έξω από το κύτταρο μπορεί να ενισχύεται εάν απελευθερώνονται από την επιφάνεια του επιθηλίου προστατευμένοι μέσα σε ένα κερατινοποιημένο κάλυμμα (Bryan and Brown 2001). Οι papilloma ιοί δεν είναι λυτικοί και δεν απελευθερώνονται έως ότου τα μολυσμένα κύτταρα φτάσουν την επιφάνεια του επιθηλίου. Ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσής τους από τα μολυσμένα κύτταρα δεν είναι

γνωστός, πιστεύεται όμως ότι στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^{E4}. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, και το καταστρέφει με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων από το κύτταρο (Roberts S. et al 1997).

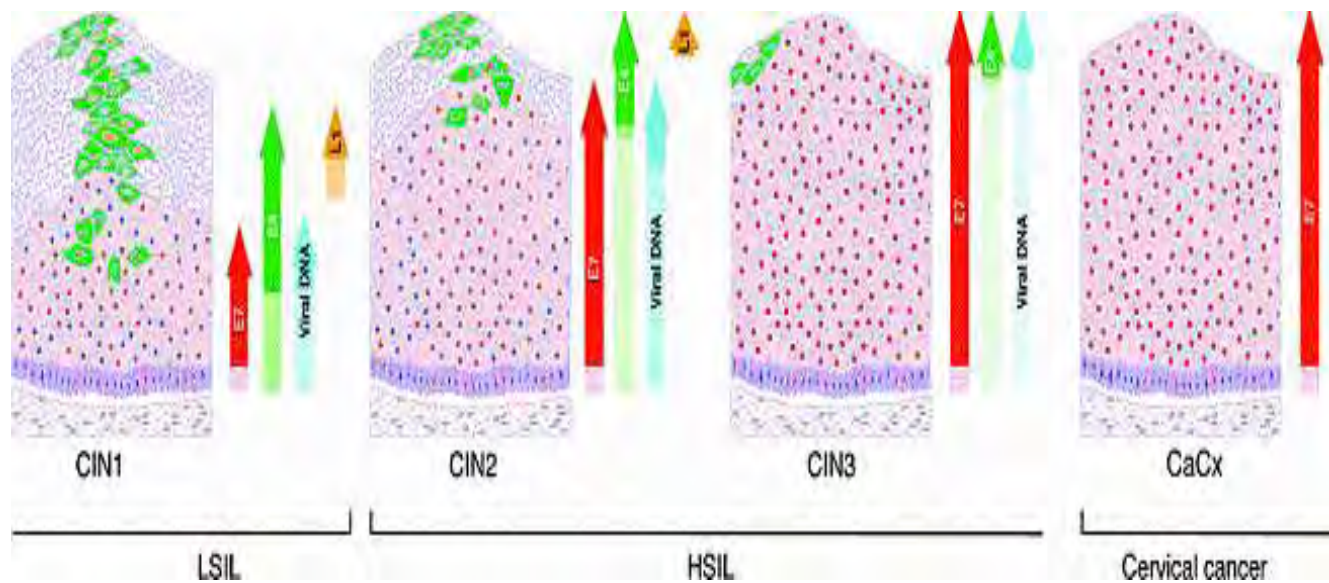
3.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι πρόδρομες καταστάσεις του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν αναγνωριστεί εδώ και πολλά χρόνια και ταξινομούνται ως τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες ποικίλου βαθμού (CIN). Οι αρχικές χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A et al 2005) και τα κύτταρα τα οποία οδηγούνται σε κυτταρικό κύκλο περιορίζονται στις κατώτερες επιθηλιακές στιβάδες (εικόνα 3.5). Οι μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN2 και CIN3, χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου ενώ στις CIN3 αλλοιώσεις διαιρούμενα κύτταρα ανιχνεύονται και στην επιφάνεια του επιθηλίου. Τέτοιου είδους αλλοιώσεις εκπροσωπούν ανεπιτυχείς/μη παραγωγικές μολύνσεις στις οποίες η ιϊκή γονιδιακή έκφραση δεν ρυθμίζεται σωστά και δεν υποστηρίζονται τα όψιμα γεγονότα του κύκλου ζωής του ιού. Η μετάπτωση σε δυσπλασίες CIN2 και CIN3 και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με την μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Όμως από μόνη της η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A. et al 2003).



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση των αλλοιώσεων του επιθηλίου

Τα μοριακά γεγονότα που οδηγούν την εξέλιξη μιας παραγωγικής μόλυνσης σε νεοπλασία και τελικά σε καρκίνο δεν είναι πλήρως κατανοητά, φαίνεται όμως να αντανακλούν αλλαγές στην ιϊκή γονιδιακή έκφραση και ειδικότερα αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών E6 και E7 (M. von Knebel Doeberitz 2002). Οι διάφορες φάσεις του κύκλου ζωής του ιού (κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενίσχυση του γενώματος και σύνθεση των ικών σωματιδίων) φαίνεται ότι αλλάζουν με διατεταγμένο τρόπο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης σε υψηλού βαθμού νεοπλασία ενώ αυξάνεται σταδιακά με τη σοβαρότητα της ασθένειας το πλάτος της στιβάδας στην οποία εκφράζεται η πρωτεΐνη E7 (K. Middleton et al 2003). Η απορρύθμιση της έκφρασης των πρώιμων γονιδίων συνοδεύεται από την αποτυχία έναρξης των όψιμων γεγονότων του κύκλου ζωής του ιού έως ότου τα κύτταρα φτάσουν κοντά στην επιφάνεια του επιθηλίου και στις αλλοιώσεις CIN3 η ενίσχυση του γενώματος συνήθως περιορίζεται σε μικρές περιοχές στην επιφάνεια του επιθηλίου. Αλλαγές στο χρόνο της έκφρασης των γονιδίων συνοδεύονται από αλλαγές στα επίπεδα των ικών πρωτεϊνών και το γεγονός αυτό μπορεί να έχει επίδραση στον καθορισμό του βαθμού της αλλοίωσης. Όσα περιγράφονται παραπάνω απεικονίζονται στην εικόνα 3.4.

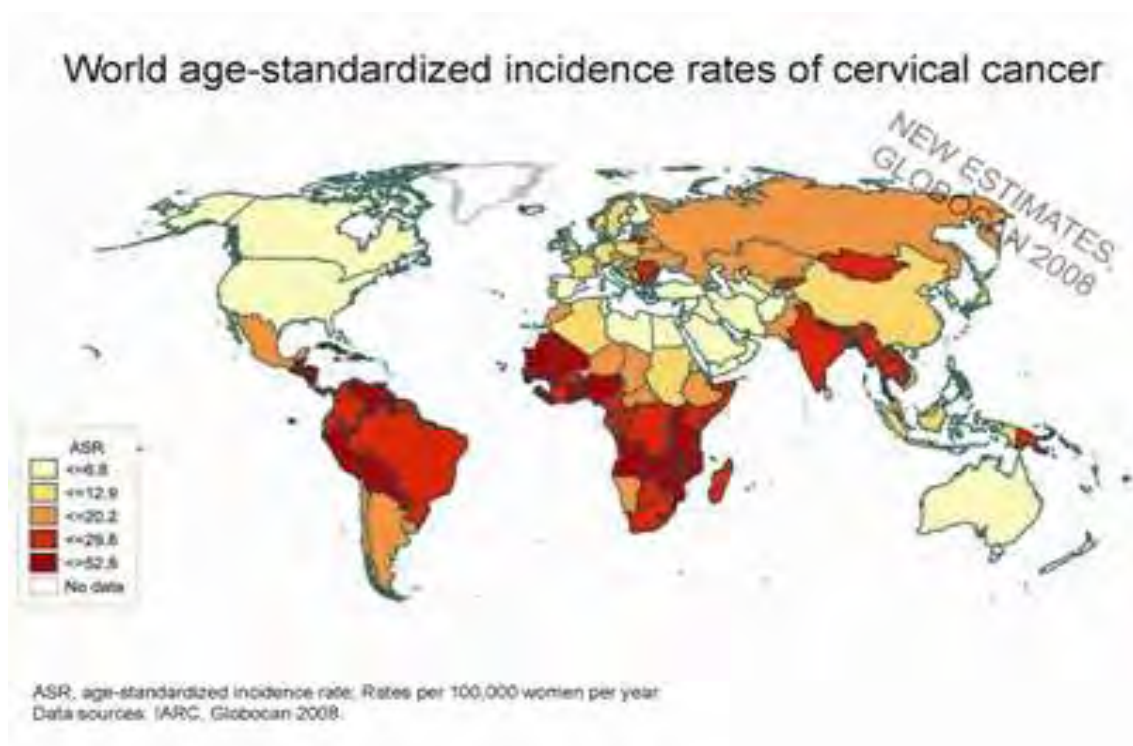


Εικόνα 3.4: Αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Κατά την εξέλιξη των αλλοιώσεων σε καρκίνο αλλάζει το πρότυπο έκφρασης των ιικών γονιδίων. Σε ιστολογικές αλλοιώσεις CIN I (LSIL) η σειρά των γεγονότων έκφρασης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην παραγωγική μόλυνση (απεικονίζεται διαγραμματικά αριστερά). Σε αλλοιώσεις CIN2 και CIN3 η έναρξη των γεγονότων της όψιμης φάσης καθυστερεί και παρόλο που η σειρά των γεγονότων παραμένει ίδια, η παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματίων περιορίζεται σε όλο και μικρότερες περιοχές κοντά στην επιφάνεια του επιθηλίου. Η ενσωμάτωση των HPV αλληλουχιών στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή συνοδεύει τις αλλαγές αυτές και μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω απορρύθμιση της έκφρασης της E7 (και στην απώλεια των πρωτεϊνών αντιγραφής E1 και E2). Στον καρκίνο του τραχήλου (απεικονίζεται δεξιά) τα παραγωγικά στάδια του ιού εξαλείφονται σταδιακά και τα ιικά επισώματα συνήθως χάνονται.

4. Κλινικές εκδηλώσεις

Η μόλυνση από HPV είναι η πιο συχνή σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη η οποία διαγιγνώσκεται μεταξύ των νέων σεξουαλικά ενεργών ατόμων στις αναπτυγμένες χώρες (De Schryver A and Meheus A 1990). Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες, παρόλο που και οι άντρες βρίσκονται σε κίνδυνο να μολυνθούν, και αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ανάπτυξης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) που μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την τρίτη πιο κοινή κακοήθεια του γυναικείου γεννητικού συστήματος και τον δεύτερο πιο κοινό τύπο καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin et al., 2000, Pisani et al., 2002). Περίπου 500.000 καινούρια περιστατικά καρκίνου του τραχήλου αναφέρονται ετησίως, ενώ 270.000 γυναίκες πεθαίνουν από την ασθένεια (Boring et al., 1994, Pisani et al., 2002). Το 80-85% των θανάτων παρατηρείται στις υποανάπτυκτες ή

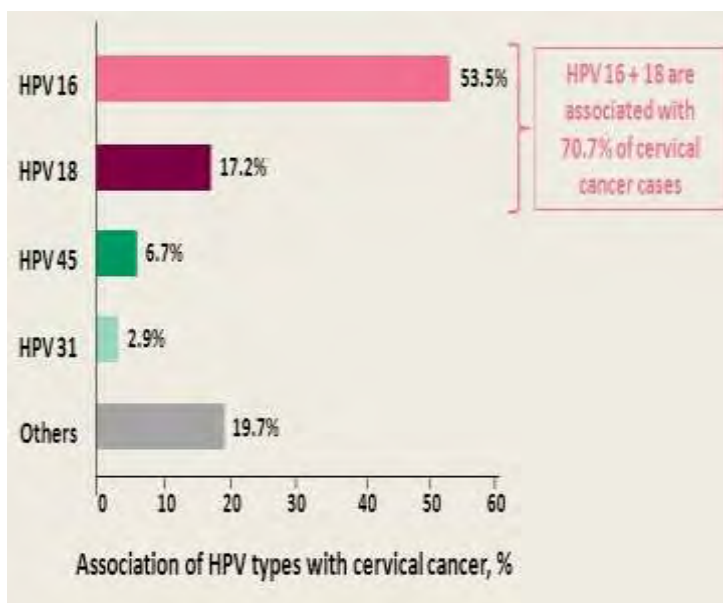
αναπτυσσόμενες χώρες (εικόνα 4.1) Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου έχουν βρεθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Δυτική Ευρώπη ενώ συγκεκριμένα στις ΗΠΑ ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στον τράχηλο έχει αυξηθεί κατά 80% τα τελευταία 50 χρόνια (Singer et al 1995). Περίπου 6 εκατομμύρια νέες HPV μολύνσεις συμβαίνουν κάθε χρόνο μόνο στις ΗΠΑ, όπως έχει υπολογιστεί από μελέτες, και ένας στους πέντε ενήλικους αμερικάνους προβλέπεται ότι θα μολυνθεί από HPV. Στο γενικό πληθυσμό το 75% των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχουν ήδη μολυνθεί με HPV που προσβάλλουν το γενετικό σύστημα (Cates W Jr et al 1999).



Εικόνα 4.1: Παγκόσμια περιστατικά καρκίνου του τραχήλου ανά 100.000 γυναίκες όλων των ηλικιών.

Βάσει επιδημιολογικών μελετών οι κυριότεροι τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο είναι οι HPV -16 και HPV -18 και ακολουθούν οι HPV-45 και HPV-31. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα ποσοστά με τα οποία οι συγκεκριμένοι τύποι ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου ενώ οι HPV -16 και HPV -18 μαζί ευθύνονται για το 70% των περιστατικών καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρείται μια γεωγραφική και ειδική για κάθε χώρα μεταβλητότητα. Για παράδειγμα στην υπό- Σαχάρια Αφρική και τη Λατινική Αμερική οι τύποι 16 και 18 είναι υπεύθυνοι για το 65% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου. Επιπλέον έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι οι τύποι

των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στη Δυτική Αφρική, ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν οι HPV 39 και 54 (Bosh et al 1995).



Εικόνα 4.2: Ποσοστά των πιο κοινών τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV

Η μετάδοση των HPV γίνεται κυρίως μέσω δερματικής επαφής. Τα μολυσματικά ιϊκά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας. Η μετάδοση πραγματοποιείται επίσης μέσω σεξουαλικής επαφής και σε αυτή την περίπτωση μολύνονται με μεγαλύτερη συχνότητα γυναίκες που εναλλάσσουν πολλαπλούς συντρόφους. Ακόμη η μετάδοση μπορεί να γίνει χωρίς σεξουαλική επαφή αλλά μέσω επαφής με ουρογεννητικά εκκρίματα. Τέλος είναι πιθανή η κάθετη μετάδοση του ιού από τη μητέρα στο νεογνό κατά τη διάρκεια του τοκετού.

Η ηλικία και ο αριθμός τόσο των πρόσφατων όσο και των συνολικών σεξουαλικών συντρόφων συνδέονται άμεσα με τον κίνδυνο μόλυνσης από HPV. Τα υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης του γεννητικού συστήματος από HPV παρατηρούνται σε ηλικίες μεταξύ 15-25 ετών ενώ ο κίνδυνος μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας. Τα υψηλότερα επίπεδα που παρατηρούνται μεταξύ νέων γυναικών μπορεί να αντανακλούν τη μετάδοση νέας μόλυνσης κατά την έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας (Ho GY et al 1998, Moscicki

AB et al 2001). Η επίκτητη ανοσία ή ορμονικές αλλαγές καθώς και ο μικρότερος αριθμός σεξουαλικών συντρόφων στις μεγαλύτερες γυναίκες είναι πιθανό να ευθύνονται για την αντίστροφη σχέση ηλικίας-HPV μόλυνσης. Παρόλα αυτά σε ορισμένους πληθυσμούς που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου, αναφέρεται πολλές φορές μια δεύτερη περίοδος έξαρσης της μόλυνσης από HPV σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (Molano M. et al 2002).

4.2 Διάγνωση των HPV λοιμώξεων

Η πρόωμη ανίχνευση και η επακόλουθη πρόωμη/έγκαιρη θεραπεία των HPV σε προκαρκινικές αλλοιώσεις μπορούν να εμποδίσουν την εξέλιξη των αλλοιώσεων αυτών σε καρκίνο (Spitzer, M.1998). Οι HPV δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο από κλινικά δείγματα ενώ οι ανοσολογικές μέθοδοι δεν είναι επαρκείς για την ανίχνευση των HPV λοιμώξεων. Τα πρώτα διαγνωστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν είναι η κυτταρολογία και η ιστολογία, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί μοριακές μέθοδοι διάγνωσης για την ανίχνευση των HPV DNA αλληλοκυμάτων σε διάφορα κλινικά δείγματα.

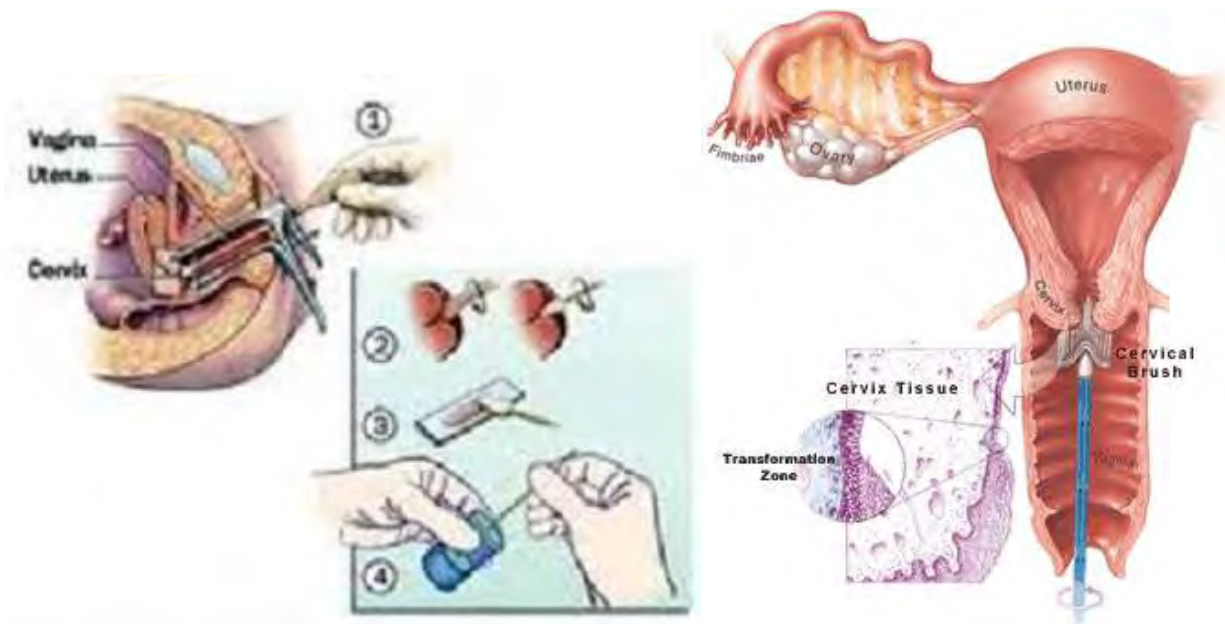
4.2.1 Test Pap

Η αρχική μέθοδος για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου εξακολουθεί μέχρι σήμερα να είναι το τεστ Παπανικολάου. Η μέθοδος αυτή πήρε το όνομά της από τον παθολόγο Γεώργιο Παπανικολάου, ο οποίος εισήγαγε τη μέθοδο το 1949 προτού γίνει γνωστή η αιτία πρόκλησης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Από τη στιγμή της εισαγωγής του στη διάγνωση, έχουν μειωθεί έως και 2/3 τα περιστατικά καρκίνου καθώς και τα ποσοστά θνησιμότητας από την ασθένεια (Kurman R. J. et al 1994). Το test Pap είναι ένα εργαλείο ανίχνευσης το οποίο εντοπίζει αλλαγές στα κύτταρα της ζώνης μετασχηματισμού του τραχήλου, οι οποίες συχνά προκαλούνται από HPV.

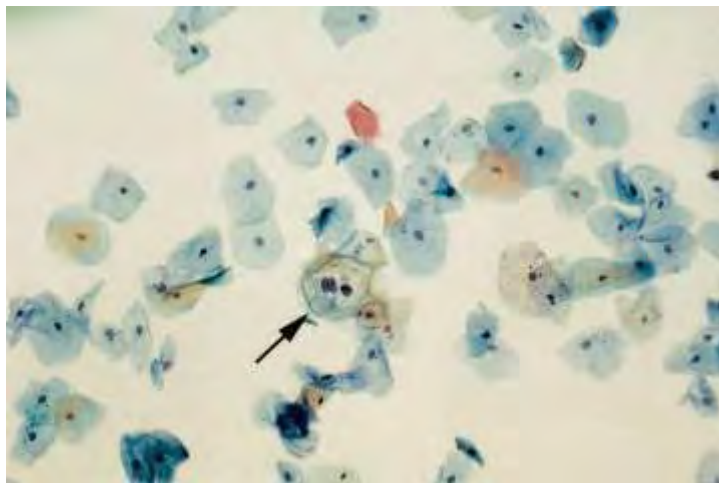
Η μέθοδος αυτή όμως έχει ορισμένους περιορισμούς. Παρουσιάζει αρκετά υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (20-30%), που μπορούν να προκύψουν στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν απλωθούν ομοιόμορφα στην αντικειμενοφόρο πλάκα με αποτέλεσμα αυτά να συσσωρεύονται. Ακόμη άλλα συστατικά που μπορεί να περιέχουν τα κλινικά δείγματα όπως αίμα, βακτήρια ή μύκητες επιμολύνουν το δείγμα και εμποδίζουν την ανίχνευση μη φυσιολογικών κυττάρων. Η έκθεση των κυττάρων του τραχήλου στον αέρα για αρκετή ώρα προτού μονιμοποιηθούν στο πλακίδιο είναι ένας ακόμη περιοριστικός παράγοντας, επειδή μπορεί να προκαλέσει την παραμόρφωσή τους και επομένως την εξαγωγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Τέλος ανθρώπινα λάθη κατά τη διάρκεια της

εξέτασης μπορούν να αποτελέσουν τον κυριότερο περιοριστικό παράγοντα στην εξαγωγή σωστών και έγκυρων αποτελεσμάτων.

Προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι συλλογής και επεξεργασίας των δειγμάτων για την παρασκευή των επιχρισμάτων του test Pap. Σε αυτές τις μεθόδους, τα δείγματα συλλέγονται αρχικά σε ένα υγρό μέσο συντήρησης αντί να απλώνονται απευθείας στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η κυτταρική δομή διατηρείται καλύτερα επειδή τα κύτταρα μονιμοποιούνται κατευθείαν. Επιπλέον γίνεται χρήση μιας τραχηλικής βούρτσας (cervical brush) για τη συλλογή του δείγματος, η οποία παρέχει διπλάσια ποσότητα επιθηλιακών κυττάρων για εξέταση σε σχέση με άλλες μεθόδους συλλογής (Hutchinson, M. L et al 1994). Η ομοιόμορφη μονοστιβάδα κυττάρων που δημιουργείται με αυτές τις μεθόδους διευκολύνει την παρατήρησή τους από τους τεχνικούς και ακόμη η διαδικασία αυτή απομακρύνει συστατικά που μπορεί να επιμολύνουν τα δείγματα όπως βλέννα, πρωτεΐνες, αίμα, βακτήρια και μύκητες. Μέχρι σήμερα υπάρχουν δύο μέθοδοι εγκεκριμένες από την Food and Drug Administration(FDA) για την παρασκευή μονοστιβάδας κυττάρων: το σύστημα PrepStain και η ThinPrep smear μέθοδος. Οι δύο μέθοδοι διαφέρουν σε μερικά σημεία, όμως οι βασικές αρχές τους είναι παρόμοιες. Κατά τη μέθοδο ThinPrep τα κύτταρα συλλέγονται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως στο συμβατικό test Pap, αλλά διαφέρει ο τρόπος χειρισμού, μεταφοράς και εξέτασης του υλικού λήψης. Το PrepStain είναι ένα σύστημα παρασκευής λεπτής μονοστιβάδας κυττάρων. Μετατρέπει ένα υγρό εναιώρημα κυττάρων σε ξεχωριστά βαμμένα, ομογενή, διαγνωστικά κυτταρικά συμπλέγματα λεπτής στιβάδας. Με αυτές τις μεθόδους βελτιώνεται η ποιότητα και η ποσότητα του υλικού που εξετάζεται και συνεπώς και η αξιοπιστία της εξέτασης. Σε περίπτωση που είναι απαραίτητο, μπορούν να γίνουν επιπλέον εξετάσεις στο ίδιο δείγμα όπως ανίχνευση και ταυτοποίηση του HPV με μοριακές μεθόδους (αυτές αναλύονται παρακάτω).



Εικόνα 4.3: Συλλογή κυττάρων από τη ζώνη μετασχηματισμού του τραχήλου της μήτρας με τη βοήθεια τραχηλικής βούρτσας (*cervical brush*) και κατάλληλη επεξεργασία αυτών προκειμένου να εξεταστούν μικροσκοπικά για τυχόν αλλοιώσεις.



Εικόνα 4.4: *Thinprep Pap* επίχρισμα στο οποίο διακρίνονται μη φυσιολογικά πλακώδη κύτταρα με μόλυνση HPV(βέλος).

4.2.2 Ιστοπαθολογία

Ασθενείς με μη φυσιολογικά ευρήματα στο test Pap που όμως δεν έχουν κάποια ορατή τραχηλική αλλοίωση υποβάλλονται συνήθως σε κολποσκόπηση ή βιοψία κατευθυνόμενη από κολποσκόπηση. Μετά την εφαρμογή 3% διαλύματος ακετοξικού οξέος ο τράχηλος εξετάζεται με ειδικό φιλτραρισμένο φως με 10-15 φορές μεγέθυνση. Με την κολποσκόπηση μπορούν να ανιχνευτούν χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες, όμως δεν

διακρίνονται μικροδιηθήσεις. Στην περίπτωση που δε βρεθούν δυσπλασίες ή δεν μπορεί να γίνει ορατή ολόκληρη η μεταβατική περιοχή πλακώδους-κυλινδρικού επιθηλίου, πραγματοποιείται βιοψία. Η βιοψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση των περισσότερων διαγνώσεων καθώς με αυτήν μπορούν να παρατηρηθούν χαρακτηριστικά παθολογικά γνωρίσματα της HPV μόλυνσης όπως υπερπλασία του επιθηλίου (ακάνθωση) και κοιλοκύττωση σε τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Είναι διαθέσιμα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα τα οποία ανιχνεύουν κοινά HPV αντιγόνα, ειδικότερα έναν γραμμικό επίτοπο στη μέση της βασικής καμψιακής πρωτεΐνης, που εκφράζεται ευρέως μεταξύ διαφορετικών HPV υπότυπων. Τα προσδεμένα αντισώματα ανιχνεύονται με την ανοσοκυτταροχημική μέθοδο.

4.2.3 Μοριακή Διάγνωση των HPV λοιμώξεων

Τα τελευταία χρόνια επιδιώκεται όλο και περισσότερο η ανάπτυξη και χρήση μοριακών τεχνικών ως επιπρόσθετο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των HPV λοιμώξεων. Η εφαρμογή τέτοιων μεθόδων μπορεί να βελτιώσει την ειδικότητα των κυτταρολογικών μεθόδων για την ανίχνευση υψηλού βαθμού δυσπλασιών και καρκινώματος καθώς επίσης να μειώσει τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από τα κυτταρολογικά τεστ. Για τη μοριακή διάγνωση έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα. Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

Hybrid Capture II (HC2)

Η τεχνική Hybrid Capture II της εταιρίας Digene, που είναι το μοναδικό τεστ που έχει εγκριθεί από τον FDA για την ανίχνευση HPV, είναι μία δοκιμασία υβριδισμού υγρής φάσης που βασίζεται στην ενίσχυση σήματος. Αποτελεί σήμερα την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κλινική δοκιμασία στην αγορά. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται RNA ανιχνευτές που αντιδρούν με 13 στελέχη υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 και -68) ή 5 στελέχη χαμηλής επικινδυνότητας (HPV-6, 11, -42, -43, -44). Επειδή όμως η ανίχνευση των τύπων χαμηλής επικινδυνότητας (low risk) δεν έχει κλινική σημασία, η δοκιμασία πραγματοποιείται μόνο με τους ανιχνευτές για τους τύπους υψηλής επικινδυνότητας (Kim, J. J et al 2002). Τα υβρίδια RNA-DNA 'παγιδεύονται' από μονοκλωνικά αντισώματα που είναι καθηλωμένα στα πηγαδάκια ενός 96-well plate και ανιχνεύονται με αντι-υβριδικά αντισώματα. Το σήμα που παράγεται μετράται με χημειοφωτάγεια και εκφράζεται σε απλές μονάδες φωτός. Η δοκιμασία αυτή

δεν έχει τη δυνατότητα να ελέγχει την ποσότητα του εισερχόμενου DNA. Έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει μόνο την παρουσία συγκεκριμένων τύπων HPV υψηλής ή χαμηλής επικινδυνότητας και δεν αναγνωρίζει συγκεκριμένους τύπους, γεγονός που αποτελεί σημαντικό περιορισμό της μεθόδου (Kleter, B. et al 1999). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν την ευκολία στη χρήση και την καλή αναπαραγωγικότητα μέσα στο εργαστήριο (Kim, J. J et al 2002).

Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι διαγνωστικών τεστ που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): 1) τεστ τα οποία χρησιμοποιούν τυποειδικούς εκκινητές και 2) τεστ τα οποία χρησιμοποιούν εκφυλισμένους εκκινητές. Στην πρώτη κατηγορία τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάζονται ενισχύουν ένα συγκεκριμένο HPV γενότυπο. Επομένως απαιτείται η πραγματοποίηση πολλαπλών αντιδράσεων PCR ξεχωριστά, με αποτέλεσμα να αυξάνεται τόσο ο χρόνος όσο και το κόστος της διαδικασίας (Lee J.S.J et al 1997). Αντίθετα τεστ τα οποία χρησιμοποιούν εκφυλισμένους εκκινητές επιτρέπουν την ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος HPV τύπων. Οι εκκινητές που σχεδιάζονται στοχεύουν περιοχές οι οποίες είναι συντηρημένες μεταξύ διαφορετικών HPV γενοτύπων. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι εκκινητές στοχεύουν την περιοχή L1, η οποία είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών, όπως ο συνδυασμός εκκινητικών μορίων MY09/MY11. Η χρήση όμως τέτοιων ολιγονουκλεοτιδίων που περιείχαν εκφυλισμούς είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη επαναληψιμότητας και μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων PCR. Οι εκκινητές αυτοί αντικαταστάθηκαν από μια ομάδα ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προέκυψαν από την ομαδοποίηση των ικών τύπων βάσει της ομολογίας αλληλουχίας στην ίδια περιοχή που στόχευαν οι εκκινητές MY09/MY11. Έτσι προέκυψε ο συνδυασμός εκκινητών PGMY09/PGMY11, ο οποίος περιλαμβάνει συνολικά 18 ολιγονουκλεοτίδια και ενισχύει τμήμα της περιοχής L1 μεγέθους 450bp (Lizar G. et al 2001). Μία ακόμη ομάδα εκκινητών που χρησιμοποιείται είναι ο συνδυασμός GP5+/GP6+, ο οποίος ενισχύει επίσης τμήμα της συντηρημένης περιοχής L1, μικρότερου όμως μεγέθους (150 bp). Μετά την ενίσχυση του DNA στόχου με PCR, ο κάθε γενότυπος HPV μπορεί να καθοριστεί με υβριδισμό νουκλεϊκών οξέων, με ενδονουκλεάσες περιορισμού ή άμεση αλληλουχία. Την πιο κοινή μέθοδο για την ταυτοποίηση των HPV αποτελεί ο υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων. Ειδικότερα στη δοκιμασία σε μικροπλάκα, τα ενισχυμένα με PCR προϊόντα που έχουν

σημανθεί με βιοτίνη συνδέονται στα πηγαδάκια μιας πλάκας (96 wells) τα οποία έχουν καλυφθεί με στρεπταβιδίνη. Τα ακινητοποιημένα πλέον τμήματα στη συνέχεια αποδιατάσσονται και υβριδίζονται με ειδικούς ανιχνευτές σημασμένους με διγοξιγενίνη. Το τελικό στάδιο είναι μια χρωματομετρική αντίδραση, και η οπτική πυκνότητα καθορίζεται από την “ανάγνωση” της πλάκας (Lorincz A.T et al 1987).

Ένα ακόμα σύστημα ενίσχυσης με PCR για την ανίχνευση των HPV αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια. Στο σύστημα αυτό, που ονομάζεται SPF10, χρησιμοποιείται μια ομάδα 10 εκκινητικών μορίων (6 forward και 4 reverse) τα οποία ενισχύουν ένα τμήμα 65bp της L1 περιοχής του γονιδιώματος του HPV. Οι εκκινητές αυτοί περιέχουν ένα νουκλεοτίδιο ινোসίνης, το οποίο μπορεί να ζευγαρώσει με οποιαδήποτε βάση. Τα ενισχυμένα τμήματα στη συνέχεια ανιχνεύονται με μία ενζυμοεξαρτώμενη δοκιμασία, στην οποία χρησιμοποιείται ένα μίγμα ειδικών HPV ανιχνευτών που αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών γενοτύπων. Ο γενότυπος στα θετικά δείγματα καθορίζεται στη συνέχεια με την εφαρμογή μιας line blot δοκιμασίας, στην οποία ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές ακινητοποιούνται σε παράλληλες γραμμές σε ταινίες νιτροκυτταρίνης. Τα ενισχυμένα τμήματα υβριδίζονται στους ανιχνευτές και ανιχνεύονται στη συνέχεια με μια χρωματομετρική αντίδραση (Kleter, B. et al 1999).

Το Ampligor HPV τεστ της Roche Diagnostics είναι επίσης μία δοκιμασία που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιεί βιοτινυλιωμένους συναινετικούς (consensus) εκκινητές για την ενίσχυση της περιοχής L1 του γονιδιώματος του HPV και Linear Array line blot υβριδισμό. Το Ampligor HPV τεστ μπορεί να καθορίσει την παρουσία 13 τύπων HPV υψηλής επικινδυνότητας και του ανθρώπινου γονιδίου της β-γλοβουλίνης ως θετικό μάρτυρα, ενώ μελλοντικές εκδοχές της συγκεκριμένης δοκιμασίας θα επεκταθούν σε 37 τύπους HPV υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας (Gillio-Tos A et al 2006, Monsonego J et al 2005, Sandri MT 2006, van Ham MA et al 2005). Το συγκεκριμένο τεστ είναι ακόμη ιδιαίτερα ακριβό και μπορεί να αποδειχτεί οικονομικά αποδοτικό μόνο σε εργαστήρια υψηλής παραγωγής.

Όσον αφορά τα τεστ τα οποία χρησιμοποιούν τυποειδικούς εκκινητές, αυτά βασίζονται στις παραλλαγές της αλληλουχίας των E6 και E7 γονιδίων των διάφορων HPV υπότυπων. Έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί ομάδες εκκινητών που στοχεύουν τις περιοχές E6 και E7 και ειδικότερα σε μια πρόσφατη μελέτη σχεδιάστηκαν 31 εκκινητές με σκοπό την δημιουργία μιας ομάδας εκκινητικών μορίων E7 για την ανίχνευση ευρέως φάσματος HPV υψηλής επικινδυνότητας (19 υπότυπους) (Gheit et al., 2006).

Μία ακόμη σημαντική μέθοδος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV είναι η Nested Multiplex PCR. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται αρχικά εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων HPV υψηλής επικινδυνότητας. Στη συνέχεια τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης υποβάλλονται σε Nested Multiplex PCR, στην οποία χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια που είναι σχεδιασμένα ειδικά για κάθε τύπο HPV και ενισχύουν το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR γονιδίων E6 και E7. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ακριβής ταυτοποίηση του ιού. Οι τυποειδικοί εκκινητές συνήθως χρησιμοποιούνται σε μίγματα και εντός των μιγμάτων οργανώνονται μεταξύ τους ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια θερμοκρασία υβριδισμού (Tm). Τα προϊόντα που προκύπτουν πρέπει να έχουν διαφορετικό μέγεθος (Sotlar et al., 2004).

Εκτός από τη συμβατική PCR, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και οι τυποειδικοί εκκινητές της μεθόδου σχεδιάζονται έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο του ιού τα ογκογονίδια E6 και E7 των ιών υψηλής επικινδυνότητας. Η μέθοδος της Real Time PCR χαρακτηρίζεται από υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα καθώς επίσης δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση σε πραγματικό χρόνο.

Τέλος ο συνδυασμός της απλής PCR με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarrays) είναι ένας ακόμη νέος τρόπος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV με μεγάλη ακρίβεια. Οι μικροσυστοιχίες είναι μια νέα μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί τον υβριδισμό σημασμένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που ακινητοποιούνται σε μια πλάκα η οποία διαβάζεται από έναν scanner εμφανίζοντας τα αποτελέσματα στην οθόνη ενός υπολογιστή. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται PCR/APEX και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου με την ενίσχυση του γονιδίου E7. Στη μέθοδο αυτή αρχικά πραγματοποιείται multiplex PCR με διαφορετικούς εκκινητές για κάθε τύπο HPV. Στη συνέχεια προστίθενται στα προϊόντα φθορίζουσες χρωστικές με ειδική επεξεργασία και αυτά τοποθετούνται σε microarray chip στο οποίο έχουν ακινητοποιηθεί αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν σε ένα τμήμα του γονιδίου E7 για να πραγματοποιηθεί υβριδισμός. Στη συνέχεια το chip ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια που δεν έχουν υβριδοποιηθεί και σαρώνονται για να εντοπιστούν οι θέσεις υβριδισμού που φθορίζουν δίνοντας σήμα που επεξεργάζεται από κατάλληλο λογισμικό.

Τέλος το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να αναδειχθούν οι συμπληρωματικές αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τον τύπο του HPV(Gheit et al., 2006).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Κλινικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 122 κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία συλλέχθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας καθώς και στο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Άγιος Σάββας και το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικό. Η ταυτοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα που προέρχονταν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας με την μέθοδο της Nested Multiplex PCR σύμφωνα με την δημοσίευση του K.Sotlar και των συνεργατών του, το 2004. Τα υπόλοιπα δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί στα εργαστήρια των ιδρυμάτων από τα οποία προέρχονται με τις μεθόδους NASBA και HPV arrays. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

κωδικοποίηση δειγμάτων	υλικό απομονώσης	κλινική εικόνα	Προέλευση
ΠΝΑ1	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ2	Thinprep	Δυσπλασία Τραχήλου	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ3	Thinprep	Δυσπλασία Τραχήλου	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ4	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ5	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ6	Thinprep	CIN II-III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ7	Thinprep	Ca in situ	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ8	Thinprep	HSIL, CIN II	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ9	Thinprep	CIN II	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ10	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ11	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ12	Thinprep	CIN II-III-HGSIL	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ13	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ14	Thinprep	Test Pap :CIN I Βιοψία :CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ15	Thinprep	Test Pap :CIN I Βιοψία :CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ16	Thinprep	Ca Τραχήλου Διηθητικό	Παν. Νοσ. Λάρισας

ΠΝΑ22	Thinprep	HPV, CIN I	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ24	Thinprep	Test Pap: HGSIL	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ25	Thinprep		Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ26	Thinprep	Test Pap: HGSIL	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ27	Thinprep	Test Pap: HPV	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ36	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ37	Thinprep	Ca Τραχήλου	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ38	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ39	Thinprep	CIN III	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ40	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ41	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Λάρισας
ΠΝΑ42	Thinprep	HGSIL (CIN II-III)	Παν. Νοσ. Λάρισας
ATT1	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT2	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT3	Thinprep	ASCUS	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT4	Thinprep	HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT5	Thinprep	HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT6	Thinprep	HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT7	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT8	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT9	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT10	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT11	Thinprep	WNL	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT12	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT13	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT14	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT15	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT16	Thinprep	HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT17	Thinprep	WNL	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT19	Thinprep	ASCUS	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT21	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT24	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT25	Thinprep	ΣΚΔΠ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT27	Thinprep	ΣΚΔΠ, φλεγμονή	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT28	Thinprep	ΣΚΔΠ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT41	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό

ATT42	Thinprep	ΣΚΔΠ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT45	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT47	Thinprep	ASCUS	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT48	Thinprep	ΣΚΔΠ υπερ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT49	Thinprep	ΣΚΔΠ υπερ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT52	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT53	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT54	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT55	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT56	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT58	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT59	Thinprep	ΣΚΠΔ υπερ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT61	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT63	Thinprep	ΣΚΠΔ υπερ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT64	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT66	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT68	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT70	Thinprep	ΣΚΠΔ ατροφ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT71	Thinprep	ΣΚΠΔ υπερ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT72	Thinprep	Ανεπαρκές	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT73	Thinprep	ΣΚΠΔ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT74	Thinprep	ΣΚΠΔ ειδ φλεγμ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT75	Thinprep	ΣΚΠΔ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT76	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT78	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT79	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT80	Thinprep	HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT81	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT82	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT83	Thinprep	LG/HG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT84	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT85	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT86	Thinprep	Δευτερογενής HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT88	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT93	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT94	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό

ATT95	Thinprep	Δευτερογενής HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT96	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT97	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT99	Thinprep	—	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT100	Thinprep	ΣΚΔΠ	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT101	Thinprep	LG,φλεγμονή	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT103	Thinprep	Δευτερογενής HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT104	Thinprep	HPV	Παν. Νοσ. Αττικό
ATT105	Thinprep	LG	Παν. Νοσ. Αττικό
Δ1	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ2	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN III	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ3	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN III	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ4	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN II-III	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ6	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN II	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ7	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ13	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN III	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ17	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN II	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ25	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ30	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ34	Τομή ιστού σε παραφίνη	LGSIL	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ36	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
Δ42	Τομή ιστού σε παραφίνη	CIN I	Ιδ. Παθολ/μικο ιατρείο
2209	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2121	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2290	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2148	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2127	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2279	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2216	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
2186	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
747	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
793	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
796	Thinprep	—	Άγιος Σάββας
858	Thinprep	—	Άγιος Σάββας

Πίνακας 5.1: Κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν

5.2 Απομόνωση του DNA

5.2.1. Απομόνωση DNA από δείγματα που φυλάσσονται σε thinprep

Η απομόνωση του DNA από τα κλινικά δείγματα που φυλάσσονται σε thinprep πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Casas I. et al, 1996. Από κάθε τραχηλικό επίχρισμα μετά από καλή ανάδευση πήραμε 100μl, τα οποία αναμείξαμε στη συνέχεια με 10μl/tube γλυκογόνο και 600 μl Lysis Buffer αποτελούμενο από: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate και τα αφήσαμε για επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε tube 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης διατηρημένης στους -20°C. Μετά από καλή ανάδευση τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 20 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση αυτών στις 14.000 rcf στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500 μl κρύας αιθανόλης 70%. Αφού έγινε καλό vortex, ακολούθησε και πάλι φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα το οποίο περιέχει το κυτταρικό και ιικό DNA επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.2.2 Απομόνωση DNA από τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένες σε παραφίνη

Αρχικά λήφθηκαν τομές διαμέτρου 5-10nm με τη χρήση νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνάρια (tubes) των 0,5ml. Κάθε τομή καθαρίστηκε από την παραφίνη με ξυλένιο, ξεπλύθηκε με 96% αιθανόλη και αφέθηκε να στεγνώσει. Προστέθηκαν στη συνέχεια 200 μl 1X extraction buffer (περιέχει 20μg/μl πρωτεΐνάσης K), 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X PCR buffer (Stratagene, La Jolla USA) καθώς και αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 1ml. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C overnight ή στους 55°C για 3 ώρες. Στη συνέχεια αφέθηκαν στους 95°C για 15 min ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Τέλος απομακρύνθηκαν τα κυτταρικά κατάλοιπα με φυγοκέντρηση και το απομονωμένο DNA (υπερκείμενο) αποθηκεύτηκε σε άλλα σωληνάρια στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί εκ νέου. Κάθε υπερκείμενο της παραπάνω εκχύλισης επεξεργάστηκε περαιτέρω με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) όπως περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του DNA που εκχυλίστηκε και να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα και πρωτεΐνες που είχαν παραμείνει μετά το τέλος της πρώτης εκχύλισης.

5.3 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

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

Στην συνέχεια όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του παραπάνω γονιδίου με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl. Το μείγμα αυτό περιείχε: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από κάθε ζεύγος των παραπάνω εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Robocycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 50sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 20sec.

<i>Εκκινητικά μόρια</i>	<i>Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης</i>
GAPDH F/R	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 95°C για 40sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 60°C για 50sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 20sec } 40 cycles

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH2O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.4 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου L1

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου L1 8 διαφορετικών στελεχών HPV υψηλής επικινδυνότητας, ειδικότερα για τα στελέχη HPV-16,-18,-45,-35,-66,-33,-51,-58. Το L1 γονίδιο κωδικοποιεί για την αντίστοιχη ιϊκή καψιδιακή πρωτεΐνη και αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη περιοχή μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Για το λόγο αυτό έγινε και η επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής για τον σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων. Συνολικά δημιουργήθηκαν 8 ζευγάρια εκκινητών με τη χρήση του προγράμματος *primer 3* ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

Αρχικά ανακτήθηκαν όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες για την περιοχή L1 από τη βάση δεδομένων Genebank. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε στέλεχος HPV ξεχωριστά. Στη συνέχεια έγινε ομοπαράθεση των αλληλουχιών της L1 κάθε στελέχους με τη βοήθεια του προγράμματος *MEGA*, με τελικό σκοπό να επιλεγούν οι συντηρημένες περιοχές μεταξύ των απομονωμένων αλληλουχιών L1 του ίδιου στελέχους. Την επιλογή αυτή ακολούθησε ο σχεδιασμός εκκινητών επάνω στις συντηρημένες περιοχές με την χρήση του προγράμματος primer 3, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Αφού πλέον ήταν διαθέσιμες οι αλληλουχίες, έγινε ομοπαράθεση των εκκινητικών αυτών αλληλουχιών στο πρόγραμμα **BLAST**. Απομονώθηκαν με τον τρόπο αυτό οι τύποι HPV που εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιότητα στην L1 γενωμική περιοχή και σχεδιάστηκαν εκ νέου τυποειδικοί πλέον εκκινητές. Τέλος πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συμπληρωματικότητας των νέων εκκινητών με διάφορους γενότυπους HPV με το πρόγραμμα *MEGA* για να επιβεβαιωθεί ότι οι τελικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν τυποειδικοί. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν καθώς επίσης το μέγεθος των προϊόντων που προκύπτουν.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
HPV-16 L1 F	6825-6846	Sense	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291
HPV-16 L1R	7096-7115	Antisense	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV-18 L1 F	5504-5523	Sense	GCCCCTGCCTCTACACAGTA	292
HPV-18 L1 R	5776-5795	Antisense	ATCCTGCTTATTGCCACCAC	
HPV-45 L1 F	5707-5727	Sense	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233
HPV-45 L1 R	5920-5939	Antisense	CCACGACCAATTTCCATACC	
HPV-66 L1 F	5616-5635	Sense	CGCCGTAAACGTATTCCTA	168
HPV-66 L1 R	5764-5783	Antisense	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	
HPV-51 L1 F	5670-5691	Sense	TCCAATACCTAAAACCTCAACG	155
HPV-51 L1 R	5805-5824	Antisense	CACAACCCACACCAACCTA	
HPV-33 L1 F	6807-6826	Sense	TAACACCTCCTCCATCTGCT	202
HPV-33 L1 R	6987-7008	Antisense	CCTGCCTGTAATAAAAACTTGC	
HPV-35 L1 F	5892-5911	Sense	GTAGGTCGTGGTCAGCCATT	227
HPV-35 L1 R	6097-6118	antisense	TGGTTAGCATTACAAGGTGTGC	
HPV-58 L1 F	6896-6918	Sense	GATTTGTTACCTCCCAGGCTATT	233
HPV-58 L1 R	7096-7115	Antisense	CTTTTTGCGTTTGGTGGATG	

Πίνακας 5.2: Συνολικός πίνακας εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου L1. παρουσιάζονται οι θέσεις σύνδεσης των εκκινητών στο γονίδιο, οι αλληλουχίες τους, η πολικότητά τους καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της PCR.

αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 55°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ		
Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 30sec	} 50 κύκλοι
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	55⁰ C 30sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 30sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases καθώς και κύτταρα Rd.

5.5.2. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV18

Προτού τα HPV-18 θετικά δείγματα υποβληθούν σε PCR για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου με τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή έλεγχος της συμπληρωματικότητας των εκκινητών που σχεδιάστηκαν ειδικά για τον HPV-18 με άλλα στελέχη με τη βοήθεια του προγράμματος *MEGA*. Από τον έλεγχο αυτό διαπιστώσαμε ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν εμφανίζουν ομολογία με την L1 περιοχή άλλων στελεχών.

Ακολούθως τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με το συγκεκριμένο ζεύγος των εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-18. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA

Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 10sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ		
Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 10sec	} 50 κύκλοι
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	58⁰ C 10sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 30sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O ελεύθερο από DNases RNases καθώς επίσης κύτταρα RD και L20.

5.5.3. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV45

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συμπληρωματικότητας των εκκινητών που σχεδιάστηκαν ειδικά για την L1 περιοχή του HPV-45 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων HPV στελεχών με τη βοήθεια του προγράμματος **MEGA**. Διαπιστώθηκε ότι ο εκκινητής HPV45 L1 F εμφανίζει διαφορά ενός νουκλεοτιδίου (mismatch) στο 3' άκρο του με την L1 του στελέχους HPV-35, ενώ ο HPV45 L1 R εμφάνιζε ομολογία μόνο σε 2 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του με την L1 του HPV-35, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.:

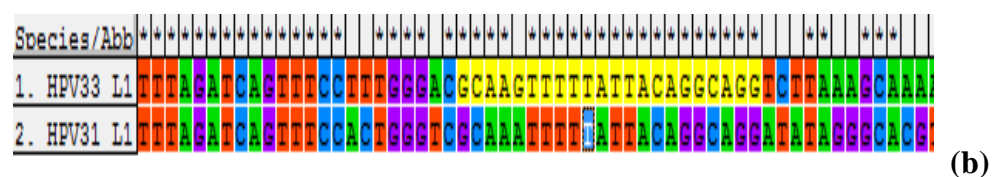
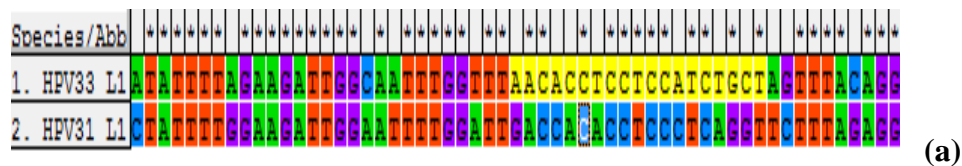
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95° C 30sec	}	50 κύκλοι
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	53° C 10sec		
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72° C 10sec		
Τελικό στάδιο επώασης :	72° C για 5 min		

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O ελεύθερο από DNases RNases καθώς επίσης και κύτταρα Rd και L20.

5.5.5. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV33

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ειδικά για την περιοχή L1 του HPV-33 με την διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα ελέγχθηκαν ως προς την συμπληρωματικότητά τους με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων στελεχών HPV με το πρόγραμμα *MEGA*. Από τη διαδικασία αυτή προέκυψε ότι ο εκκινητής HPV33 L1 F παρουσιάζει διαφορά σε 2 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του με την L1 του HPV-31 ενώ ο εκκινητής HPV33 L1 R εμφανίζει 100% ομολογία στο 3' άκρο του με την L1 του HPV-31, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 5.6: Ομολογία των εκκινητών HPV33 L1 F (a) και HPV33 L1 R (b) με την L1 του HPV-31, όπως προκύπτει από την εφαρμογή του προγράμματος *MEGA*

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV-33 υποβλήθηκαν σε PCR με τους ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου του HPV-33. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με μονή μόλυνση HPV-31 για να διαπιστωθεί εάν οι συγκεκριμένοι εκκινητές ενισχύουν και την L1 περιοχή του στελέχους αυτού. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μίγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 10sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 30sec	} 50 κύκλοι
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	58⁰ C 10sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 10sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O ελεύθερο από DNases RNases καθώς επίσης και κύτταρα Rd και L20.

5.5.6. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV35

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την L1 του HPV-35 ελέγχθηκαν ως προς την συμπληρωματικότητά τους με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων μη ειδικών τύπων HPV

Ακολούθως τα δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV35 υποβλήθηκαν σε PCR με τους ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου του HPV35. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δείγματα με μονές μολύνσεις HPV-16 και HPV-45 για να διαπιστωθεί εάν οι συγκεκριμένοι εκκινητές ενισχύουν την περιοχή L1 των στελεχών αυτών. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μίγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 55°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 10sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ		
Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 30sec	}
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	55⁰ C 10sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 10sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	50 κύκλοι

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.5.7. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV51

Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές για την περιοχή L1 του HPV-51 ελέγχθηκαν ως προς την συμπληρωματικότητά τους με την αντίστοιχη περιοχή άλλων στελεχών HPV με τη βοήθεια του προγράμματος **MEGA**. Από τη διαδικασία αυτή προέκυψε ότι τα συγκεκριμένα εκκινητικά μόρια δεν παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία τους με την αλληλουχία της

L1 άλλων στελεχών HPV. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας δείγματα τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV-51 υποβλήθηκαν σε PCR με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-51. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μίγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Taq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 10sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ		
Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 30sec	}
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	58⁰ C 10sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 10sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	50 κύκλοι

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.5.8. PCR για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV58

Το τελευταίο στέλεχος HPV για το οποίο σχεδιάστηκαν εκκινητές ήταν ο HPV-58. Ακολουθήθηκε για άλλη μια φορά η ίδια διαδικασία, οι εκκινητές δηλαδή που σχεδιάστηκαν ειδικά για την L1 περιοχή του HPV-58 ελέγχθηκαν ως προς την συμπληρωματικότητά τους με την αντίστοιχη περιοχή άλλων HPV στελεχών. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος **MEGA** και βρέθηκε ότι τα συγκεκριμένα εκκινητικά μόρια δεν παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία τους με την αλληλουχία L1 άλλων στελεχών

HPV. Ακολούθως τα δείγματα τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί ως HPV-58 υποβλήθηκαν σε PCR με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μίγμα τελικού όγκου 50 μl. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 50pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 5 μl μίγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000™ DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla USA) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησαν 50 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 10sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 10sec.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ		
Θερμοκρασία Αποδιάταξης :	95⁰ C 30sec	}
Θερμοκρασία Υβριδοποίησης :	58⁰ C 10sec	
Θερμοκρασία Επιμήκυνσης :	72⁰ C 10sec	
Τελικό στάδιο επώασης :	72⁰ C για 5 min	50 κύκλοι

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

5.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

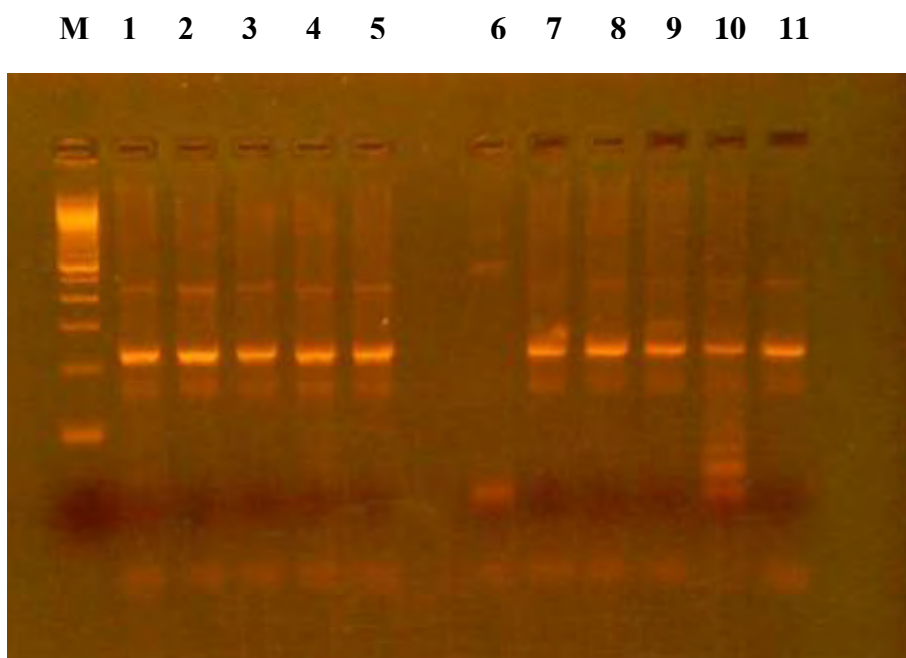
Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων όλων των αντιδράσεων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από κάθε PCR προϊόν χρησιμοποιήθηκαν 10μl τα οποία, αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120 Volt. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους

ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1.Αποτελέσματα PCR με GAPDH εκκινητές

Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH 12 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων. Όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάσαμε στα πλαίσια αυτής της εργασίας υποβλήθηκαν στη διαδικασία αυτή για τον έλεγχο της ύπαρξης DNA καθώς επίσης και για τον έλεγχο της ποιότητας του κυτταρικού DNA.



Εικόνα 6.1: Ενδεικτική εικόνα της PCR 10 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-5 και 7-11) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων GAPDH F/GAPDH R σε πήκτωμα αгарόζης για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH. Στη θέση 6 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. M=Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι όλα τα κλινικά δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς οι ζώνες ενίσχυσης όλων των προϊόντων βρίσκονται στο σωστό ύψος, δηλαδή στις 250bp σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους των 100 bp της Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από τη γειτονική της 100 bp. Στις θέσεις 1-5 και 7-11 έχουν ηλεκτροφορηθεί τα κλινικά δείγματα

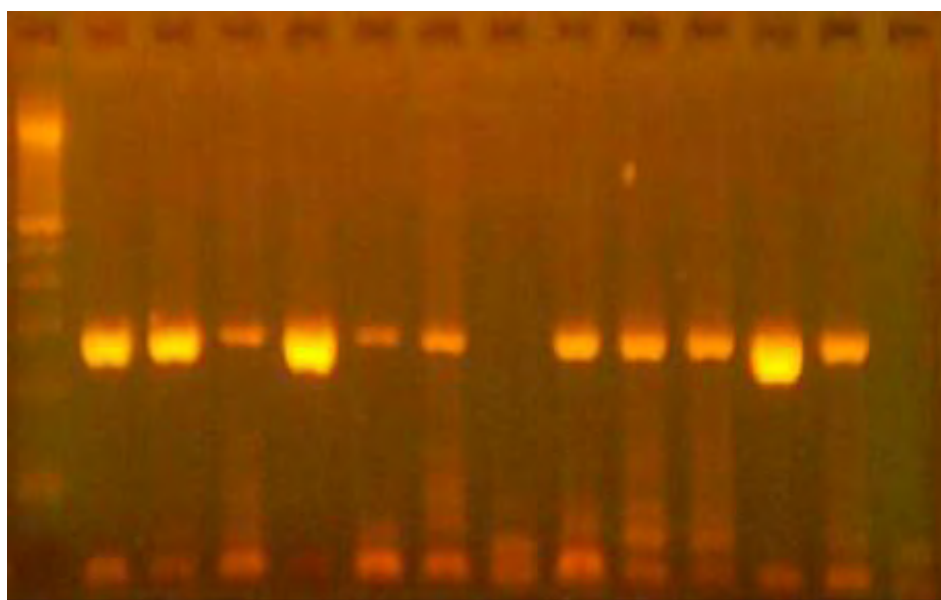
ενώ στη θέση 6 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

6.2 Αποτελέσματα PCR με τυποειδικούς εκκινητές

6.2.1. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV16F-HPV16R

Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV16F-HPV16R, τα οποία σχεδιάστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-16.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



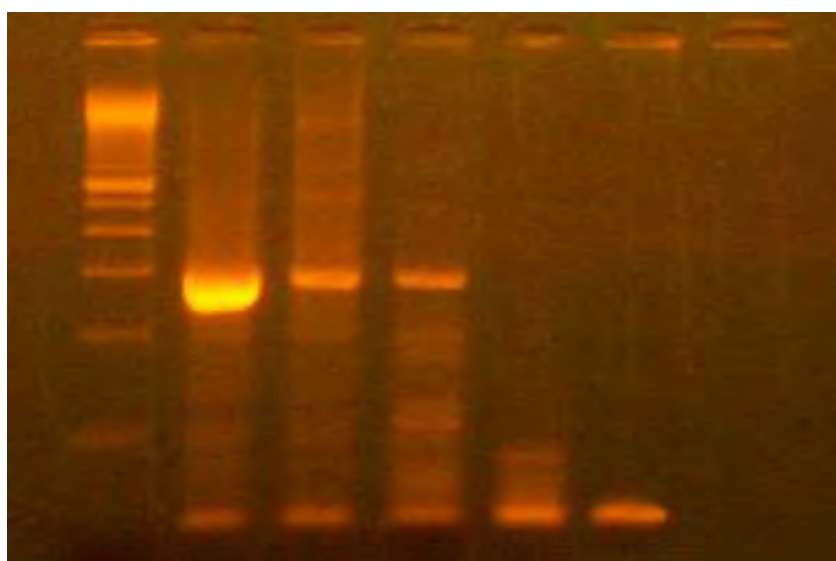
Εικόνα 6.2: Ενδεικτική εικόνα της PCR 11 κλινικών δειγμάτων στις θέσεις 1-6 και 8-12 με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV16F-HPV16R σε πήκτωμα αгарόζης για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1. Στις θέσεις 7 και 13 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Το μέγεθος του προϊόντος όλων των δειγμάτων είναι 291 bp. M=Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τα προϊόντα 11 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ενισχύθηκαν με PCR με το ειδικό ζεύγος εκκινητών για την L1 περιοχή του HPV-16. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα τα οποία είχαν διαγνωστεί ως θετικά για τον HPV-16.

Το σήμα ενίσχυσης όλων των δειγμάτων βρίσκεται στο ύψος των 291 bp, όπως υποδεικνύεται από τον μάρτυρα μοριακού βάρους των 100 bp της Invitrogen. Στις θέσεις 7 και 13 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, το οποίο όπως φαίνεται στην εικόνα δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς χωρίς την ύπαρξη επιμολύνσεων.

Πραγματοποιήθηκε επίσης αντίδραση PCR με τη χρήση δειγμάτων θετικών για HPV-16 καθώς και δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV-35. Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν να διαπιστώσουμε εάν τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν ειδικά για την περιοχή L1 του HPV-16 ενισχύουν την ίδια περιοχή του στελέχους HPV-35, εξαιτίας της ομολογίας στην αλληλουχία της L1 που εμφανίζουν τα δύο αυτά στελέχη. Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV16F-HPV16R σε 4 ενδεικτικά κλινικά δείγματα:

M 1 2 3 4 5



Εικόνα 6.3: Ενδεικτική εικόνα της PCR 3 κλινικών δειγμάτων θετικών για **HPV16** (θέσεις 1-3) και ενός θετικού για **HPV35** (θέση 4) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση περιοχής του L1 γονιδίου. Στη θέση 5 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Το μέγεθος των προϊόντων είναι 291bp. M=Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

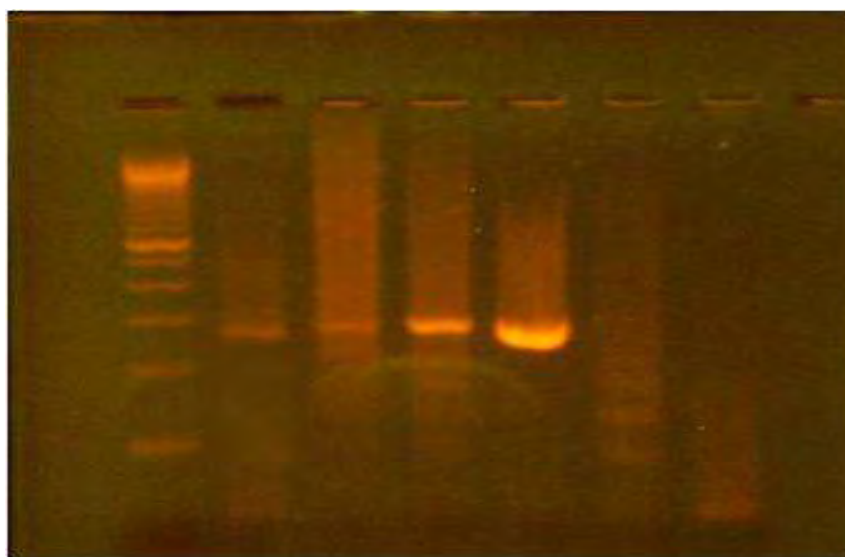
Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR 3 κλινικών δειγμάτων HPV-16 και ενός δείγματος με μονή μόλυνση HPV-35. Όπως φαίνεται στο πήκτωμα αγαρόζης το σήμα ενίσχυσης των δειγμάτων στις θέσεις 1-3, που αντιστοιχούν σε

HPV-16 θετικά δείγματα, βρίσκεται στο ύψος των 291bp σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen. Το δείγμα στη θέση 4 αντιστοιχεί σε δείγμα με μονή μόλυνση HPV-35, το οποίο δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης, ενώ στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Τα τρία πρώτα δείγματα έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης στο σωστό ύψος ενώ το δείγμα στη θέση 4 (HPV-35) καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας στη θέση 5 δεν έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης, γεγονός που υποδηλώνει 1) ότι η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων και 2) ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν είναι τυποειδικοί, ενισχύουν δηλαδή τμήμα του L1 γονιδίου μόνο του HPV-16.

6.2.2 PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV18F-HPV18R

Στην εικόνα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV18F/HPV18R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν επίσης στα πλαίσια της εργασίας αυτής ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-18:

M 1 2 3 4 5 6



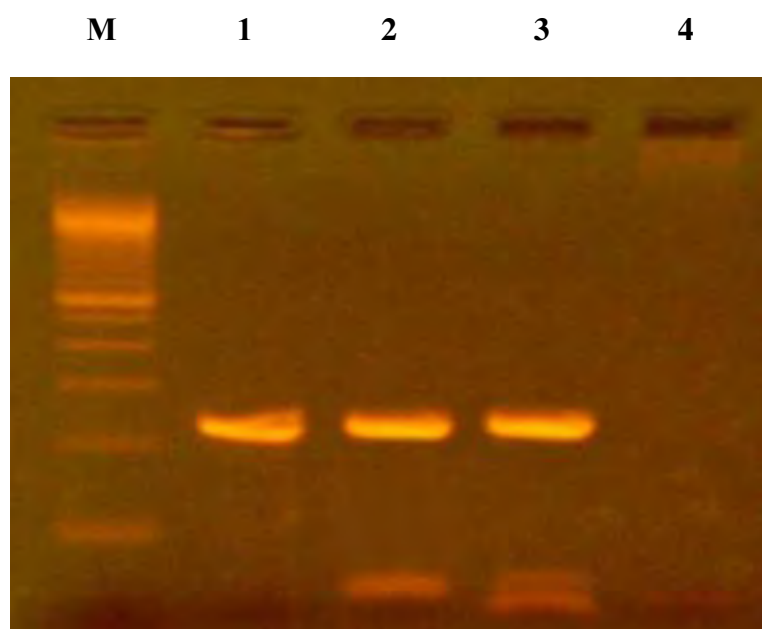
Εικόνα 6.4: Ενδεικτική εικόνα της PCR 4 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-4) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV18F/HPV18R σε πήκτωμα αгарόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στις θέσεις 5 και 6 έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα Rd και ddH₂O αντίστοιχα ως αρνητικοί μάρτυρες. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 292 bp. M=Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα του πηκτώματος αγαρόζης παρατηρούμε τα προϊόντα 4 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία όπως ήδη αναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR τμήματος της L1 περιοχής του HPV-18 με το ειδικό ζεύγος εκκινητών. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα τα οποία είχαν διαγνωστεί ως θετικά για τον HPV-18.

Το σήμα ενίσχυσης όλων των δειγμάτων αντιστοιχεί στο ύψος των 292 bp, όπως υποδεικνύεται από τον μάρτυρα μοριακού βάρους των 100 bp της Invitrogen. Στις θέσεις 6 και 7 έχουν χρησιμοποιηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες DNA εκχυλισμένο από κύτταρα Rd και ddH₂O αντίστοιχα, τα οποία όπως φαίνεται και στην εικόνα του πηκτώματος δεν έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα προϊόντα όλων των δειγμάτων βρίσκονται στο ίδιο ύψος φανερώνει ότι η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς και χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

6.2.3. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV45F-HPV45R

Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV45F/HPV45R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV45 στα πλαίσια της παρούσας εργασίας:

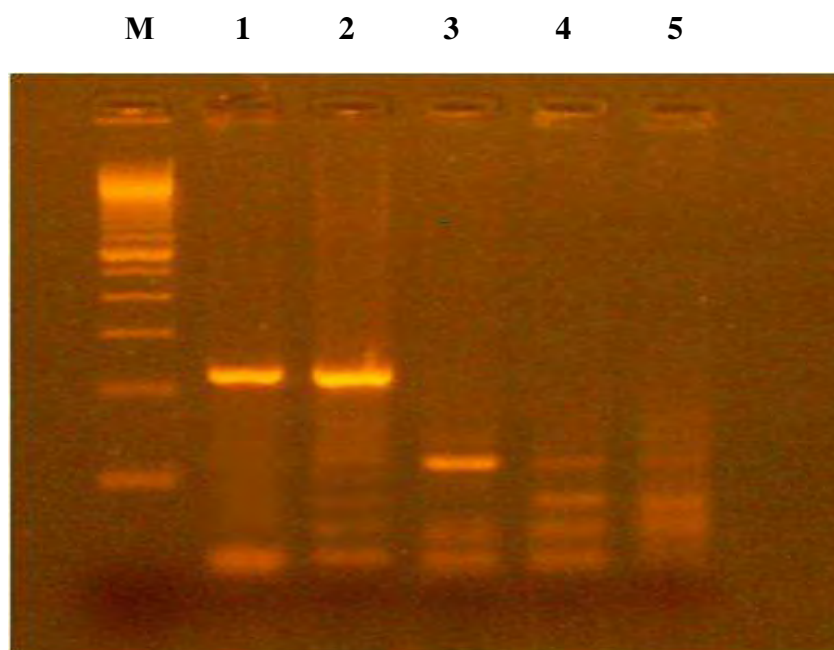


Εικόνα 6.5: Ενδεικτική εικόνα της PCR 3 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-3) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV45F/HPV45R σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 4 χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 233 bp. M=Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα μπορούμε να διακρίνουμε τα προϊόντα 3 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR τμήματος της περιοχής L1 του HPV45 με το ειδικό ζεύγος εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα HPV45 θετικά δείγματα.

Το σήμα ενίσχυσης που έδωσαν τα προϊόντα όλων των κλινικών δειγμάτων αντιστοιχεί στο ύψος των 233bp, όπως υποδεικνύει ο μάρτυρας μοριακού βάρους της Invitrogen. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, το οποίο όπως φαίνεται στην εικόνα δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης στην ίδια αντίδραση PCR δείγματα θετικά για το στέλεχος HPV45 και δείγματα με μονή μόλυνση HPV35. Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να διαπιστώσουμε εάν το ζεύγος εκκινητών HPV45F/HPV45R που σχεδιάστηκε ειδικά για την ενίσχυση του γονιδίου L1 του HPV45 ενισχύει την αντίστοιχη περιοχή του στελέχους HPV35, εξαιτίας της ομολογίας που εμφανίζουν τα δύο στελέχη στην περιοχή αυτή. Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV45F-HPV45R σε 4 ενδεικτικά κλινικά δείγματα:



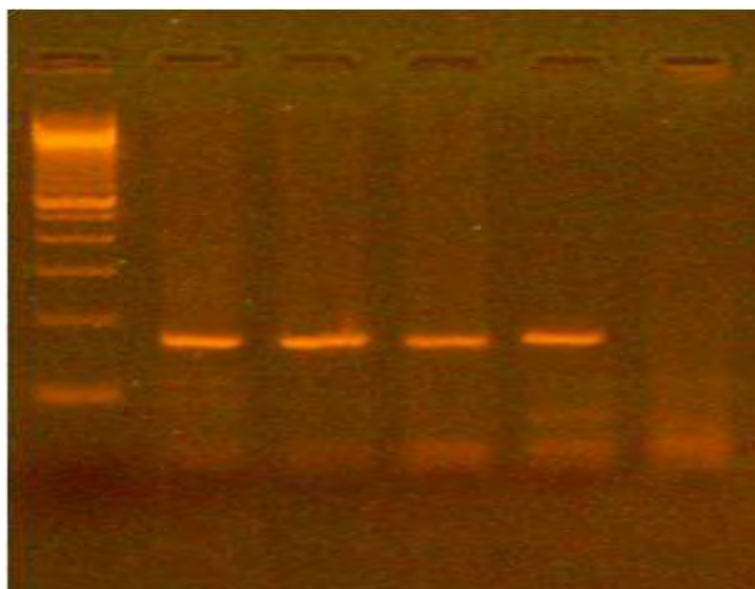
Εικόνα 6.6: Ενδεικτική εικόνα της PCR 2 κλινικών δειγμάτων θετικών για HPV45 (θέσεις 1,2) και 2 δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV35(θέσεις 3,4) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV45F/HPV45R σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα του πηκτώματος αгарόζης διακρίνουμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR 2 κλινικών δειγμάτων HPV-45 και 2 δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV-35, η οποία πραγματοποιήθηκε όπως ήδη αναφέρθηκε για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1. Όπως φαίνεται τα δείγματα στις θέσεις 2 και 3, που αντιστοιχούν σε HPV-45 θετικά δείγματα, έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος των 291bp σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen. Στις θέσεις 4 και 5 αντιστοιχούν δείγματα με μονή μόλυνση HPV-35 τα οποία δεν έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης στο ίδιο ύψος με τα HPV-45 θετικά δείγματα. Στη θέση 6 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O το οποίο επίσης δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης. Τα 2 τελευταία γεγονότα αποδεικνύουν ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ενισχύουν τμήμα του γονιδίου L1 μόνο του στελέχους HPV-45, είναι δηλαδή τυποειδικοί, και η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε επιτυχώς χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

6.2.4. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV66F-HPV66R

Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV66F/HPV66R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV66:

M 1 2 3 4 5



Εικόνα 6.7: Ενδεικτική εικόνα της PCR 4 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-4) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV66F/HPV66R σε πηκτωμα αгарόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 168 bp. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

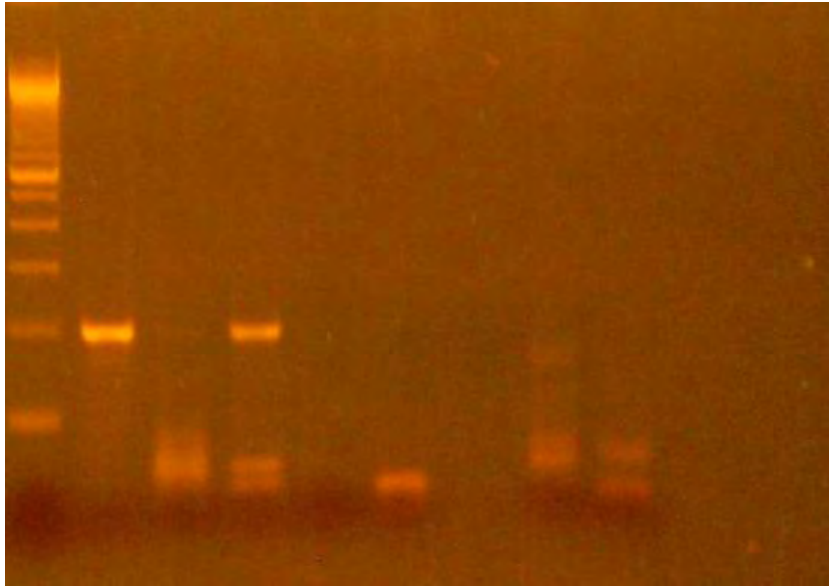
Στην παραπάνω εικόνα μπορούμε να παρατηρήσουμε τα προϊόντα ενίσχυσης 4 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-66 με το ζεύγος εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Στις θέσεις 2-5 τα δείγματα έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος των 168bp, όπως υποδεικνύεται από τον μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη θέση 6 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH₂O, το οποίο δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί σωστά και χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

Πραγματοποιήθηκε επίσης αντίδραση PCR με την ταυτόχρονη παρουσία δειγμάτων θετικών για το στελέχος HPV-66 και δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV-11. Η διαδικασία αυτή είχε στόχο να διαπιστώσουμε εάν το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV66F/HPV66R που σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση της περιοχής L1 του HPV-66 ενισχύει τμήμα της αντίστοιχης περιοχής του στελέχους HPV-6/11, λόγω της ομοιότητας που εμφανίζουν τα στελέχη αυτά στην αλληλουχία του γονιδίου L1. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης αυτής έδειξαν ότι τα θετικά δείγματα για τον HPV-66 εμφάνιζαν ζώνες ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος των 168bp ενώ τα δείγματα με μονή μόλυνση HPV-11 εμφάνιζαν ζώνες ενίσχυσης σε διαφορετικό ύψος σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen. Από το συνδυασμό των γεγονότων αυτών συμπεραίνουμε ότι οι εκκινητές που σχεδιάσαμε ενισχύουν τμήμα του γονιδίου L1 μόνο του στελέχους HPV-66, είναι επομένως τυποειδικοί.

6.2.5. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV33F-HPV33R

Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR 6 κλινικών δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV33F/HPV33R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV33:

M 1 2 3 4 5 6 7



Εικόνα 6.8: Ενδεικτική εικόνα της PCR 3 κλινικών δειγμάτων θετικών για HPV33 (θέσεις 1-3) και 3 δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV31(θέσεις 4-6) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV33F/HPV33R σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 7 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος των προϊόντων είναι 202bp. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK)

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR 3 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων θετικών για HPV-33 και 3 δειγμάτων με μονή μόλυνση HPV-31. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-33 ενισχύει την αντίστοιχη περιοχή του στελέχους HPV-31, εξαιτίας της ομολογίας στην αλληλουχία της L1 που εμφανίζουν τα στελέχη αυτά.

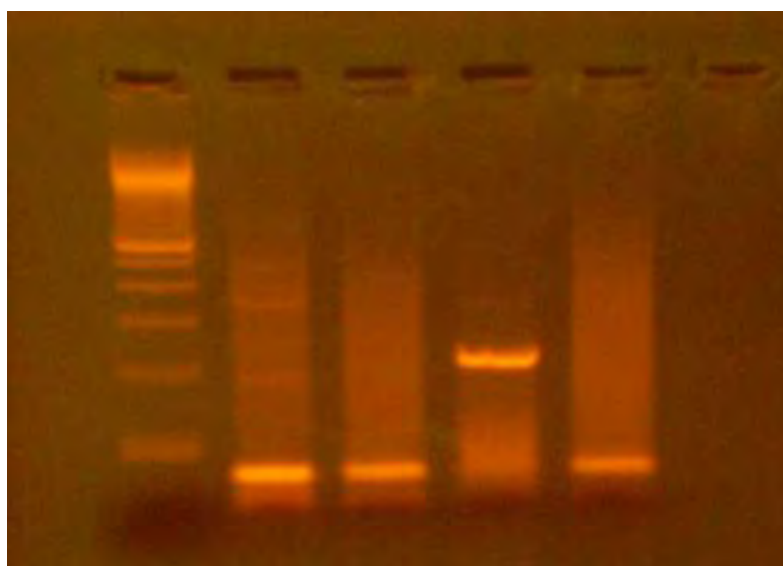
Όπως φαίνεται στην εικόνα του πηκτώματος αγαρόζης, τα δείγματα στις θέσεις 2-4, που αντιστοιχούν σε HPV-33 θετικά δείγματα, έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος των 202bp σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους. Στις θέσεις 5-7 αντιστοιχούν δείγματα με μονή μόλυνση HPV-31, τα οποία δεν έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης με εξαίρεση το δείγμα στη θέση 7 που εμφανίζει μια αχνή ζώνη σε διαφορετικό όμως ύψος από τα θετικά δείγματα για HPV-33. Στη θέση 8 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O, το οποίο επίσης δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της

μελέτης αυτής ενισχύουν τμήμα του γονιδίου L1 μόνο του στελέχους HPV-33, είναι δηλαδή τυποειδικοί, και η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε επιτυχώς χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

6.2.6 PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV35F-HPV35R

Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR 3 κλινικών δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV35F/HPV35R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV35:

M 1 2 3 4

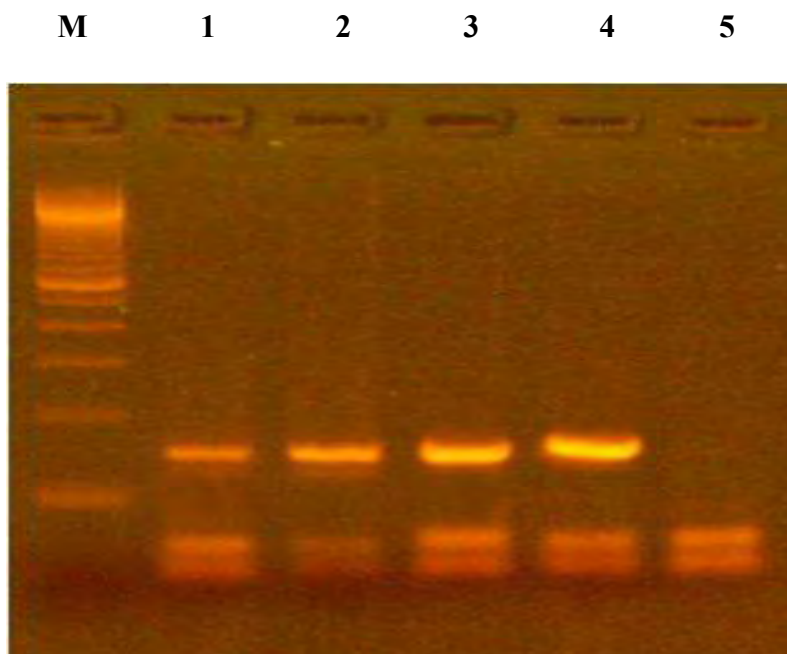


Εικόνα 6.9: Ενδεικτική εικόνα της PCR 3 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-3) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV35F/HPV35R σε πήκτωμα αгарόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 4 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 227 bp. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK)

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τα προϊόντα ενίσχυσης 3 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR τμήματος του L1 γονιδίου του στελέχους HPV35, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Βλέπουμε ότι το δείγμα στη θέση 4 έχει δώσει σήμα ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος των 227bp όπως υποδεικνύεται από τον μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH₂O, το οποίο δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης.

6.2.7. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV51F-HPV51R

Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR 4 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV51F/HPV51R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της μελέτης αυτής για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του HPV-51:

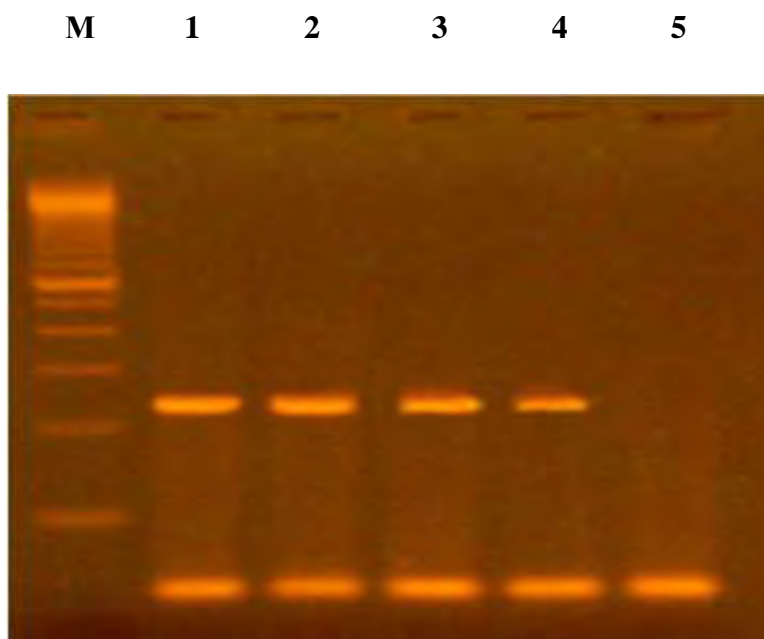


Εικόνα 6.10: Ενδεικτική εικόνα της PCR 4 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-4) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV51F/HPV51R σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 155bp. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην εικόνα του πηκτώματος αγαρόζης μπορούμε να διακρίνουμε τα προϊόντα της PCR 4 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του στελέχους HPV-51, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με το ειδικό ζεύγος εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν. Και τα 4 δείγματα στις θέσεις 2-5 έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο ύψος των 155bp σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen. Στη θέση 6 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, το οποίο δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί σωστά χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

6.2.8. PCR για την ενίσχυση του L1 γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών HPV58F-HPV58R

Παρουσιάζονται στην εικόνα 8 τα αποτελέσματα της PCR 4 κλινικών δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών HPV58F/HPV58R, οι οποίοι σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής:



Εικόνα 6.11: Ενδεικτική εικόνα της PCR 4 κλινικών δειγμάτων (θέσεις 1-4) με το ζεύγος εκκινητικών μορίων HPV58F/HPV58R σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση τμήματος του L1 γονιδίου. Στη θέση 5 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας. Το μέγεθος όλων των προϊόντων είναι 233bp. M= Μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούνται τα προϊόντα της PCR 4 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου L1 του στελέχους HPV-58 με το ειδικό ζεύγος εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν για το σκοπό αυτό. Όπως φαίνεται στο πήκτωμα αγαρόζης όλα τα δείγματα στις θέσεις 2-5 έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης που αντιστοιχεί στο ύψος των 233 bp, όπως ήταν αναμενόμενο, γεγονός που αποδεικνύει ότι έχει ενισχυθεί το σωστό τμήμα του γονιδιώματος του ιού. Στη θέση 6 έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας το οποίο δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης, επομένως η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί σωστά χωρίς την παρουσία επιμολύνσεων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα είναι πλέον αδιαμφισβήτητη η συσχέτιση της μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με την ανάπτυξη τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων που μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο το τραχήλου της μήτρας. Ασθενείς με διατηρούμενες μολύνσεις με τον ίδιο HPV γενότυπο βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο εξέλιξης της μόλυνσης σε καρκίνο. Ο καρκίνος του τραχήλου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί την τρίτη πιο κοινή κακοήθεια του γυναικείου γεννητικού συστήματος και την δεύτερη πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin et al., 2000, Pisani et al., 2002). Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιείται συνεχής προσπάθεια για την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης ολοένα και μεγαλύτερου φάσματος HPV γενοτύπων. Η διάγνωση των HPV μολύνσεων βασίζεται πλέον σε μεγάλο βαθμό στην ανίχνευση των ιικών DNA αλληλουχιών που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων διάγνωσης σε μεγάλη ποικιλία κλινικών δειγμάτων. Τα τελευταία χρόνια επιδιώκεται όλο και περισσότερο η χρήση μοριακών τεχνικών ως επιπρόσθετο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση HPV λοιμώξεων προκειμένου να βελτιωθεί η ειδικότητα των ήδη υπάρχοντων κυτταρολογικών μεθόδων και να μειωθεί ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από τα κυτταρολογικά τεστ. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι το Hybrid Capture II test, που αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κλινική δοκιμασία, και τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Οι τελευταίες χρησιμοποιούν είτε τυποειδικούς εκκινητές, οι οποίοι στοχεύουν γενωμικές περιοχές όπως τα E6 και E7 ιικά γονίδια και ενισχύουν συγκεκριμένους HPV γενότυπους, είτε εκφυλισμένους εκκινητές που στοχεύουν περιοχές συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών HPV στελεχών όπως η γενωμική περιοχή L1. Η χρήση εκφυλισμένων εκκινητών, όπως είναι οι συνδυασμοί MY09/MY11, PGMY09/PGMY11, GP5+/GP6+ και SPF10 (63,150,64) που ενισχύουν την L1 περιοχή, δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός ευρέως φάσματος HPV γενοτύπων. Όμως για την ακριβή ταυτοποίηση απαιτούνται περαιτέρω διαδικασίες όπως ο υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων, επεξεργασία με ενδονουκλεάσες περιορισμού ή άμεση αλληλούχιση μετά την αρχική ενίσχυση με PCR της L1 περιοχής. Για το λόγο αυτό στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας προσπαθήσαμε να σχεδιάσουμε εκκινητικά μόρια για την τυπο-ειδική ανίχνευση 8 στελεχών HPV υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16,-18,-45,-66,-33,-35,-51,-58) με την ενίσχυση τμήματος της L1 γενωμικής περιοχής. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο

ώστε για κάθε στέλεχος να ενισχύεται ειδικά τμήμα της L1 και να είναι δυνατή η διάκριση των στελεχών βάσει του διαφορετικού μεγέθους του ενισχυμένου τμήματος.

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αρχικά σχεδιάστηκαν τα 8 ζεύγη εκκινητικών μορίων με τη βοήθεια του προγράμματος **primer 3**. Για το σχεδιασμό αρχικά ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων Genebank όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες της L1 περιοχής για κάθε ένα από τα στελέχη HPV. Ακολούθησε ομοπαράθεση των αλληλουχιών της L1 κάθε στελέχους με το πρόγραμμα **MEGA**, με τελικό σκοπό να επιλεγούν οι συντηρημένες περιοχές των απομονωμένων αλληλουχιών L1 του ίδιου στελέχους. Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν εκκινητές επάνω στις συντηρημένες αυτές περιοχές με την χρήση του προγράμματος **primer 3**, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Αφού έγινε ομοπαράθεση των εκκινητικών αλληλουχιών στο πρόγραμμα **BLAST**, απομονώθηκαν οι τύποι HPV που εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιότητα στην L1 γενωμική περιοχή και σχεδιάστηκαν εκ νέου τυποειδικοί εκκινητές. Τέλος έγιναν επιπλέον έλεγχοι συμπληρωματικότητας των εκκινητών που σχεδιάστηκαν με μη ειδικά στελέχη HPV με τη βοήθεια του προγράμματος **MEGA**.

Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία σχεδιασμού, ακολούθησε μια σειρά αντιδράσεων PCR με τα νέα εκκινητικά μόρια. Χρησιμοποιήσαμε συνολικά 122 κλινικά δείγματα για τις αντιδράσεις PCR, τα οποία ήταν ήδη ταυτοποιημένα για τα στελέχη που εξετάζουμε με άλλες μεθόδους όπως Nested Multiplex PCR και HPV microarrays. Οι συνθήκες που εφαρμόσαμε στις διάφορες αντιδράσεις PCR ήταν όσο το δυνατόν πιο αυστηρές προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν μη ειδικός υβριδισμός των εκκινητών και κατά συνέπεια μη ειδική ενίσχυση. Για τη βελτιστοποίηση αυτών χρησιμοποιήσαμε αρχικά διαφορετικούς συνδυασμούς συγκέντρωσης $MgCl_2$ και θερμοκρασίας υβριδισμού. Πραγματοποιήθηκαν ορισμένες επιπλέον αντιδράσεις PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί η τυποειδικότητα των εκκινητών, εάν δηλαδή οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ειδικά για κάθε στέλεχος ενισχύουν την περιοχή L1 άλλων HPV στελεχών. Ειδικότερα στελέχη τα οποία εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους στη συγκεκριμένη περιοχή είναι τα: HPV-16 με HPV-35, HPV-45 με HPV-35, HPV-66 με HPV-6/11 και HPV-33 με HPV-31. Για το λόγο αυτό για τα στελέχη HPV-16,-45,-66 και -33 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ενίσχυσης με PCR στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα με μονή μόλυνση για τους HPV-35,-35,-11 και -31 αντίστοιχα. Τέλος έγινε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων σε gel αγαρόζης 2% για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα των νέων εκκινητικών μορίων ως προς την τυποειδική ενίσχυση της L1 περιοχής.

Συνολικά από την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο διαπιστώσαμε ότι η εφαρμογή της PCR με τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάσαμε στα πλαίσια

της εργασίας αυτής είναι αποτελεσματική και κάθε ζεύγος εκκινητών ενισχύει αντίστοιχα την γενωμική περιοχή L1 του στελεχούς για το οποίο σχεδιάστηκε. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα αγαρόζης, καθώς τα ενισχυμένα τμήματα της L1 όλων των δειγμάτων για κάθε στέλεχος έδωσαν σήμα ενίσχυσης στο αναμενόμενο ύψος σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen που χρησιμοποιήθηκε. Έγιναν επιπρόσθετα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συγκριτικές μελέτες μεταξύ στελεχών τα οποία εμφάνιζαν μεγάλη ομοιότητα στην περιοχή L1. Με τη διαδικασία αυτή επιβεβαιώθηκε ότι οι εκκινητές είναι τυποειδικοί και δεν ενισχύουν την περιοχή L1 άλλων HPV στελεχών, ακόμη κι αν αυτά παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομολογία. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι με τη διαδικασία της απλής PCR και τη χρήση τυποειδικών για την L1 εκκινητικών μορίων, εφαρμόζοντας τις κατάλληλες συνθήκες είναι δυνατή η ανίχνευση και ταυτοποίηση HPV στελεχών υψηλής επικινδυνότητας. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις μελέτες των Christine Weyn και συνεργατών (Christine Weyn et al 2007) καθώς και των Ching-Yu Lin και συνεργατών (Ching-Yu Lin et al 2008) οι οποίοι ακολούθησαν παρόμοια πειραματική διαδικασία για την ανίχνευση 2 HPV στελεχών υψηλού κινδύνου (HPV-45 και HPV-51) και 20 HPV στελεχών υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού κινδύνου (HPV-6,-11,-16,-18,-31,-33,-35,-39,-45,-51,-52,-53,-56,-58,-59,-62,-66,-68,-70,-71) αντίστοιχα. Από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι οι μέθοδοι της L1-τυποειδικής PCR που αναπτύχθηκαν και από τις δύο ερευνητικές ομάδες μπορούσαν να ανιχνεύσουν τα παραπάνω στελέχη σε διάφορα κλινικά δείγματα ενώ δεν ενίσχυαν μη ειδικούς HPV γενότυπους.

Συμπερασματικά η μέθοδος της PCR με τη χρήση L1-τυποειδικών εκκινητών είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV υψηλής καθώς και ενδιάμεσης και χαμηλής επικινδυνότητας και μπορεί να αποτελέσει σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση HPV λοιμώξεων σε μοριακό επίπεδο πριν από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Η πρόωμη διάγνωση μιας HPV μόλυνσης, ειδικά από στελέχη υψηλού κινδύνου όπως αυτά που εξετάζουμε, είναι καθοριστικής σημασίας αφού πρόκειται για στελέχη που σχετίζονται άμεσα με την πρόκληση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή ανίχνευση των HPV στελεχών.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής καταφέραμε σε πρώτο επίπεδο να σχεδιάσουμε τυποειδικούς εκκινητές στην L1 γενωμική περιοχή για την ανίχνευση 8 HPV στελεχών με την εφαρμογή της απλής PCR σε κλινικά δείγματα. Αν και η μέθοδος αυτή έχει αποδειχτεί ότι είναι αρκετά γρήγορη σε σχέση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης, ωστόσο στην περίπτωση ύπαρξης πολλαπλών μολύνσεων σε ορισμένα δείγματα απαιτείται η

πραγματοποίηση πολλών αντιδράσεων PCR καθώς είναι δυνατή η ανίχνευση ενός μόνο στελέχους σε κάθε αντίδραση. Για το λόγο αυτό επόμενο βήμα ερευνητικού ενδιαφέροντος είναι η χρήση των τυποειδικών αυτών εκκινητών για την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου Multiplex PCR, με το οποίο θα είναι δυνατή η ανίχνευση πολλαπλών μολύνσεων HPV σε μία μόνο αντίδραση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ♦ Antonsson A, McMillan N. A. 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-3200.
- ♦ Antson, A. A, Burns J. E, Moroz O. V, Scott D. J, Sanders C. M, Bronstein I. B, Dodson G. G, Wilson K. S, and Maitland N. J. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805-809
- ♦ Artandi S. E, Attardi L. D. 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*(3):881-890
- ♦ Ashrafi G. H, Brown D. R, Fife K. H, Campo M. S. 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res.* (1-2):208-211
- ♦ Baker T. S, Newcomb W. W, Olson N. H, Cowser L. M, Olson C and Brown J. C. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60:1445–1456
- ♦ Bernard H. U. 2002. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir. Ther.* 7:219-237
- ♦ Bishop B, Dasgupta J, Chen X. 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virol. J.* 4:3
- ♦ Boiron M, Levy J. P, Thomas M, Friedmann J. C and Bernard J. 1964. Some properties of bovine papilloma virus. *Nature* 201:423-424
- ♦ Boring C. C, Squires T. S, Tong T. and Montgomery S. 1994. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 44:7-26.
- ♦ Bosch F. X. 1995. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst.* 87:796-802.
- ♦ Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W and zur Hausen, H, 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3:1151-1157
- ♦ Brehm A. E, Miska A, McCance D. J, Reid J. L, Bannister A. J and Kouzarides T. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597-601
- ♦ Bryan J. T, Brown D. R. 2001. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 281:35-42
- ♦ Buck C.B, Pastrana D. V, Lowy D. R, Schiller J. T, 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* 2:751-757

- ♦ Cates W. Jr. and the American Social Health Association Panel. 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex. Transm. Dis.* 26(4suppl):S2-S7
- ♦ Chan Shih-Yen, Delius H, Halpern A. L. and Bernard H. U. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 69(5):3074-3083.
- ♦ Chang, Y. E. and Laimins L.A. 2000. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as a major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 74:4174-4182
- ♦ Chen G. and Stenlund A. 2000. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J. Virol.* 74:1506-1512
- ♦ Clifford G. M, Smiths J. S, Aguado T, Franceschi S. 2003. Comparison of HPV types distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 89:101-105
- ♦ Conger K. L, Liu J. S, Kuo S. R, Chow L.T. and Wang T. S. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* 274:2696-2705
- ♦ Conrad M, Bubb V. J. 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. *J. Virol.* 67:6170-6178.
- ♦ Craven S. E. and Brecht D. S. 1998. PDZ proteins organize synaptic signalling pathways. *Cell* 93:495-498
- ♦ Crawford L. V. and Crawford E. M. 1963. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology* 21:258-263
- ♦ Cripe, T. P, Haugen T. H, Turk J. P, Tabatabai F, Schmid P. G III, Durst M, Gissmann L, Roman A. and Turek L. P. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745-3753.
- ♦ Crusius K, Rodriguez I. and Alonso A. 2000. The human papillomavirus type16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* 20: 65-69
- ♦ Culp T. D, Budgeon L. R, Marinkovich M. P, Meneguzzi G, Christensen N. D. 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells 1: *J Virol.* 18:8940-8950
- ♦ Danos O, Katinka M, Yaniv M. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1:231-236

- ♦ Davy C. E, Jackson D. J, Wang Q, Raj K, Masterson P. J, Fenner N. F, Southern S, Cuthill S, Millar J. B, Doorbar J. 2002. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 19:9806-9818
- ♦ Day P. M, Baker C. C, Lowy D. R, Schiller J. T. 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci.* 39:14252-14257
- ♦ Demeret C, Desaintes C, Yaniv M. and Thierry F. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71:9343-9349
- ♦ De Villiers E. M, Fauquet C, Broker T. R, Bernard H. U. and zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- ♦ Disbrow G. L, Hanover J. A. and Schlegel R. 2005. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal Ph but not trans-Golgi Ph. *J. Virol.* 79:5839-5846
- ♦ Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110:525–541
- ♦ Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C. and Crawford L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-827
- ♦ Dostatni N, Lambert P. F, Sousa R, Ham J, Howley P. M. 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 Dev.* 5:1657-1671
- ♦ Dowhanick J. J, McBride A. A. and Howley P.M. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 69:7791-7799.
- ♦ Durst M, Gissmann L, Ikenberg H. and zur Hausen H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80: 3812-3815
- ♦ Dyson N, Howley P. M, Munger K. and Harlow E. 1989. The human papillomavirus virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937
- ♦ Edmonds C. and Vousden K. H. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J.Virol.* 63:2650-2656
- ♦ Enemark E. J, Chen G, Vaughn D. E, Stenlund A. and Joshua-Tor L. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation oritein E1 from papillomavirus. *Mol. Cell* 6:149-158
- ♦ Fang L, Budgeon L.R, Doorbar J, Briggs E.R, Howett M.K. 2006. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology* 2:271-279

- ♦ Fehrmann F, Klumpp D. J. and Laimins L. A. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 77:2819-2831
- ♦ Fields B. N, Knipe D. and Howley P. M. (ed.). 1996. *Fields virology*, 3rd ed., p. 2060. Lippincott-Raven Publishers
- ♦ Finnen R. L, Erickson K. D, Chen X. S, Garcea R. L. 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 8:4818-4826.
- ♦ Flores E, Allen-Hoffman B. L, Lee D. and Lambert P. F. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622-6631
- ♦ Florin L, Sapp C, Streek R. E, Sapp M. 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 76:10009-10014
- ♦ Foster S. A, Demers G. W, Etscheid B. G. and Galloway D. A. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68:5698-5705
- ♦ Frattini M. G. and Laimins L. A. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer – binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12398-12402
- ♦ Frattini M. G. and Laimins L. A. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799-804
- ♦ Friedmann J. C, Levy J. P, Lasnaret J, Thomas M, Boiron M. and Bernard J. 1963. Induction of subcutaneous fibromas in the golden hamster by inoculation of bovine papilloma acellular extracts. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 257:2328-2331
- ♦ Funk J. O, Waga S, Harry J. B, Espling E, Stillman B. and Galloway D. A. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090-2100
- ♦ Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders P. J, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M. 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin. Microbiol.* 44(6):2025-2031
- ♦ Gillison 2001. *J. National Cancer inst.*
- ♦ Gomberts S. N. 1996. Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* 84:659-
- ♦ Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry K.U, Iftner T. 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J. Virol.* 70:2339-2349

- ♦ Greenberg R. A, Hagan R. C. O, Deng H, Xiao Q, Hann S. R, Adams R. R, Lichtseiner S, Chin L, Morin G. B. and DePinho R. A. 1999. Telomerase reverse transcriptase equivalent in cellular transformation gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18:1219-1226
- ♦ Harwood C. A. and Proby C. M. 2002. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15:101-114
- ♦ Hagensee M. E, Olson N. H, Baker T. S, Galloway D. A. 1994. Three-Dimensional Structure of Vaccinia Virus-Produced Human Papillomavirus Type 1 Capsids. *J. Virol.* 4503-4505
- ♦ Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister H. J. and Smola-Hess S. 2003. The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J. Virol.* 77:5253-5265
- ♦ Han Y, Loo Y. M, Militello K. T. and Melendy T. 1999. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus DNA type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen with human replication protein A. *J. Virol.* 73:4899-4907
- ♦ Hawley-Nelson P, Vousden K. H, Hubbert N. L, Lowy D. R. and Schiller J. T. 1989. HPV 16 E6 and E7 protein cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8:3905-3910
- ♦ Hegde R. S, Grossman S. R, Laimins L. A. and Sigler P. B. 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505-512
- ♦ Heise A. 2003. The clinical significance of HPV *Nurse Pract.* 10:8-19
- ♦ Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* 9:4431-4439
- ♦ Ho G. Y, Bierman R, Beardsley L, Chang C. J, Burk R. D. 1998. Natural History of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl J Med.* 338:423-428
- ♦ Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu T.-C. 2008. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus, *J Formos Med Assoc.* 107(3):198–217
- ♦ Howley P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication. 947-978. *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa
- ♦ Hubbert N. L, Sedman S. A. and Schiller J. T. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 66:6237-6241
- ♦ Hughes F. J. and Romanos M. A. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 21:5817-5823.
- ♦ Huibregtse J. M, Scheffner M. and Howley P. M. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J.* 10:4129-4135

- ♦ Huibregtse J. M, Scheffner M. and Howley P. M. 1993. Cloning and expression of the Cdna for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13:775-784
- ♦ Hutchinson, M. L, Isenstein M, Goodman A, Hurley A. A, Douglass K. L, Mui K .K, Patten F. W. and Zahniser D. J. 1994. Homogenous sampling accounts for increased diagnostic accuracy using the Thinprep Processor. *AM. J. Clinn. Pathol.* 101:215-219
- ♦ Hwang E. S, Nottoli T. and Dimaio D. 1995. The HPV16 E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane protein in COS cells. *Virology* 211:227-233
- ♦ Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K. and Kanda T. 2001. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein 12 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J. Virol.* 75: 2331-2336
- ♦ Kesis T. D, Slebos R. J, Nelson W.G, Kastan M. B, Plunkett B. S, Han S. M, Lorincz A. T, Hedrick L. and Cho K. R. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3988-3992.
- ♦ Kim J. J, Wright T. C. and Goldie S. J. 2002. Cost effectiveness of alternative triage studies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA* 287:2382-2390
- ♦ Kiyono T, Foster S. A, Koop J. I, McDougall J. K, Galloway D. A. and Klingelutz A. J. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84-88
- ♦ Klester B, van Doorn L. J, Schrauwen L, Molijin A, Sastrowijoto S, TerScheget J, Lindeman J, Ter Harmsel B, Burger M. and Quint W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 37:2508-2517
- ♦ Ko L. and Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072
- ♦ Kurman, R. J, Henson D. E, Herbst A. L, Noeller K. L. and Schiffman M. H. 1994. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Workshop, *JAMA* 271:1866-1869
- ♦ Laimins L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, 201-223. In D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. American Society for Microbiology
- ♦ Lechner M. S. and Laimins L. A. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 68:4262-4273
- ♦ Lee J. S. J, Wilhelm P, Kuan L, Ellison D.G, Lei X, Oh S. and Patten S. F. 1997. AutoPap system performance is screening for low prevalence and small cell abnormalities. *Acta Cytol.* 41:56-64
- ♦ Lin C, Chao A, Yang Y, Chou H, HO C, Lin R, Chang T , Chiou J, Chao F, Wang K, Chien T, Hsueh S, Huang C, Chen C, Lai C. 2008. Human papillomavirus typing with a

polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. *J. Clin. Virol.* 42:361-367

- ♦ Liu J. S, Kuo S. R, Makhov A. M, Cyr D. M, Griffith J. D, Broker T. R. and Chow L. T. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 273:30704-30712
- ♦ Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104
- ♦ Lizard G, Ashfaq M. J, Birdsong G. G, Corkill M. E, McIntosh K. M. and Inhorn S. L. 1997. Comparison of single-copy human papillomavirus on isolated cells using a catalyzed signal amplification system. *Gen Point. Diagn. Cytopathol.* 24:112-116
- ♦ Longworth M.S. and Laimins L. A. 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541
- ♦ Loo Y. M. and Melendy T. 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* 78:1605-1615
- ♦ Lorincz A. T, Quinn A. P, Goldsborough M.D, McAllister P. and Temple G. F. 1989. Human papillomavirus type 56. a new virus detected in cervical cancers, *J. Gen. Virol.* 70:3099-3104
- ♦ Ma T, Zou N, Lin B.Y, Chow L. T. and Harper J. W. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replicatio-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:382-387
- ♦ Mahdavi A and Monk B. J. 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist* 10:528-538
- ♦ Marks P, Rifkind R. A, Richon V. M, Breslow R, Miller T. and Kelly W. K. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1:194-202
- ♦ Martin L. G, Demers G. W. and Galloway D. A. 1998. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J. Virol.* 72:975-985
- ♦ Masterson P. J, Stanley M. A, Lewis A. P. and Romanos M. A. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus type E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* 72:7407-7419
- ♦ Matsukura T. and Sugase M. 1995. Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int. J. Cancer* 61:13-22
- ♦ Meyerson M, Counter C. M, Eaton E. N, Ellisen L. W, Steiner P, Caddle S. D, Ziaugra L, Beijersbergen R. L, Daviddoff M. J, Liu Q, Bachetti S, Haber D. A. and Weinberg R. A.

1997. Hest, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795

- ♦ Middleton K, Peh W, Southern S. A, Griffin H. M, Sotlar K, Nakahara T, El- Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P. F, Coleman N. and Doorbar J. 2003. Organization of the human papillomavirus productive life cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol.* 77:10186-10201
- ♦ Moddis Y, Trus B. L. and Harrison S. C. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21:4754-4762
- ♦ Molano M, Posso H, Wederpass E et al. 2002. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal Cytology. *Br J Cancer* 87:324-333
- ♦ Moscicki A. B, Hills N, Shiboski S et al. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 285:2995-3002
- ♦ Muller F, Giroglou T. and Sapp M. 1997. Characterization of the DNA-binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J. Gen. Virol.* 78:911-915
- ♦ Muñoz N, Bosch F. X, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P, Meijer C. 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 348(6):518-527
- ♦ Munoz N, Bosch F. X, de Sanjose S, Tafur L, Isarzugaza I, Gilli M, Viladiu P, Navarro C, Martos C. and Asunce N. 1992. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J. Cancer* 52:743-749
- ♦ Nguyen M. L, Nguyen M. M, Lee D, Griep A. E. and Lambert P. F. 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type E6 protein is required for E6 s induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol.* 77:6957-6964
- ♦ Olson C, Pamukcu A. M, Brobst D. F, Kowalczyk T, Satter E. J. and Price J. M. 1959. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res.* 19:779-782
- ♦ Orth G, Favre M. and Croissant O. 1977. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* 24:108-120
- ♦ Orth G, Jablonska S, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G, Obalek S, Favre M. and Croissant O. 1979. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. *Cancer Res.* 39:1074-1082
- ♦ Ozbun M. A. and Meyers C. 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 72:2715-2722

- ♦ Parkin D. M, Bray F, Ferlay J. and Pisani P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan. *Int. J. Cancer* 94:153-156
- ♦ Persson G, Andersson K. and Krantz I. 1996. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 75:287-290
- ♦ Pfister H. 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31:52-56
- ♦ Phelps W. C, Yee C. L, Munger K. and Howley P. M. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53:539-547
- ♦ Pisani, P., F. Bra, and D. M. Parkin, 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* 97:72-81
- ♦ Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. 2004. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol.* 13:7199-207
- ♦ Roberts S, Ashmole I, Gibson L. J, Rookes S. M, Barton G. J, Gallimore P. H. 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.* 10:6432-45.
- ♦ Roden R. B, Day P. M, Bronzo B. K, Yutzy W. H, Yang Y, Lowy D. R. et al. 2001. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J. Virol.* 75:10493-10497
- ♦ Rosenstierne M. W, Vinther J, Hansen C. N, Prydsoe M, Norrild B. 2003. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol* 84:2909-2920
- ♦ Schadlich L, Senger T, Gerlach B, Mucke N, Klein C. 2009. Analysis of Modified Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsomeres: the Ability to Assemble into Larger Particles Correlates with Higher Immunogenicity. *J. Virol.* 83(15): 7690–7705.
- ♦ Schiffman M. H, Bauer H. M, Hoover R. N, Glass A. G, Cadell D. M, Rush B. B, Scott D. R, Sherman M. E, Kurman R. J. and Wacholer S. 1993. *J. Natl. Cancer Instit.* 85:958-964
- ♦ Schneider-Gadicke A. and Schwarz E. 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5:2285-2292.
- ♦ Sedman J. and Stenlund A. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72:6893-6897
- ♦ Shafti-Keramati S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 24:13125-13135

- ♦ Singer A, Ho L, Terry G. and Kwie T. S. 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In A. Mindel (ed.), Genital warts: human papillomavirus infection. 105-129
- ♦ Smotkin D. and Wettstein F. O. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell-line and identification of the E7 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 4680-4684
- ♦ Sorathia R, Davy C, Sterlinko H. et al. 2004. The E4 protein of HPV16 Interacts with E2 and regulates the trans-activation and replication functions of E2. 21st International Papillomavirus Conference 318
- ♦ Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. J Clin Microbiol. 42(7):3176-3184
- ♦ Spitzer M. 1998. Cervical screening adjuncts: recent advances. Am J. Obstet. Gynecol. 179:544-2119
- ♦ Stacey S. N, Jordan D, Williamson A. J, Brown M, Coote J.H. and Arrand J.R. 2000. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA , J Virol 74:7284-7297
- ♦ Steger G. and Corbach S. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. J. Virol. 71:50-58
- ♦ Stubenrauch F, Lim H. B. and Laimins L. A. 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in teh life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. J. Virol. 72:1071-1077
- ♦ Straight S. W, Herman B. and McCance D. J. 1995. The E5 oncoprotein of HPV 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. J. Virol. 69: 3185-3192
- ♦ Strauss M. J, Shaw E. W, Bunting H. and Melnick J. L. 1949. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72: 46-50
- ♦ Swindle C. S. and Engler J. A. 1998. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. J. Virol. 72:1994-2001
- ♦ Thomson D. A, Belinsky G, Chang T. H, Jones D. L, Schhegel R. and Munger K. 1997. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. Oncogene 15:3025-3035
- ♦ Trus B. L, Roden R. B, Greenstone H. L, Vrhel M, Schiller J. T. and Booy F. P. 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 A resolution. Nat.Struct. Biol. 4:413-420
- ♦ Yoshioka N, Inoue H, Nakanishi K, Oka K, Yutsudo M, Yamashita A, Hakura A. and Nojima H. 2000. Isolation of transformation suppressor genes by Cdna subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K- ras. J. Virol. 74:1008-1013

- ♦ You J, Croyle J. L, Nishimura A, Ozato K, Howley P. M. 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117:349-360
- ♦ Yoon C. S, Kim K. D, Park S. N, Cheong S. W. 2001. Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:668-673
- ♦ Veldman T, Liu X, Yuan H. and Schlegel R. 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:8211-8216
- ♦ Von Knebel Doeberitz M. 2002. New markers for for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections, *Eur J Cancer* 38:2229-1638
- ♦ 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* 20:4740-4749
- ♦ Weintraub S. J, Chow K. N, Luo R. X, Zhang S. H, He S. and Dean D. C. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 375:812-815
- ♦ Weyn C, Boulenouar S, Mathys V, Vanhoolandt J, Bernis A, Fontaine V. 2007. Detection of human papillomavirus type 45 and 51 by type-specific polymerase chain reaction. *J. of Virol Methods.* 146: 405-408
- ♦ Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA., 2005. Role of the E1--E4 protein in the protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 79(11):6732-6740
- ♦ Wood C. E, Chen Z, Cline J. M, Miller B. E. and Burk R. D. 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol.* 81(12):6339-6345
- ♦ Zur Hausen H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 36:794
- ♦ Zur Hausen H. 2000. *J. National Cancer inst.*
- ♦ Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350
- ♦ Zur Hausen H. 1996 Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288:55-78
- ♦ Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W. and Bornkamm G. W. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer* 13:650-656