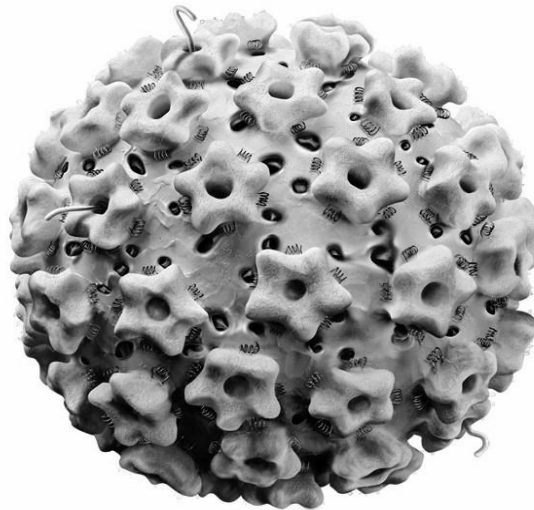


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Διπλωματική Εργασία

“Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53. Σύνδεση με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες καθώς και με τον αναδιπλασιασμό 63 νουκλεοτιδίων στο γονίδιο E1 του ιού HPV 16”



Μάστορα Κ. Ειρήνη

2016

**“Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης p53. Σύνδεση με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες καθώς και με τον αναδιπλασιασμό 63 νουκλεοτιδίων στο γονίδιο E1 του ιού HPV 16”**

**“Codon 72 polymorphism of TP53. Association with low and high grade’s dysplasias and the E1 1374<sup>63nt</sup> duplication in HPV 16 virus”**

**Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Επιβλέπων διδάσκων**

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης**

**Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη  
Βιοτεχνολογία**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Μέλη**

**Αμούτζιας Γρηγόριος**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Μόσιαλος Δημήτριος**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

## Ευχαριστίες

Σ' αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά κυρίως για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Αποτελεί για μένα πρότυπο επιστήμονα και παράδειγμα δασκάλου με αξιοπρέπεια, ήθος και ευγένεια.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοπληροφορικής στη Γενωμική και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας, μα και για την προθυμία τους να με καθοδηγήσουν σε οποιοδήποτε επίπεδο.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στο διδάκτορα Τσακογιάννη Δημήτριο, για τις επιστημονικές υποδείξεις, τις συστάσεις και την πολύτιμη βοήθειά του και ένα ακόμη στον υποψήφιο διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για τη συνεργασία και τη συνολική στήριξή του.

Φυσικά, οφείλω το σπουδαιότερο ευχαριστώ στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Αριστούλα και στην αδελφή μου Αικατερίνη, για όλα αυτά τα χρόνια που τους έχω δίπλα μου να μ' αγαπούν και να με προσέχουν...

# Περιεχόμενα

## Περίληψη

### 1. Εισαγωγή

- 1.1. Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)
- 1.2. Ταξινόμηση των Human Papilloma Viruses (HPVs)
  - 1.2.1. Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu Papillomaviruses
- 1.3. Δομή των Human Papilloma Viruses (HPVs)
  - 1.3.1. Δομή του καψιδίου
  - 1.3.2. Οργάνωση του γενώματος
    - 1.3.2.1. Ιική πρωτεΐνη E1
    - 1.3.2.2. Ιική πρωτεΐνη E2
    - 1.3.2.3. Ιική πρωτεΐνη E4
    - 1.3.2.4. Ιική πρωτεΐνη E5
    - 1.3.2.5. Ιική ογκοπρωτεΐνη E6
    - 1.3.2.6. Ιική ογκοπρωτεΐνη E7
    - 1.3.2.7. Ιική πρωτεΐνη L1
    - 1.3.2.8. Ιική πρωτεΐνη L2
  - 1.3.3. Μορφή του γενώματος
- 1.4. Κύκλος ζωής των Human Papilloma Viruses (HPVs)
  - 1.4.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο
  - 1.4.2. Αντιγραφή του ιικού γενώματος
  - 1.4.3. Μεταγραφή του ιικού γενώματος
  - 1.4.4. Σύνθεση του ιικού γενώματος
  - 1.4.5. Έξοδος του ιού από το κύτταρο
  - 1.4.6. Ιστολογικές αλλοιώσεις

- 1.5. Ιστορία της πρωτεΐνης TP53
- 1.6. Ανακάλυψη της πρωτεΐνης TP53
- 1.7. Μονοπάτια της πρωτεΐνης TP53
- 1.8. Γονίδιο της πρωτεΐνης TP53, Πρωτεΐνη TP53, Πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης TP53
- 1.9. Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο
- 1.10. Μηχανισμοί απώλειας της πρωτεΐνης TP53
- 1.11. Αποπτωτικές δράσεις της πρωτεΐνης TP53
- 1.12. Αποπτωτικά μηνύματα ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη TP53
- 1.13. Ρύθμιση της αποπτωτικής ενεργότητας της πρωτεΐνης TP53
- 1.14. Άλλα επίπεδα ρύθμισης της αποπτωτικής ενεργότητας της πρωτεΐνης TP53
- 1.15. Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας
- 1.16. Ο πολυμορφισμός Arg72Pro της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας
- 1.17. Ο διπλασιασμός E1-1374<sup>63</sup>nt του γονιδίου E1 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

- 2.1. Ασθενείς
- 2.2. Γενετική ανάλυση
- 2.3. Στατιστική ανάλυση

## **3. Αποτελέσματα**

## **4. Συζήτηση**

## **5. Αναφορές**

## Περίληψη

Το γονίδιο της πρωτεΐνης TP53 αποτελεί ένα σπουδαίο ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο της μεταγραφής του DNA και στην κυτταρική ρύθμιση. Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί αυτού του γονιδίου, πιθανώς εμπλέκονται σε ορισμένες μορφές καρκίνου. Σε ένα σημαντικό αριθμό μελετών, αναφέρεται συχνά η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σκοπός λοιπόν της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει εάν ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 και η λοίμωξη από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV 16 είναι υπεύθυνοι για κάποιας μορφής ευπάθεια ως προς τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε Ελληνίδες γυναίκες, καθώς και εάν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός συσχετίζεται με το διπλασιασμό 1374<sup>63</sup>nt του γονιδίου E1. Τα τραχηλικά επιχρίσματα προήλθαν από 14 υγιείς και 46 ασθενείς, 23 αφορούσαν χαμηλού βαθμού δυσπλασία και 23 υψηλού βαθμού δυσπλασία. Για τη γονοτύπωση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι PCR-RFLP και τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Acc II. Μεταξύ των φυσιολογικών, η κατανομή των Arg/Arg, Arg/Pro και Pro/Pro ήταν 28,6%, 50,0% και 21,4% αντίστοιχα, ενώ ανάμεσα στις δυσπλασίες χαμηλού και υψηλού βαθμού, η κατανομή των Arg/Arg, Arg/Pro και Pro/Pro ήταν 34,8%, 47,8%, 17,4% και 43,5%, 34,8%, 21,7% αντίστοιχα. Οι αλληλομορφικές συχνότητες δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα δείγματα δυσπλασίας χαμηλού και υψηλού βαθμού. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδεικνύουν ότι ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 πιθανόν δεν ευθύνεται για κάποιας μορφής ευαισθησία ως προς τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ δε συσχετίζεται με το διπλασιασμό 1374<sup>63</sup>nt του γονιδίου E1. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω ερευνητικές διεργασίες βασισμένες μάλιστα σε ικανό αριθμητικά πληθυσμιακό δείγμα, ώστε να διευκρινιστεί πλήρως η σχέση μεταξύ του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του πολυμορφισμού του γονιδίου της πρωτεΐνης TP53 και της λοίμωξης από τον ιό HPV 16.



## Abstract

The TP53 gene is an important tumor suppressor gene, controlling DNA transcription and cell regulation. Common polymorphisms in TP53 gene may play a role in some cancer cases. A number of studies often report an association between human papillomavirus infection and cervical cancer. The aim of this study was to investigate whether the TP53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus infection are responsible for susceptibility to cervical cancer in Greek women and whether the polymorphism correlates with E1 1374<sup>63nt</sup> duplication. The cervical smears were taken from 14 healthy women and 46 patients, 23 with low grade's dysplasia and 23 with high grade's dysplasia. For genotyping of the TP53 polymorphism at codon 72, PCR-RFLP methods were used and the PCR products were digested with the Acc II restriction enzyme. Among controls, the distribution of Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro was 28,6%, 50,0% and 21,4% respectively. Among patients with low grade's dysplasia, the distribution of Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro was 34,8%, 47,8% and 17,4% respectively, whereas among patients with high grade's dysplasia, the distribution of Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro was 43,5%, 34,8% and 21,7% respectively. The allele frequencies did not differ significantly between low grade's and high grade's dysplasia samples. The results from this study suggest that the TP53 codon 72 polymorphism does not confer susceptibility to cervical cancer in the Greek population and is not associated with E1 1374<sup>63nt</sup> duplication. However, larger population-based studies are needed to clarify the relation between cervical cancer, TP53 polymorphism and HPV 16 infection.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Βιολογία των Human Papilloma Viruses (HPVs)

Οι ιοί Papilloma (λατινική λέξη papilla: θηλή και ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν την οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί, με μέγεθος 7900 bp, χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Προσβάλλουν κυρίως τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου, ενώ σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Θεωρούνται λοιπόν υπεύθυνοι για την πρόκληση μίας σειράς βλαβών, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή καρκίνο του πέους (Zur Hausen et al., 1996).

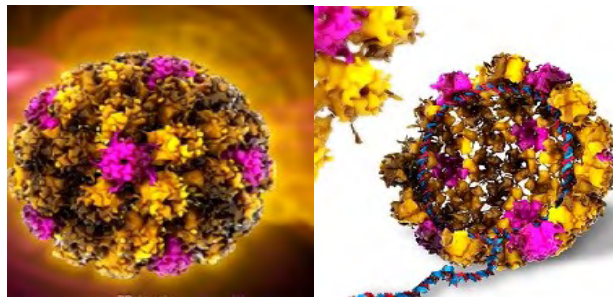
Οι συγκεκριμένοι ιοί ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μεταδίδονταν μεταξύ ατόμων μέσω ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous συσχέτισε τους ιούς Papilloma με τον καρκίνο του δέρματος, καθώς παρατήρησε πως κάποια μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Το συμβάν αυτό, αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη, η οποία τελικά ενοχοποίησε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε κι έπειτα, εντοπίστηκαν διάφοροι τύποι αυτής της ομάδας ιών και συνδέθηκαν με τη δημιουργία όγκων σε ποικίλα είδη οργανισμών μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Ωστόσο, οι ιοί Papilloma έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του '80, όταν το 1983 ο Harald zur Hausen απομόνωσε τον πρώτο HPV 16 από μία γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι συγκεκριμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου στον κόσμο. Συγκεκριμένα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin et al., 2000, Jemal et al., 2011). Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν πλήρως περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV's (Zur Hausen et al., 2000, Bernard et al., 2010).

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται κυρίως μέσω δερματικής επαφής. Ακόμη, 30 περίπου στελέχη του ιού μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα (Gillison et al., 2001). Οι HPV's βάσει του τροπισμού τους διαχωρίζονται σε δερματικούς ιούς και σε ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί τύποι HPV's προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το

επίπεδο θήλωμα (Pfister et al., 2003). Οι τύποι HPVs που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου προκαλούν αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας, στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα, στον οισοφάγο και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ ανάλογα με την έκταση και τη σοβαρότητα της βλάβης κατηγοριοποιούνται σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες: στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας, τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση επεκτατικού καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος, στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας, τα μέλη της οποίας συχνά ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας, τα μέλη της οποίας είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων, ενώ εντοπίζονται σπανίως στον καρκίνο (Munoz et al., 2003, Bernard et al., 2010).

Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας, οι HPVs σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου στο πέος, στη μήτρα και στον πρωκτό. Ακόμη, ο καρκίνος στο λάρυγγα, στον οισοφάγο και στον πνεύμονα μοιάζει ιστολογικά με τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας, γεγονός που εμπλέκει τους ιούς Papilloma με επιπλέον καρκινικές μορφές.

### Εικόνα 1: Απεικόνιση του καψιδίου των Human Papilloma Viruses (HPVs).



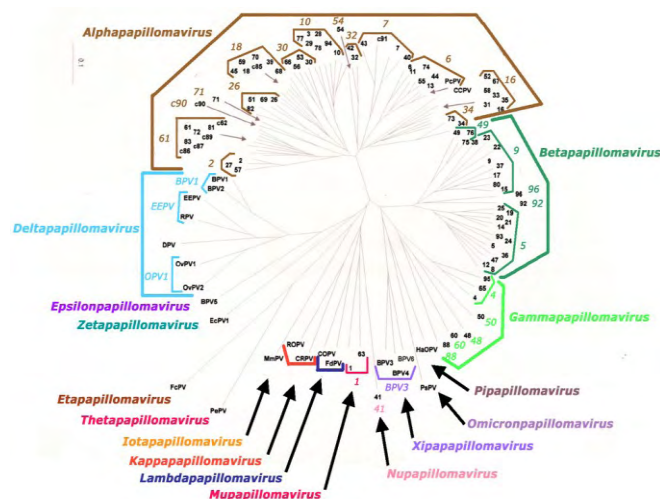
## 1.2. Ταξινόμηση των Human Papilloma Viruses (HPVs)

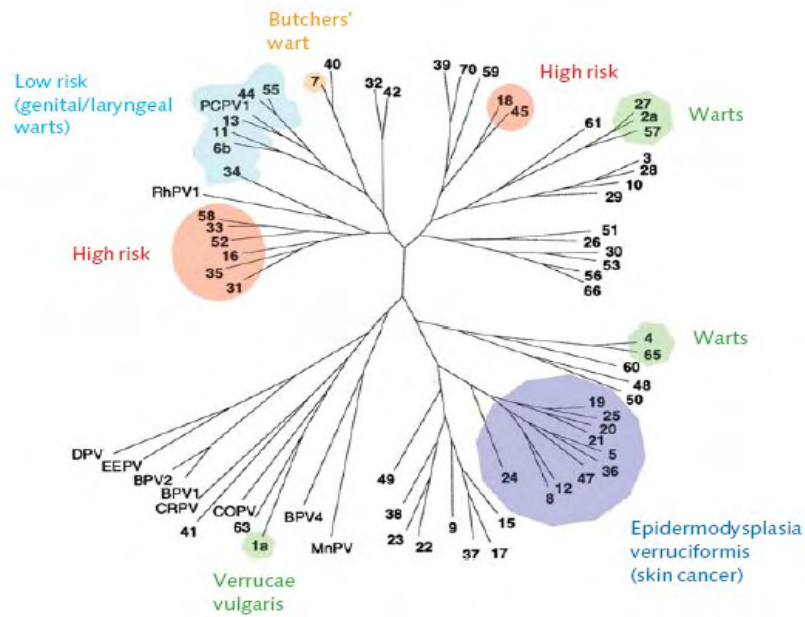
Οι Papillomaviruses ταξινομήθηκαν πρωτίστως μαζί με τους Polyomaviruses και τον SV 40 στην οικογένεια των Papovaviridae. Αυτή η ομαδοποίηση βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην ομοιότητα του καψιδίου τους, στην έλλειψη περιβλήματος καθώς και στην ύπαρξη δικλωνού κυκλικού μορίου DNA (Danos et al., 1989). Μεταγενέστερα ωστόσο, η διεθνής επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) ενέκρινε τη σύσταση μίας ξεχωριστής ταξινομικής οικογένειας ιών, αυτής των Papillomaviridae, που περιλάμβανε τους ιούς Papilloma χωρίς τους ιούς Polyoma και SV 40. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε κυρίως βάσει διαφορών στην οργάνωση, στο μέγεθος και

στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ των Papillomaviruses και των Polyomaviruses και SV 40 ιών, μελών της οικογένειας Papovaviridae (Regenmortel et al., 2002, De Villiers et al., 2004).

Η ταξινόμηση των ιικών τύπων έγινε με βάση την προέλευση του στελέχους και το βαθμό συγγένειας των ιικών γενωμάτων (Chang et al., 1995). Οι ιοί Papilloma δεν κατηγοριοποιήθηκαν σε ορότυπους, αλλά ομαδοποιήθηκαν σε γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου (Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Deltapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Zetapapillomavirus, Etapapillomavirus, Thetapapillomavirus, Iotapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Μυραpapillomavirus, Νυραpapillomavirus, Χιραpapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Ριραpapillomavirus). Ακόμη, κάθε γένος διαχωρίστηκε περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές (variants). Η συγκεκριμένη διάκριση στηρίχθηκε στην ομοιότητα της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον κατά 10%, μεταξύ των υπότυπων κατά 2%-10%, ενώ μεταξύ των παραλλαγών κατά 2% (De Villiers et al., 2004, Bernard et al., 2006, 2010). Τα γένη Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Μυραpapillomavirus, Νυραpapillomavirus περιέχουν στελέχη των Papilloma ιών που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, ενώ τα γένη Deltapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Zetapapillomavirus, Etapapillomavirus, Thetapapillomavirus, Iotapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Χιραpapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Ριραpapillomavirus περιέχουν στελέχη των ιών Papilloma που εντοπίστηκαν κυρίως σε πτηνά και θηλαστικά (Antonson et al., 2006, Charles et al., 2007).

**Εικόνα 2: Σχηματική ταξινομική κατάταξη των Papilloma Viruses (PVs) μέσω φυλογενετικού δένδρου.**





### 1.2.1. Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu Papillomaviruses

Τα γένη Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Μυραpapillomavirus και Νυραpapillomavirus περιέχουν στελέχη των ιών Papilloma που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο.

Το γένος Alpha Papillomavirus συμπεριλαμβάνει τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου και κάποιους από τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος (**Bernard et al., 2010**).

Οι τύποι HPVs που συγκαταλέγονται στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και προκαλούν καρκίνο (**Bosch et al., 2008, Zur Hausen et al., 2009**). Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι HPV 16 και HPV 18, οι κύριοι παράγοντες πρόκλησης καρκινικών τραχηλικών αλλοιώσεων. Είναι πλέον γεγονός, πως στο 90% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ανευρίσκεται DNA από HPVs και σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων, ανιχνεύεται το DNA του HPV 16 (**Bosch et al., 2001, De Sanjose et al., 2010, Li et al., 2011**). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους ταξινομούνται στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας και στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας, βάσει της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι τύποι της ομάδας χαμηλής επικινδυνότητας δεν εμπλέκονται σχεδόν ποτέ στην πρόκληση καρκίνου, ωστόσο παρουσιάζουν ενδιαφέρον τόσο ερευνητικά όσο και διαγνωστικά, καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος (**Doorbar et al., 2006, Hsueh et al., 2009**).

Οι τύποι HPVs που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος ομαδοποιούνται σε τέσσερα διαφορετικά γένη, Beta, Gamma, Mu και Nu Papillomaviruses. Οι συγκεκριμένοι ιοί εντοπίζονται συχνά σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις.

Το γένος Beta Papillomavirus διαιρείται σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη HPV. Τα μέλη της οικογένειας αυτής προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος χωρίς όμως να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά, η μόλυνση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών από στελέχη του συγκεκριμένου γένους μπορεί να προκαλέσει μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (**Pfister et al., 2003**). Τα στελέχη HPV 5 και HPV 8 ανευρίσκονται στο 90% αυτών των όγκων (**Kremsdorf et al., 1983**).

Τα γένη Gamma, Mu και Nu Papillomaviruses περιέχουν τα υπόλοιπα στελέχη HPVs και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο (**Doorbar et al., 2006**). Το γένος Gamma σχετίζεται με τα στελέχη HPV 101, HPV 103, το Mu με τα στελέχη HPV 1, HPV 63, ενώ το Nu με το στέλεχος HPV 41.

### 1.3. Δομή των Human Papilloma Viruses (HPVs)

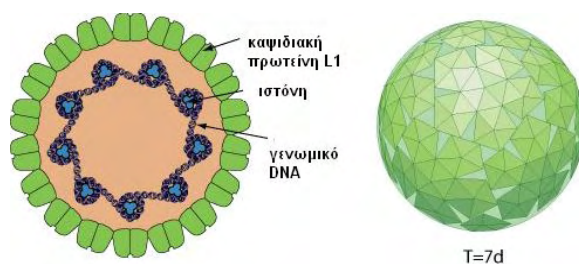
#### 1.3.1. Δομή του καψιδίου

Οι ιοί Papilloma είναι μία ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών, μεγέθους 7900 bp και διαμέτρου 50-60 nm, χωρίς εξωτερικό περίβλημα (**Zheng et al., 2006**).

Το ιικό σωματίο περικλείεται στην εξωτερική του επιφάνεια από 72 πενταμερή της πρωτεΐνης L1 (**Baker et al., 1991**). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας που συμβάλλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (**Yang et al., 2004, Johnson et al., 2009**). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της πρωτεΐνης L1 και έχει άγνωστο δομικό ρόλο (**Day et al., 2004, 2008**). Ωστόσο, η πρωτεΐνη L2 συνδέεται μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της με την πρωτεΐνη L1. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 (**Finnen et al., 2003**). Η βασική της λειτουργία είναι η συμμετοχή της στο πακετάρισμα του ιικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιικά καψίδια (**Buck et al., 2004, Bossis et al., 2005, Kamper et al., 2006, Richards et al., 2006**). Ακόμη, οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γένομα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA χρωμόσωμα εντός του καψιδίου L1/L2 (**Howley et al., 1996**). Το πενταμερές L1 περιέχει πέντε θηλιές που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές και αποτελούνται από 100 C-τελικά άκρα. Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μία α-έλικα, αγκιστρωμένη στον πυρήνα του πενταμερούς L1

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

**Εικόνα 3: Παρουσίαση της δομής του καψιδίου των Human Papilloma Viruses (HPVs).**



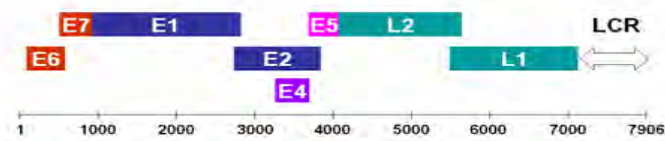
### 1.3.2. Οργάνωση του γενώματος

Το γένωμα των ιών Papilloma είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA. Στα ιικά σωματίδια το DNA εντοπίζεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μία μορφή που μοιάζει με τη χρωματίνη (Howley et al., 1996). Περιλαμβάνει έξι μη δομικά ιικά γονίδια, τα E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια, τα L1, L2 (Zheng et al., 2006). Ακόμη, περιέχει οκτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, open reading frames).

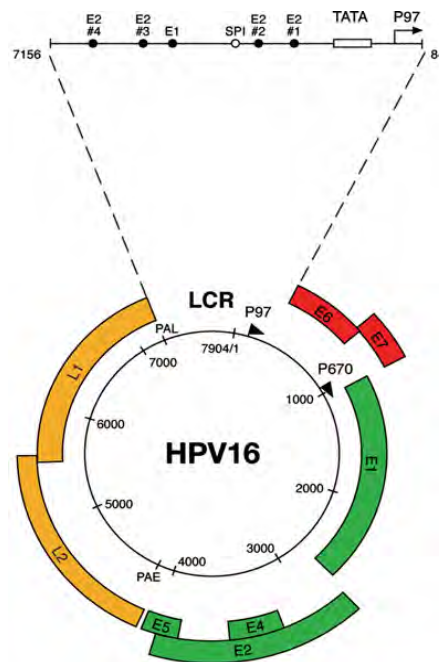
Το γένωμα των ιών Papilloma διαχωρίζεται βάσει των λειτουργικών του δραστηριοτήτων σε τρεις τομείς, την πρόιμη περιοχή (E, early region), την όψιμη περιοχή (L, late region) και τη ρυθμιστική περιοχή (LCR, long control region). Η πρόιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρόιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7, που επηρεάζουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos et al., 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες L1 και L2, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο. Η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και της αρχής του γονιδίου E6. Ακόμη, η LCR περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και αρκετές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιικού DNA (Demeret et al., 1995, Tan et al., 2002).

Η έκφραση του γενώματος του HPV 16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, τον υποκινητή p97, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (Smotkin et al., 1986) και τον υποκινητή p670, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Hummel et al., 1992, Grassmann et al., 1996).

Εικόνα 4: Παρουσίαση της οργάνωσης του γενώματος των Human Papilloma Viruses (HPVs).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του γενώματος των Human Papilloma Viruses (HPVs).



### 1.3.2.1. Ιική πρωτεΐνη E1

Η ιική πρωτεΐνη E1 αποτελεί μία πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης και μέγεθος 70-80 kDa. Η παρουσία της είναι απαραίτητη

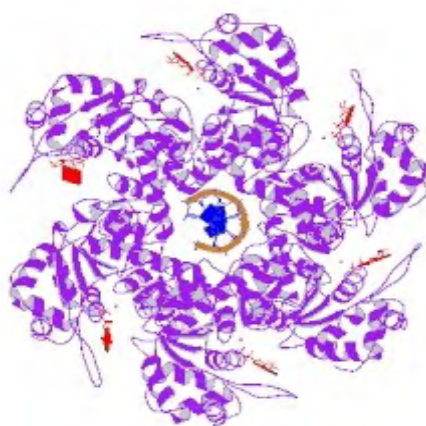


για την αντιγραφή του ιικού γενώματος (Ustav, Stenlund et al., 1991), ενώ παρουσιάζει εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV 40 και του ιού Polyoma (Clertant et al., 1984, Masky et al., 1997).

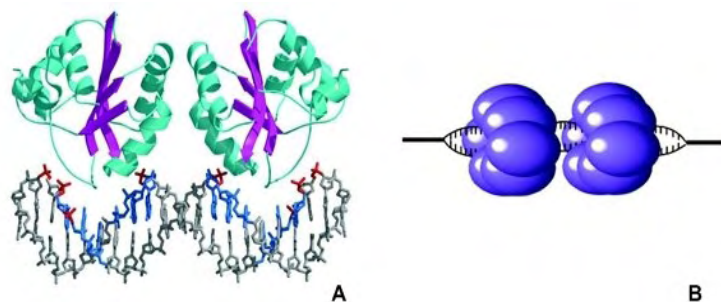
Η πρωτεΐνη E1 προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, ενώ διαθέτει δραστικότητα ελικάσης και ΑΤΡάσης. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E2 και τη μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης  $\alpha$ . Η δραστικότητα της ΑΤΡάσης τοποθετείται στη C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της E1 συμβάλλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές (Thorner et al., 1993). Αυτός ο τομέας είναι επίσης υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση  $\alpha$  του ξενιστή (Masterson et al., 1998). Παρουσία ΑΤΡ η E1 προσδένεται σε μία πλούσια σε ΑΤ περιοχή της LCR προκαλώντας δομικές αλλαγές (Shawn, Holt, Van, Wilson et al., 1995). Σαν πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής η E1 κατέχει δύο βασικούς ρόλους, δρα ως πρωτεΐνη πρόσδεσης αναγνωρίζοντας το σημείο έναρξης της αντιγραφής, ενώ δρα και ως ελικάση ξεδιπλώνοντας τη θέση έναρξης της αντιγραφής ώστε να προχωρά η αντιγραφική διχάλα (Liu et al., 1995). Η E1 προσδένεται σε μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με τη βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo et al., 2003). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα διμερές E2 και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο δρα σαν δομική μονάδα για τη συγκρότηση ενός μεγαλύτερου εξαμερούς συμπλόκου E1, που έχει την ιδιότητα να ξετολίζει το DNA (Sedman et al., 1998). Η E2 επομένως, λειτουργεί ως παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσής της και επιπρόσθετα ως παράγοντας που συναρμολογεί τα μονομερή E1 (Liu et al., 1995, D Abramo, Archambaul et al., 2011).

Η πρωτεΐνη E1 αποτελεί επιπλέον έναν εξαιρετικά ελκυστικό στόχο σε ό, τι αφορά την ανάπτυξη αντι-HPV φαρμάκων, εφόσον είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (White et al., 2005, Archambaul et al., 2013).

**Εικόνα 6: Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της ιικής πρωτεΐνης E1.**



**Εικόνα 7: Απεικόνιση Α) της αλληλεπίδρασης της ιικής πρωτεΐνης E1 με το DNA του κυττάρου και Β) των εξαμερών της ιικής πρωτεΐνης E1 κατά το ξετύλιγμα του DNA.**



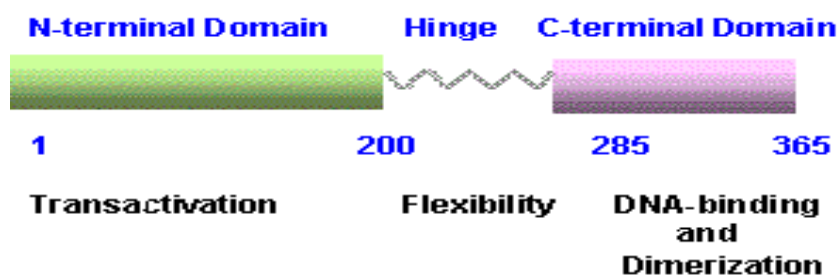
### 1.3.2.2. Ιική πρωτεΐνη E2

Η ιική πρωτεΐνη E2 είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDa, που δρα ως διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού DNA (Laimins et al., 1998, Blachon et al., 2003, Mc Bride et al., 2004, Ilves et al., 2006). Αποτελείται από τρεις περιοχές, τη C-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μία διμερή δομή β-βαρελιού που προσδένεται στο DNA, (Hegde et al., 1992, 2002) την περιοχή αρμός (hinge region) και τη N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μία α-έλικα (Anston et al., 2000). Η C-τελική περιοχή και η N-τελική περιοχή είναι αρκετά συντηρημένες μεταξύ των HPVs, ενώ η περιοχή αρμός εμφανίζει ετερογένεια (Francis et al., 2000).

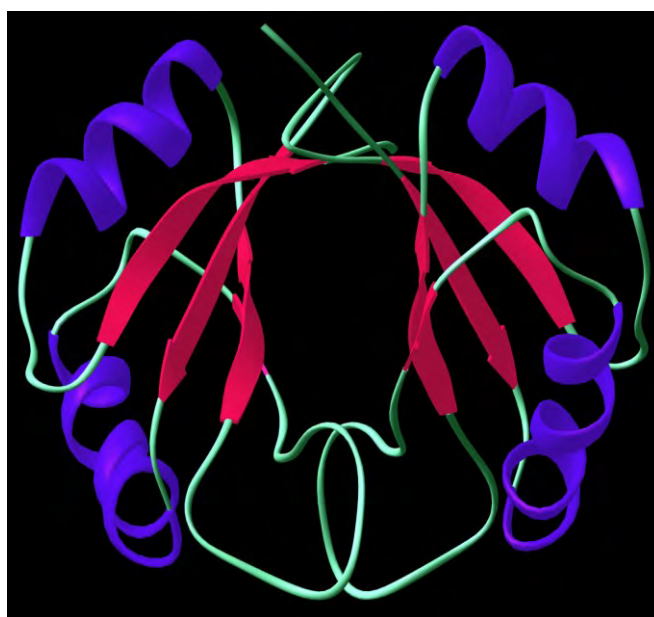
Η πρωτεΐνη E2 συνδέεται σε ειδικές θέσεις στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Επιπλέον, επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al., 1987). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN<sub>4</sub>CGGT (Bouvard et al., 1994). Οι περιοχές αυτές βρίσκονται εντός της περιοχής LCR του HPV 16 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin et al., 1986). Οι δύο από αυτές, βρίσκονται στο TATA box ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μία θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η σύνδεση της E2 στις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni et al., 1991, Tan et al., 1992, 2002). Οι άλλες δύο, εντοπίζονται ανοδικά του υποκινητή και η πρόσδεση της E2 σε αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham et al., 1994). Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης, ενώ η κάλυψη των θέσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2

συνδέεται σε θέσεις που τοποθετούνται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή, οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger, Corbach et al., 1997). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις καταλαμβάνονται και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και ο TFIIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Τότε, η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά την έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Romanczuk et al., 1990, Steger, Corbach et al., 1997).

Εικόνα 8: Απεικόνιση της ικτής πρωτεΐνης E2 και παρουσίαση των τριών βασικών περιοχών και των λειτουργιών της.



Εικόνα 9: Απεικόνιση του διμερούς της ικτής πρωτεΐνης E2 και παρουσίαση των οκτώ β-βαρελιών και των τεσσάρων α-ελίκων.





απόπτωσης, ενώ μελετάται εκτενώς και η σχέση, η σύνδεση και η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα μιτοχόνδρια του κυττάρου και τους εμπλεκόμενους αποπτωτικούς μηχανισμούς (**Raj et al., 1994, 2004**).

#### 1.3.2.4. Ιική πρωτεΐνη E5

Η ιική πρωτεΐνη E5 είναι μία μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στη συσκευή Golgi, ενώ περιστασιακά εντοπίζεται και στις κυτταρικές μεμβράνες (**Conrad et al., 1993, Nath et al., 2006, Hu et al., 2009, Wetherill et al., 2012**).

Η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται τόσο στο όψιμο όσο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV 31 αποδείχθηκε ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (**Fehrmman et al., 2003**). Συγκεκριμένα, η απώλεια της E5 συμβάλλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται σε αυτή την κατηγορία των κυττάρων (**Flores et al., 2000**).

Ακόμη, η πρωτεΐνη E5 ίσως εμπλέκεται και στην ικανότητα διαφυγής του ιού από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή συγκρατώντας το MHC τύπου I στη συσκευή Golgi και εμποδίζοντας μ' αυτό τον τρόπο τη μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (**Ashrafi et al., 2005, 2006**).

#### 1.3.2.5. Ιική ογκοπρωτεΐνη E6

Η ιική ογκοπρωτεΐνη E6 των ιών χαμηλής και υψηλής επικινδυνότητας αποτελείται από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι συντηρημένο μεταξύ των HPVs και επιτελεί μία σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού (**Cole, Danos et al., 1987**). Η πρωτεΐνη E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες (**Nomine et al., 2006, Bullet et al., 2007**). Μπορεί ακόμη να μετασχηματίζει κύτταρα NIH3T3 δημιουργώντας αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα (**Band et al., 1991, Wazer et al., 1995**), δεν μπορεί όμως να μετασχηματίζει κερατινοκύτταρα. Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (**Nelson et al., 1989**).

Μία βασική λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη TP53. Η πρωτεΐνη TP53 αποτελεί καταστολέα όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση

πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης p21 (Ko, Prives et al., 1996). Η πρωτεΐνη TP53 ενεργοποιείται όταν το κύτταρο βρίσκεται σε συνθήκες stress και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, κατευθύνοντας το κύτταρο είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη, είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση (Artandi et al., 2005). Σε ό, τι αφορά τη σύνδεση του μονοπατιού με τον HPV 16, η E6 προσδένεται στην πρωτεΐνη TP53 μαζί με την ουβικουιτινική λιγάση E6AP (Huibregtse et al., 1991). Ο σχηματισμός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουιτινίωση της πρωτεΐνης TP53 και στην αποδόμησή της στο 26S πρωτεάσωμα (Pim et al., 2010, Fu et al., 2010). Ακόμη, η E6 αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης TP53 συνδεόμενη στην p300/CBP, που αποτελεί συνενεργοποιητή της πρωτεΐνης TP53 (Huibregtse et al., 1991, Demarest et al., 2002).

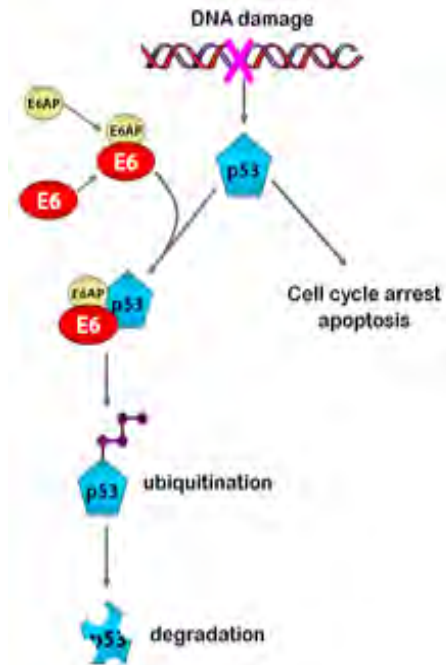
Ένας ακόμη ρόλος της πρωτεΐνης E6 αφορά την αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποδομούνται μέσω της σύνδεσής τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPVς υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας (Nguyen et al., 2003).

Η πρωτεΐνη E6 συμμετέχει στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων, ενεργοποιώντας την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT (Klingelhutz et al., 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι η προσθήκη εξαμερών επαναλήψεων στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια δράσης της τελομεράσης επιδρά στη σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση, οδηγώντας σταδιακά στη γήρανση των κυττάρων και στο θάνατο (Liu et al., 1999). Η E6 ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT με συνδυαστική δράση διαμέσου c-myc και Sp1 (Kyo et al., 2001). Η εκτεταμένη ενεργοποίηση της hTERT οδηγεί στη διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς στην αναστολή της κυτταρικής γήρανσης και στην αθανатоποίηση των κυττάρων (Artandi et al., 2005).

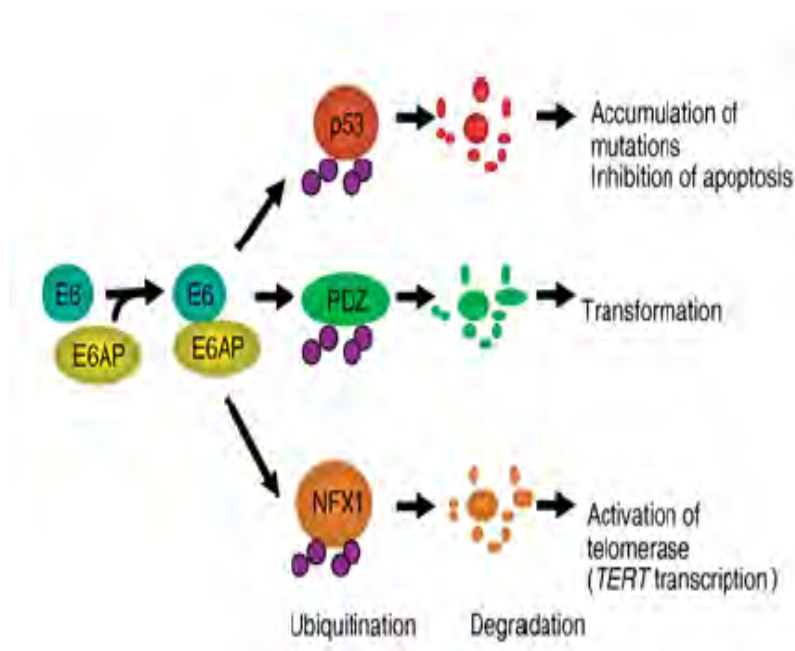
**Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6. Η αλληλουχία περιλαμβάνει δύο μοτίβα σύνδεσης ιόντων ψευδαργύρου, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα μοτίβο σύνδεσης πρωτεΐνης PDZ.**



Εικόνα 12: Παρουσίαση της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης TP53 μέσω της δράσης της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6.



Εικόνα 13: Προβολή των κύριων λειτουργιών της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6.



### 1.3.2.6. Ιική ογκοπρωτεΐνη E7

Η ιική ογκοπρωτεΐνη E7 σχετίζεται με τη δημιουργία αθάνατων κυττάρων καθώς και με την ιική παθογένεια. Διαθέτει 100 αμινοξέα και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές, τη CR1, τη CR2 και τη CR3 (**Barbosa et al., 1990, Dyson et al., 1992**). Η περιοχή CR1 περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η περιοχή CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με το ρετινοβλάστωμα (**Dyson et al., 1992**). Η περιοχή CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Η έκφραση της E7 απουσία της E6 δημιουργεί αθάνατα κύτταρα NIH3T3 και αθάνατα κερατινοκύτταρα (**Munger et al., 1989, 2004, Hebner et al., 2006**).

Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) (**Roman et al., 2006, Barrow et al., 2010**). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p107 και p130 (**Dyson et al., 1989**). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προαγωγή του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης κινάσης φωσφορυλιώνουν την Rb, η οποία απελευθερώνεται από το σύμπλοκο που σχηματίζει με το μεταγραφικό παράγοντα E2F και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Σε ό, τι αφορά τη δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού του ουβικουιτινικού πρωτεασώματος (**Berezutskaya et al., 1997, Wang et al., 2001**). Η πρόσδεση της E7 στην Rb απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

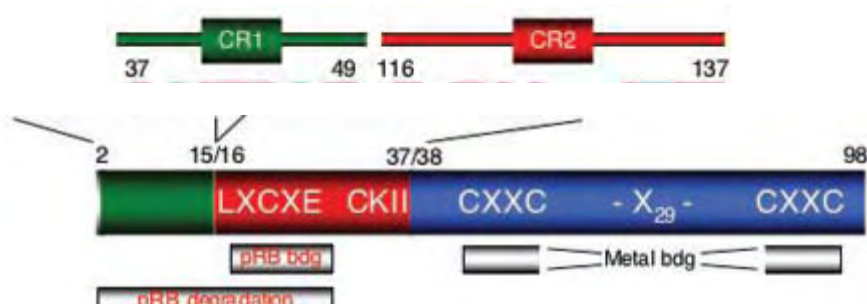
Επιπλέον, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς και με τους αναστολείς των κύκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Συγκεκριμένα, η E7 αυξάνει τα επίπεδα των κυκλινών A και E που μπλοκάρουν την δράση των p21 και p27, επάγοντας τη φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (**Funk et al., 1997, Nguyen et al., 2008**).

Η E7 αλληλεπιδρά με μία ακόμη ομάδα πρωτεϊνών, τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές E2F. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακετυλομάδων από τις ιστονές, ενώ επιπρόσθετα απακετυλιώνουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Η πρόσδεση της E7 στις HDACs αφενός αναστέλλει τη σύνδεση της Rb-HDAC καταστέλλοντας τη λειτουργία της, αφετέρου διακόπτει την απακετυλίωση του E2F,

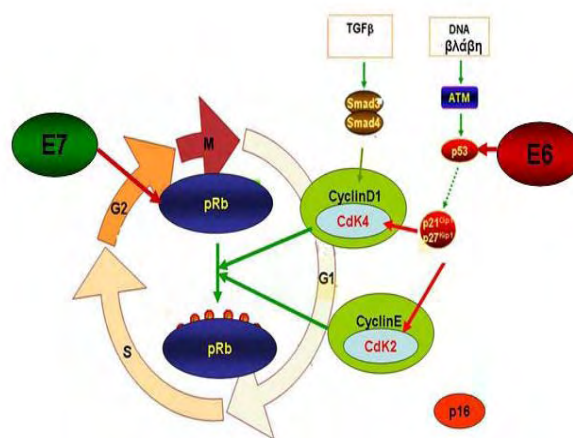


απορυθμίζοντας τον έλεγχο σύνθεσης των HDACs και προκαλώντας τελικά εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Brehm et al., 1999, Longworth et al., 2004).

Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της ιικής ογκοπρωτεΐνης E7.



Εικόνα 15: Παρουσίαση της επίδρασης των ιικών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 στη διαδικασία εισόδου του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου.



### 1.3.2.7. Ιική πρωτεΐνη L1

Το καψίδιο των HPVs αποτελείται από τις όψιμες ικές πρωτεΐνες L1 και L2 (Larsen et al., 1987). Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η L1, η οποία έχει μέγεθος 55 kDa και οργανώνεται σε ένα σχηματισμό 72 πενταμερών με εικοσαεδρική δομή (Baker et al., 1991, Hangensee et al., 1994).

Η ική πρωτεΐνη L1 παραμένει καλά συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων τύπων HPVs και όταν εκφράζεται ως ευκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει την

ικανότητα να αυτοοργανώνεται σε ψευδοϊοσωμάτια (VLPs, virus-like particles) (Zhou et al., 1991, Kirnbauer et al., 1993, Rose et al., 1993, Hagensee et al., 1993). Τα VLPs εμφανίζουν τους ίδιους επίτοπους με τους πραγματικούς ιούς, και είναι ειδικά για κάθε ξεχωριστό τύπο ιού (Christensen et al., 1990, Kirnbauer et al., 1994). Το αμινοξύ 202 είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την οργάνωση των VLPs της πρωτεΐνης L1, καθορίζοντας τόσο τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών (Volpers et al., 1994).

Μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη L1 κατευθύνεται στον πυρήνα, μέσω σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLSs, nuclear localization signals) του καρβοξυτελικού άκρου της (Sun et al., 1995). Τα NLSs είναι μικρές αλληλουχίες 8-10 αμινοξέων που περιέχουν μεγάλη αναλογία θετικά φορτισμένων αμινοξέων, κυρίως λυσίνης και αργινίνης (Silver et al., 1991). Η πρωτεΐνη L1 περιέχει δύο NLSs αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο της (Zhou et al., 1991). Η συναρμολόγηση των ικών σωματίων λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των επιμολυσμένων κυττάρων, ενώ η έναρξη μεταγραφής του γονιδίου L1 και η δημιουργία του ιού συνδέεται στενά με το στάδιο διαφοροποίησης των επιμολυσμένων κυττάρων. Η πρωτεΐνη L1 ανιχνεύεται κυρίως σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης των όψιμων γονιδίων και της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης ρυθμίζεται από περιοχές του ιικού mRNA με ρυθμιστική δράση και από ιικούς μεταγραφικούς παράγοντες που συντίθενται στα προσβεβλημένα κύτταρα, ενώ πιθανώς εμπλέκονται και παράγοντες που σχετίζονται με την αυτορρύθμιση του ιού. Το mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη L1 του καψιδίου περιέχει αλληλουχίες που αναστέλλουν την έκφραση της L1 μεταμεταγραφικά (Tan et al., 1995), ενώ ένα ανασταλτικό στοιχείο στην όψιμη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR, untranslated region) του HPV 16 δρα ανεξάρτητα (Kennedy et al., 1991). Έτσι εξηγείται και το ότι η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών του ιού περιορίζεται στα τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Τέτοιες ανασταλτικές αλληλουχίες βρίσκονται σε όψιμες 3' UTR γονιδιακές περιοχές και άλλων στελεχών, όπως στον HPV 1, καταδεικνύοντας πως οι αλληλουχίες αυτές είναι συντηρημένες και παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού (Tan et al., 1995).

#### 1.3.2.8. Ιική πρωτεΐνη L2

Η ική πρωτεΐνη L2 έχει μέγεθος 50 kDa και βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την πρωτεΐνη L1, σε αναλογία 1/10 (Doorbar et al., 1987), ενώ περιέχει σήματα πυρηνικής εντόπισης για τη μεταφορά της στον πυρήνα μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα. Η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης δεν είναι σαφής. Ενδέχεται πως παρόλο που δεν απαιτείται για τη σύνδεση υποδοχέων, η πρωτεΐνη L2 είναι απαραίτητη για τη λοιμογόνο δράση του ιού (Larsen et al., 1987, Zhou et al., 1993, Roden et al., 1994).

Η ανασυνδυασμένη L1 πρωτεΐνη αυτοοργανώνεται σε σωμάτια που μοιάζουν με ιοσωμάτια. Η οργάνωση αυτή, ενισχύεται από την παρουσία της πρωτεΐνης L2, η οποία απαιτείται τόσο για τη συνάθροιση των λοιμογόνων σωματίων του ιού όσο και για τη σύνδεση στο DNA (Zhou et al., 1991, Hagensee et al., 1993, Zhou et al., 1994). Συγκεκριμένα, όταν τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού αποκόπτονται από την πρωτεΐνη L1, οι ακρωτηριασμένες L1 πρωτεΐνες διασπείρονται σε ολόκληρο το κύτταρο, λόγω όμως της συνέκφρασης της πρωτεΐνης L2 κατευθύνονται εκ νέου στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη L2 συνδέεται στο DNA του ιού ενώ η L1 δεν συνδέεται. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης L2 και ιδιαίτερα τα πρώτα δώδεκα αμινοξέα λυσίνης ή αργινίνης θεωρούνται σημαντικά για τη συναρμολόγηση του καψιδίου, εισάγοντας το DNA του ιού στα ιικά σωμάτια που δημιουργούνται από την πρωτεΐνη L1. Επομένως, η πρωτεΐνη L2 κατευθύνει ουσιαστικά την L1 σε συγκεκριμένη θέση στον πυρήνα. Όταν οι πρωτεΐνες L1 και L2 συνεκφράζονται, η L1 εμφανίζει διάστικτη εντόπιση σε κάποια κύτταρα, παρόμοια μ' αυτή της πρωτεΐνης L2 στα ίδια κύτταρα (Zhou et al., 1994).

### 1.3.3. Μορφή του γένωματος

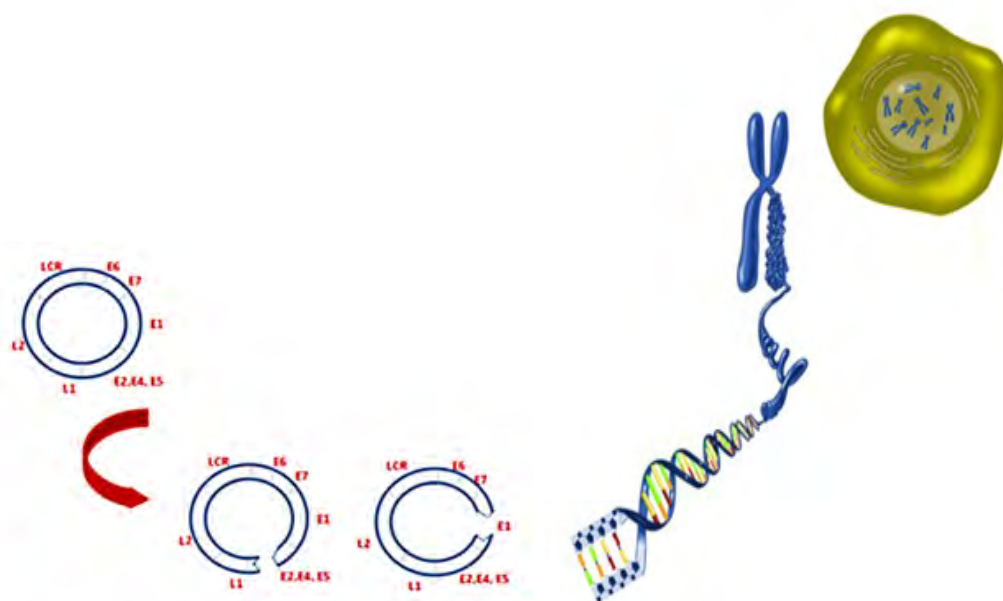
Το γένωμα του ιού εντοπίζεται υπό μορφή επισώματος, ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Σε μολυσμένα κύτταρα, στα οποία ο ιός έχει ήδη εγκατασταθεί, διατηρεί το γένωμα του υπό μορφή πλασμιδίου. Το γένωμα του ιού αντιγράφεται με συχνότητα μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο στη φάση S και ο ιός εξασφαλίζει τη διατήρηση της μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (Tonon et al., 2001, Andersson et al., 2005, Pett et al., 2006, Arias Pulido et al., 2006, Huang et al., 2006, Cheung et al., 2006, De Marco et al., 2007, Briolat et al., 2007, Li et al., 2008, Cricca et al., 2009, Matovina et al., 2009).

Η ενσωμάτωση του DNA των HPV's μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή σταθεροποιεί την έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 σε υψηλά επίπεδα και συνδέεται με σοβαρές αλλοιώσεις (Wentzensen et al., 2004, Ziegert et al., 2013). Προσεγγιστικά, ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή σε αλλοιώσεις τύπου CIN1 και συνδέεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7, ενώ εμφανίζεται σε ενσωματωμένη μορφή στο 5% των αλλοιώσεων CIN2, στο 16% των αλλοιώσεων CIN3 και στο 87% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου (Klaes et al., 1999). Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2, κυρίως στη θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Ωστόσο, σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 και σπανιότερα σε θέσεις πλάι στο γονίδιο E4 (Chen et al., 1994, Kalantari et al., 1998, Lukaszuk et al., 2003, Arias Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009). Η διάσπαση του γονιδίου E2 είναι ένα γεγονός που συμβαίνει σχετικά νωρίς μετά τη μόλυνση του κυττάρου από τον ιό. Επιπλέον αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ως προς

την έναρξη της τραχηλικής νεοπλασίας και ένα πιθανό μοριακό δείκτη της εξέλιξης της νόσου. Η θραύση των γονιδίων E2 και E1 απορυθμίζει τον έλεγχο της μεταγραφής των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα να μεταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακόμη, τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων είναι πλέον πιο σταθερά καθώς περιλαμβάνουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες (Lehn et al., 1988, Couturier et al., 1991, Arias Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009). Επομένως, τα τραχηλικά κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένα ιικά ογκογονίδια διαθέτουν ένα ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων, μα και μεγαλύτερη πιθανότητα να μετατραπούν σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα (Huang et al., 2006, Kulmala et al., 2006, Cricca et al., 2009).

Σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται ποικίλες κυτταρογενετικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια ή κέρδος λειτουργίας κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες κυτταρογενετικές αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του ιού με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένας αριθμός κυτταρικών γονιδίων. Κάποια γονίδια, γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου, διαρρηγνύονται λόγω της ενσωμάτωσης (Wentzensen et al., 2004). Ειδικότερα, η ενσωμάτωση του HPV 16 κοντά στο πρωτοογκογονίδιο c-myc συναντάται στο 10% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ σχετίζεται και με την αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου (Durst et al., 1987, Wentzensen et al., 2004, Herrick et al., 2005). Άρα λοιπόν, η θέση ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα, εκτός από την εκτεταμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων E6 και E7, παίζει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων.

**Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της ρήξης των γονιδίων E1 και E2 και της ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα.**



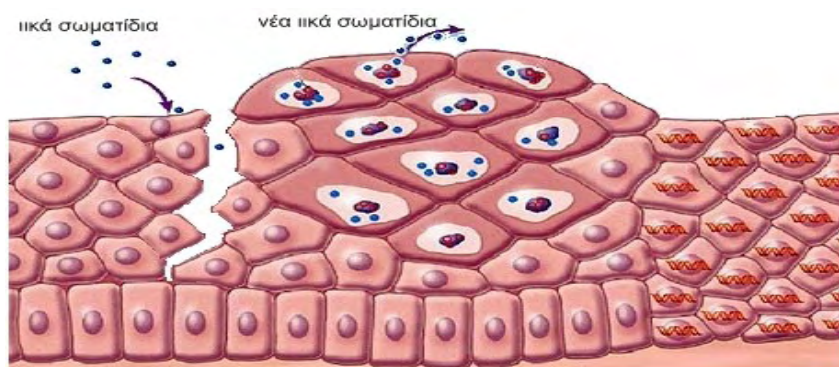
## 1.4. Κύκλος ζωής των Human Papilloma Viruses (HPVs)

### 1.4.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των ιών Papilloma ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή.

Πρωτίστως, τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών και μ' αυτό τον τρόπο ο ιός καταφέρνει να εισβάλλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Συγκεκριμένα, ο ιός εισέρχεται στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω της σύνδεσής του με τη θειϊκή ηπαρίνη, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafiq Keramat et al., 2003, Johnson et al., 2009). Ωστόσο, ο HPV απαιτεί την παρουσία και ενός δευτέρου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελούν οι α6 ιντεγκρίνες (Yoon et al., 2001, Surviladze et al., 2012). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η λαμινίνη 5 είναι ένας ακόμη παράγοντας, ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας του HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp et al., 2006). Μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, γεγονός που εξαρτάται από τον τύπο του ιού. Οι HPV 16 και HPV 58 συνδέονται σε κυστίδια κλαθρίνης, ενώ ο HPV 31 σε κυστίδια καβεολίνης (Bousarghin et al., 2003). Στη συνέχεια, τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της καμψιακής πρωτεΐνης L2 (Day et al., 2004, Schelhaas et al., 2012).

Εικόνα 17: Είσοδος του ιού στο κύτταρο.

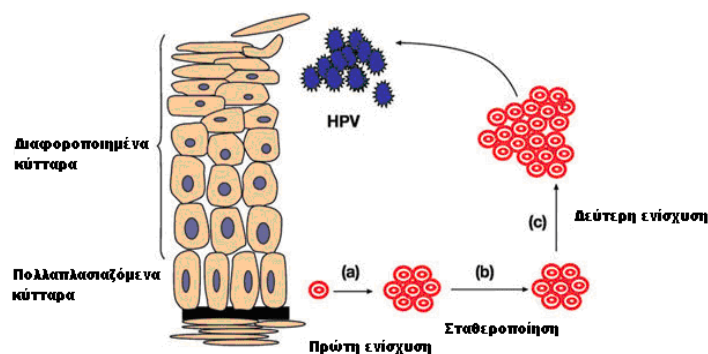


### 1.4.2. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Οι ιοί Papilloma αντιγράφουν το γένωμα τους σε διάφορες περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους και μάλιστα με διαφορετική συχνότητα. Σε πρώτη φάση, τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολύνονται από τον ιό και παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γενώματος μεταξύ 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο (Fields et al., 1996, Maglennon et al., 2011). Σε αυτό το στάδιο, το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος πραγματοποιείται κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στη φάση S. Σε αυτό το στάδιο, το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας δυο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο (Parish et al., 2006, Mc Bride et al., 2008, Pyeon et al., 2009). Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος λαμβάνει χώρα στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα υφίσταται έξαρση της αντιγραφής με συνέπεια τη σύνθεση του ιικού DNA που τελικά εισέρχεται στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια (Hoffmann et al., 2006).

Τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται μετά τη μόλυνση είναι τα E1 και E2, που επάγουν την αντιγραφή του DNA, ενώ η πρωτεΐνη E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας τη δράση των γονιδίων E6 και E7. Οι γενετικές αλλαγές, όπως η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή με παράλληλη ρήξη και απενεργοποίηση του γονιδίου E2 (Corden et al., 1999, Pett et al., 2006), μα και οι μεταλλάξεις στο ίδιο το γονίδιο E2, οδηγούν σε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Οι ιικές αυτές πρωτεΐνες με τη σειρά τους, επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου και οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου.

Εικόνα 18: Αντιγραφή του ιικού γενώματος.

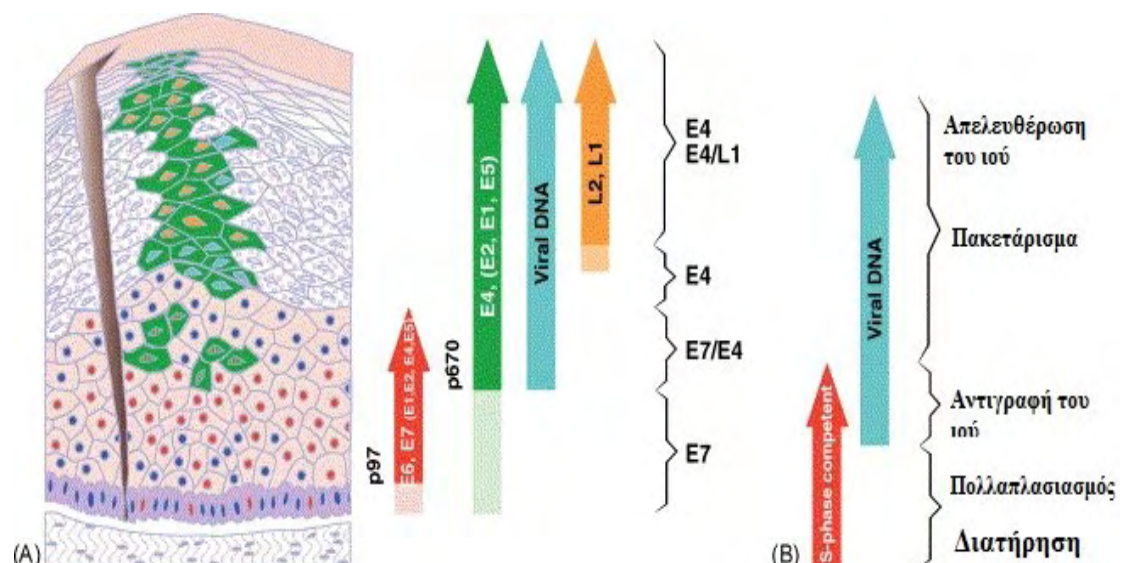


### 1.4.3. Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Οι ιοί Papilloma προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται βέβαια από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του ιού δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zheng et al., 2006).

Στα αδιαφοροποίητα ή ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την πρόιμη περιοχή του ιικού γενώματος έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7. Τα έξι πρόιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p97 για τον HPV 16 και HPV 31 και 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 (Doorbar et al., 2012). Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων (Grassmann et al., 1996).

Εικόνα 19: Μεταγραφή του ιικού γενώματος.



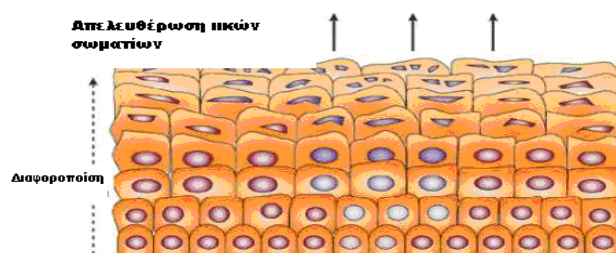
#### 1.4.4. Σύνθεση του ιικού γενώματος

Αυτό το στάδιο του κύκλου ζωής των ιών Papilloma περιλαμβάνει την τοποθέτηση πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και τη σύνθεση των ιικών σωματίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα, απαιτεί εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 και την παρουσία της πρωτεΐνης E2 (Day et al., 1998), η οποία συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck et al., 2004). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιικού γενώματος εντός του καψιδίου (Fay et al., 2004). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των L1 πενταμερών, που αποτελούν βασικές δομικές μονάδες του καψιδίου του ιού (Florin et al., 2002). Η ωρίμανση των ιικών σωματίων πραγματοποιείται όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέλθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα.

#### 1.4.5. Έξοδος του ιού από το κύτταρο

Τελικά, ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που σχηματίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ο συγκεκριμένος ιός δεν προκαλεί λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, ενώ ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr et al., 2004). Στη διαδικασία αυτή πιθανώς εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1<sup>E4</sup>. Η πρωτεΐνη καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, αποδεδμεύοντας και απελευθερώνοντας έτσι τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια από το κύτταρο (Roberts et al., 1997).

Εικόνα 20: Έξοδος του ιού από το κύτταρο.

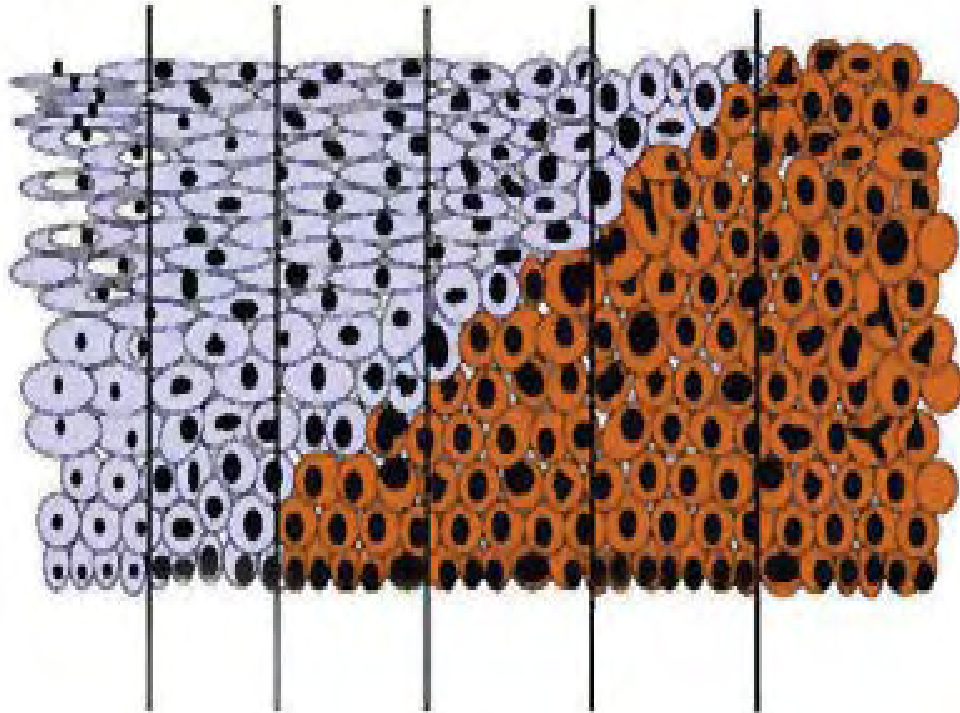




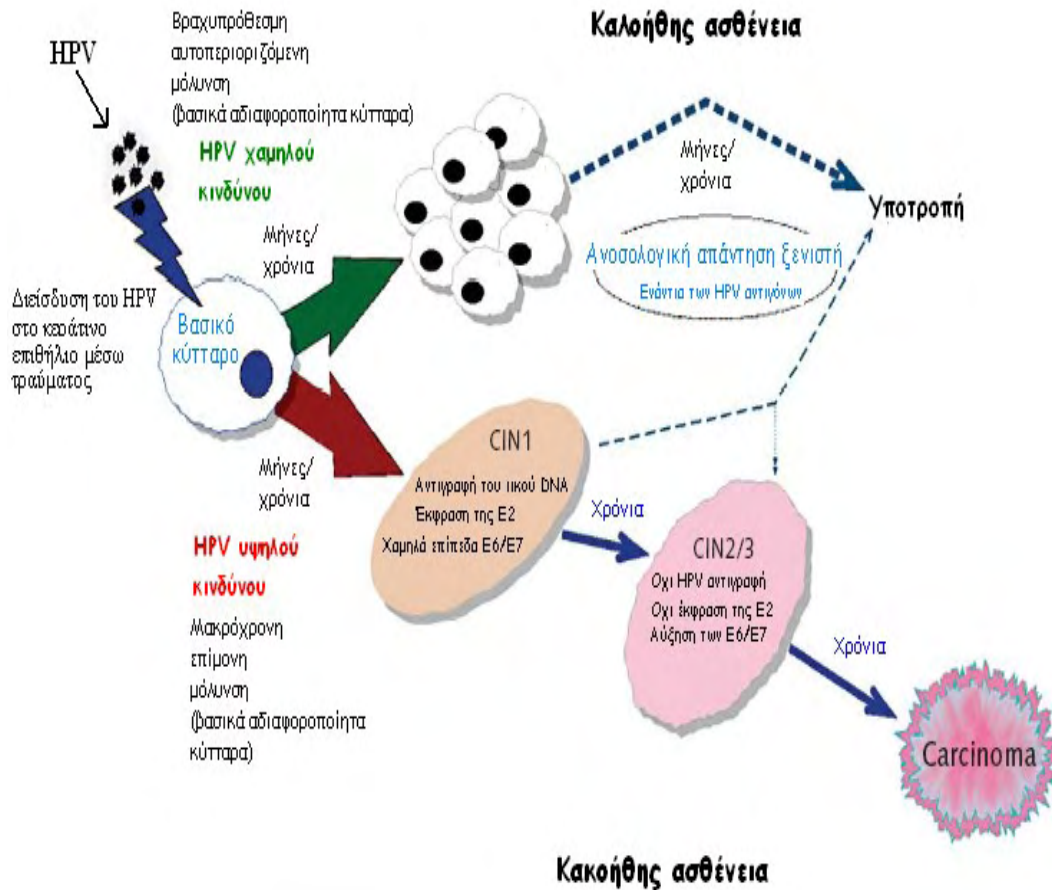
#### 1.4.6. Ιστολογικές αλλοιώσεις

Σε μοριακό επίπεδο, οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, συνδέονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi et al., 2005). Η μετάπτωση σε υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες CIN2,3 και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετατροπή του ιικού γενώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση ωστόσο του γενετικού υλικού του ιού στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή δεν είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει κακοήγη εξαλλαγή. Η συγκεκριμένη μετατροπή αποτελεί εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμβάλλουν μάλιστα ποικίλοι παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, η συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών, οι γενετικές μεταλλάξεις καθώς και τα ανοσολογικά στοιχεία του ξενιστή. Η λοίμωξη λοιπόν από τον HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός, το οποίο μέσω μίας πολύπλοκης διαδικασίας είναι πιθανό να έχει ως εξέλιξη την πρόκληση καρκίνου (Heise et al., 2003).

**Εικόνα 21: Παρουσίαση του φυσιολογικού επιθηλίου, της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας τραχήλου (CIN1, CIN2, CIN3) και του καρκίνου.**



Εικόνα 22: Συνοπτική απεικόνιση της συνολικής πορείας των HPV.



### 1.5. Ιστορία της πρωτεΐνης TP53

Η ιδέα ότι κάποιες μεταλλάξεις της πρωτεΐνης TP53 συμμετέχουν ενεργά στον κυτταρικό μετασχηματισμό τεκμηριώθηκε ήδη από το 1990 (Eliyahu et al., 1990, Lane, Benchimol et al., 1990). Πρωτίστως, διερευνήθηκε ο τρόπος αδρανοποίησης του γονιδίου άγριου τύπου της πρωτεΐνης TP53. Σε αντίθεση με τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που αδρανοποιούνται με μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις (οδηγούν σε εξαφάνιση ή παρεκκλίνουσα σύνθεση του γονιδιακού προϊόντος), σχεδόν το 90% των μεταλλάξεων του γονιδίου της πρωτεΐνης TP53 αφορά παρανοηματικές μεταλλάξεις (οδηγούν στη σύνθεση μίας σταθερής πρωτεΐνης που στερείται την ειδική λειτουργία δέσμευσης στο DNA και συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων του όγκου) (Soussi, Bérout et al., 2001). Η επιλογή για συσσωρευση μεταλλάξεων της πρωτεΐνης TP53 σε καρκινικά κύτταρα

έχει δύο συνέπειες, ένα κυρίαρχο αρνητικό ρόλο λόγω ετεροολιγομερισμού με το άγριου τύπου γονίδιο της πρωτεΐνης TP53 που εκφράζεται από το δεύτερο αλληλόμορφο ή ένα ιδιαίτερο κέρδος λειτουργίας του μεταλλαγμένου γονιδίου της πρωτεΐνης TP53. Πλήθος ερευνητών προσπάθησαν να πραγματοποιήσουν διάκριση μεταξύ των δύο υποθέσεων, χωρίς όμως σαφή συμπεράσματα (**Michalovitz et al., 1991, Milner et al., 1995**). Αντίθετα, το συγκεκριμένο ζήτημα περιπλέκεται περαιτέρω από το γεγονός ότι δε φαίνεται να είναι όλες οι μεταλλάξεις της πρωτεΐνης TP53 ισοδύναμες και ως εκ τούτου παρουσιάζουν μία αξιοσημείωτη ετερογένεια της δομής ή/και απώλεια της λειτουργίας. Επιμόλυνση κυττάρων που στερούνταν ενδογενούς πρωτεΐνης TP53 με ποικίλα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης TP53, οδήγησε σε αύξηση της καρκινογόνου δράσης τους, η οποία διέφερε ανάλογα με το είδος της μετάλλαξης (**Dittmer et al., 1993, Halevy et al., 1990**). Η έρευνα ως προς το ογκογόνο δυναμικό των μεταλλάξεων του γονιδίου της πρωτεΐνης TP53 δεν είναι καθαρά θεωρητική, αλλά κατέχει προφανή κλινικά συμπεράσματα, εξηγώντας την αξιοσημείωτη ανομοιότητα των αποτελεσμάτων ποικίλων μελετών και αποδεικνύοντας μία σχέση μεταξύ της παρουσίας μίας μετάλλαξης και διαφόρων κλινικών παραμέτρων, όπως η επιβίωση ή η ανταπόκριση στη θεραπεία.

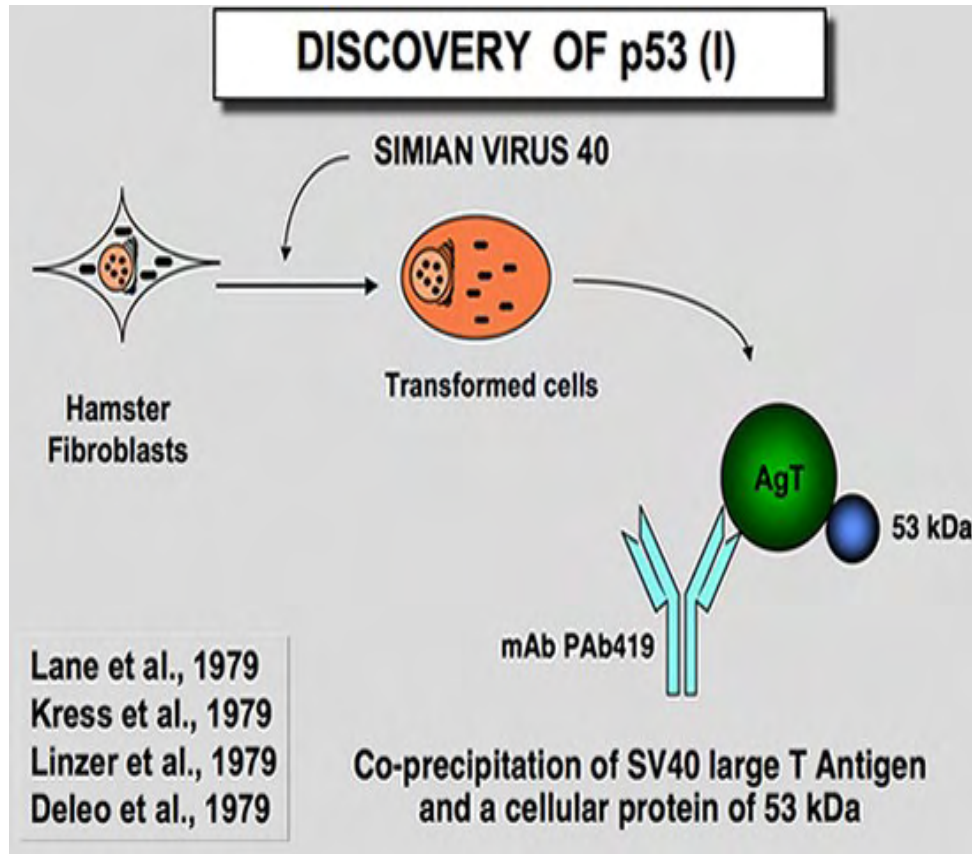
## 1.6. Ανακάλυψη της πρωτεΐνης TP53

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης TP53 το 1979, ήταν η κατάληξη δύο τύπων μελετών, συμπεριλαμβανομένης μίας ικής και μίας ορολογικής προσέγγισης.

### Η ική προσέγγιση

Μελέτες μετασχηματισμένων κύτταρων SV 40 απέδειξαν ότι μία πρωτεΐνη 55 kDa κατακρημνίζονταν μαζί με το μεγάλο T αντιγόνο (**Chang et al., 1979, Kress et al., 1979, Lane, Crawford et al., 1979, Linzer, Levine et al., 1979, Melero et al., 1979**). Αυτή η σύνδεση αποδείχθηκε πως ήταν το αποτέλεσμα της σύζευξης μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών *in vivo* (**Lane, Crawford et al., 1979**). Θεωρήθηκε επομένως, πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη κωδικοποιούνταν από το κυτταρικό γένωμα. Οι Linzer και Levine (**Linzer, Levine et al., 1979**) ανακάλυψαν ότι η πρωτεΐνη των 54 kDa υπερεκφράζονταν σε μία ευρεία ποικιλία μετασχηματισμένων κυττάρων SV 40 ποντικού, αλλά και σε μη μολυσμένα εμβρυϊκά κύτταρα καρκινώματος. Ένας μερικός πεπτιδικός χάρτης αυτής της πρωτεΐνης ήταν ταυτόσημος μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών, αλλά ήταν σαφώς διαφορετικός από τον πεπτιδικό χάρτη του μεγάλου T αντιγόνου του SV 40 (**Kress et al., 1979, Linzer, Levine et al., 1979**). Θεωρήθηκε τότε, πως η SV 40 μόλυνση ή ο μετασχηματισμός κυττάρων ποντικού διέγειραν τη σύνθεση ή τη σταθερότητα μίας κυτταρικής πρωτεΐνης 54 kDa.

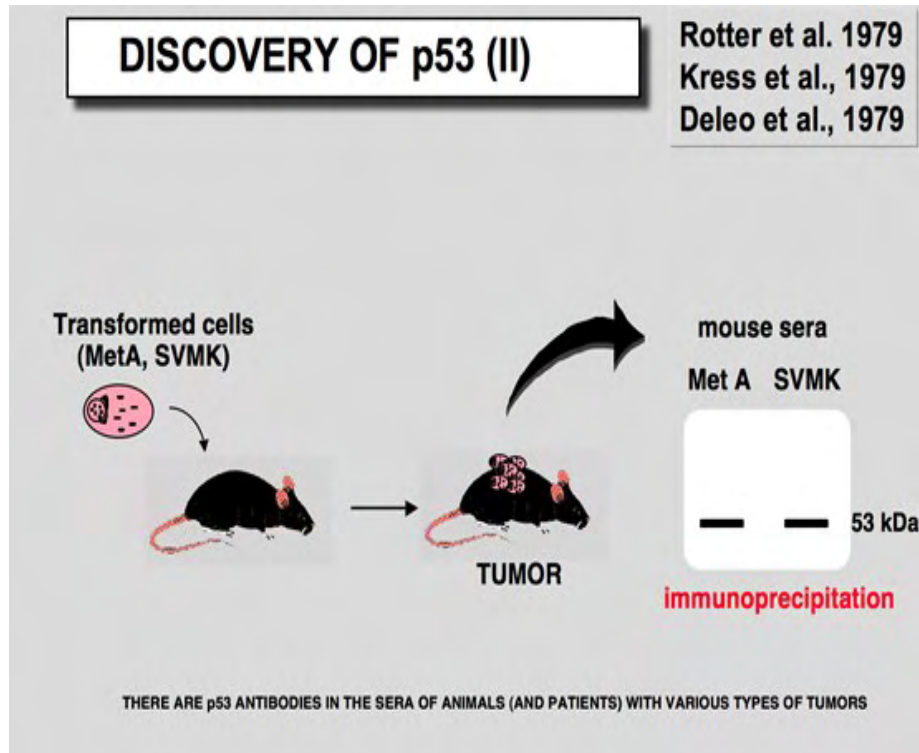
Εικόνα 23: Η ανακάλυψη της TP53.



#### Η ορολογική προσέγγιση

Το 1979, ο De Leo (**De Leo et al., 1979**) απέδειξε ότι η χυμική απόκριση ποντικών σε κάποιες καρκινικές κυτταρικές σειρές επαγόμενες από μεθυλχολανθρένιο, όπως το MethA, στρεφόταν προς την πρωτεΐνη TP53. Αργότερα, βρέθηκε πως κάποια ζώα που διέθεταν διάφορους τύπους καρκινικών όγκων προκάλεσαν μία ανοσολογική απόκριση ειδική για την πρωτεΐνη TP53 (**Kress et al., 1979, Melero et al., 1979, Rotter et al., 1980**). Το 1982, ο Crawford (**Crawford et al., 1982**) περιέγραψε για πρώτη φορά την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης TP53 στο 9% των ορών ασθενών με καρκίνο του μαστού. Δυστυχώς, δεν αναφέρθηκε καμία σημαντική κλινική συσχέτιση, καθώς εκείνη την εποχή δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τις μεταλλάξεις του γονιδίου της πρωτεΐνης TP53. Στη συνέχεια, ο Caron de Fromental διαπίστωσε πως τέτοιου τύπου αντισώματα ήταν παρόντα σε ορούς παιδιών με ευρεία ποικιλία καρκινικών τύπων (**Caron de Fromental et al., 1987**). Η μέση συχνότητα ήταν περίπου 12%, αλλά το ποσοστό υπολογίστηκε να αγγίζει το 20% στην περίπτωση του λεμφώματος Burkitt.

Εικόνα 24: Η ανακάλυψη της TP53.



### 1.7. Μονοπάτια της πρωτεΐνης TP53

Η πρωτεΐνη TP53 βρίσκεται στο σταυροδρόμι ενός δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών, που είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και την απόπτωση, η οποία επάγεται από γενετοξικές και μη γενετοξικές καταπονήσεις (Melino et al., 2002, Vogelstein et al., 2000, Vousden, Lu et al., 2002).

Σε φυσιολογικά κύτταρα, το επίπεδο της πρωτεΐνης TP53 ρυθμίζεται αρνητικά μέσω της δέσμευσης πρωτεϊνών, όπως η mdm2, η cop1, η pirh2 ή η jnk, που προάγουν την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης TP53 μέσω του μονοπατιού ουβικουιτίνης/πρωτεασώματος. Όμως, τα περισσότερα γονίδια ρυθμίζονται θετικά από την πρωτεΐνη TP53 και αυτό οδηγεί στη δημιουργία ενός βρόγχου ρύθμισης, που διατηρεί τελικά το επίπεδο της πρωτεΐνης πολύ χαμηλό στα φυσιολογικά κύτταρα.

Μετά από γενετοξικές ή μη γενετοξικές καταπονήσεις, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TP53 ακολουθεί μία διαδικασία δύο βημάτων. Πρώτον, το επίπεδο της πρωτεΐνης TP53 αυξάνεται μέσω αναστολής της αλληλεπίδρασής της με την mdm2 και τους άλλους αρνητικούς ρυθμιστές. Η υπερμετάφραση του RNA της πρωτεΐνης

TP53, που λειτουργεί συμπληρωματικά, εξασφαλίζει επίσης τη συσσώρευσή της. Δεύτερον, μία σειρά από ρυθμιστές (κινάσες, ακετυλάσες) ενεργοποιούν τη μεταγραφική δραστικότητα της πρωτεΐνης TP53.

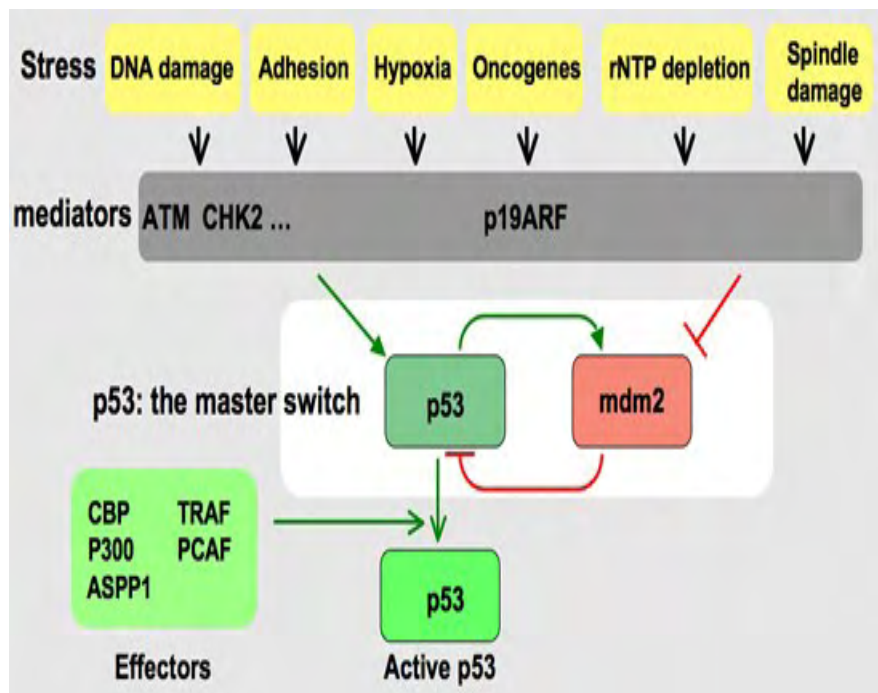
Ακόμη, ορισμένες πρωτεΐνες θεωρείται πως δεσμεύουν ποικίλες περιοχές της πρωτεΐνης TP53, προκειμένου να ρυθμίσουν την ιδιαιτερότητα της ενεργότητάς της.

Η καθοδική σηματοδότηση περιλαμβάνει μία σειρά γονιδίων που ενεργοποιούνται μέσω των δραστικότητων trans ενεργοποίησης της πρωτεΐνης TP53. Το γεγονός αυτό, πραγματοποιείται μέσω ειδικής δέσμευσης του DNA της πρωτεΐνης TP53 σε ένα στοιχείο απόκρισης της (TP53 RE), που βρίσκεται είτε στον προαγωγέα είτε στο ιντρόνιο των γονιδίων στόχων (El Deiry et al., 1992, Tokino, Nakamura et al., 2000).

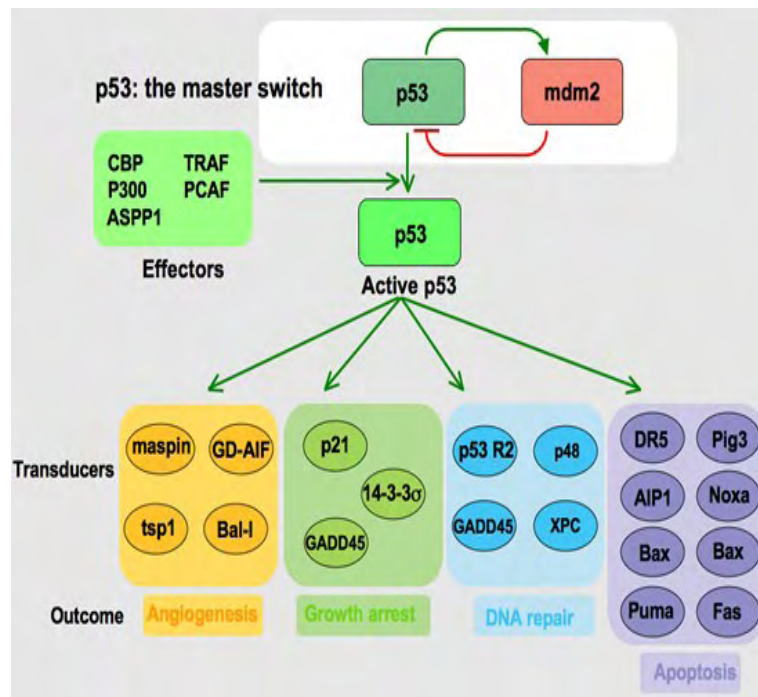
Ανεξάρτητα από τον τύπο της καταπόνησης, το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης TP53 είναι, είτε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση του DNA, είτε απόπτωση, αν και ο μηχανισμός που οδηγεί στην επιλογή μεταξύ αυτών των δρόμων δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί (Vousden, Lu et al., 2002).

Τα μονοπάτια της πρωτεΐνης TP53 διαιρούνται σε πέντε μέρη (Levine et al., 2006).

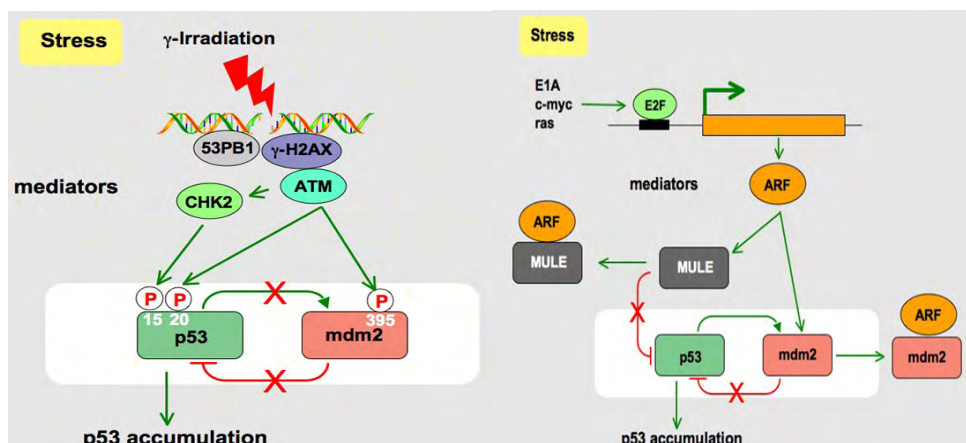
**Εικόνα 25: Ανοδικό μονοπάτι. Τα σήματα στρες που ενεργοποιούν το μονοπάτι. Οι ανοδικοί μεσολαβητές που ανιχνεύουν και ερμηνεύουν τα ανοδικά σήματα. Η πυρηνική ρύθμιση της TP53 μέσω αλληλεπίδρασής της με αρκετές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη σταθερότητά της.**



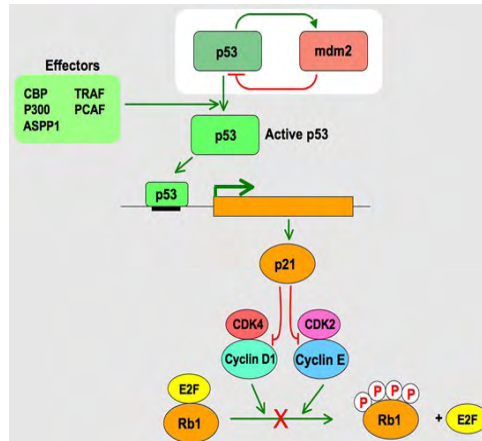
Εικόνα 26: Καθοδικό μονοπάτι. Η πυρηνική ρύθμιση της TP53 μέσω αλληλεπίδρασής της με αρκετές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη σταθερότητά της. Τα καθοδικά γεγονότα, κυρίως μεταγραφική ενεργοποίηση ή αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης. Το τελικό αποτέλεσμα, διακοπή της ανάπτυξης, απόπτωση ή επιδιόρθωση του DNA.



Εικόνα 27: Ανοδική σηματοδότηση. 1) μετά από βλάβη του DNA (ακτινοβολία γάμμα), η φωσφορυλίωση της TP53 και της mdm2 διαταράσσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. 2) μετά από ενεργοποίηση ογκογονιδίου, η mdm2 μετατοπίζεται μέσα στον πυρηνίσκο.

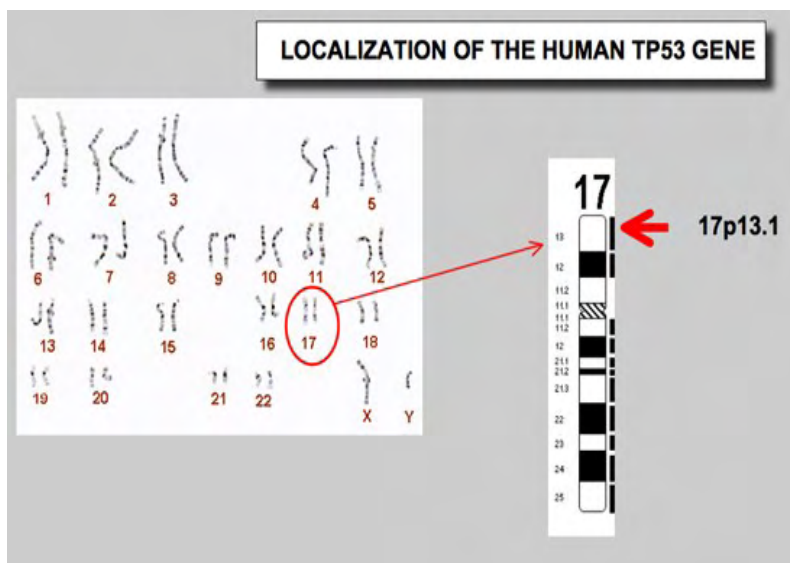


Εικόνα 28: Καθοδική σηματοδότηση. Σταμάτημα της G1 μέσω μεταγραφής της p21. Η CDK1 p21 αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της Rb μέσω αναστολής από τις κινάσες CDK4 και CDK2.



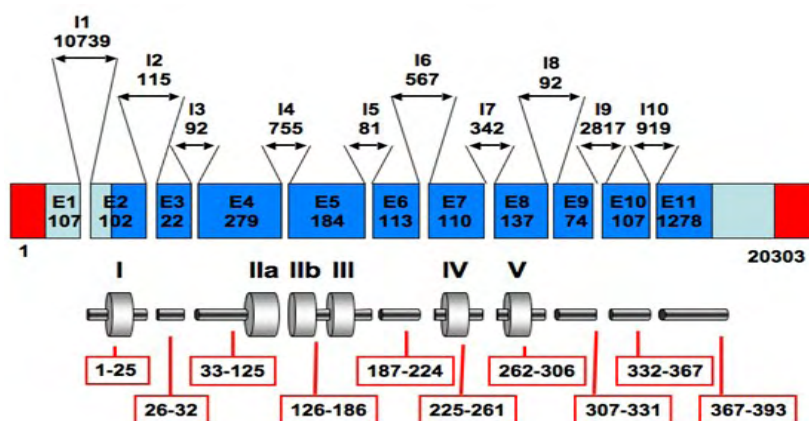
### 1.8. Γονίδιο της πρωτεΐνης TP53, Πρωτεΐνη TP53, Πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης TP53

Εικόνα 29: Το γονίδιο TP53 εντοπίζεται πάνω στο χρωμόσωμα 17 (κοντός βραχίονας, 17p13), μια περιοχή που συχνά εξαλείφεται στον ανθρώπινο καρκίνο.





Εικόνα 30: Η οργάνωση του ανθρώπινου γονιδίου TP53. 22 000 bp: Τα έντεκα εξόνια (μπλε) κωδικοποιούν για ένα mRNA 2,2 Kb. Η μετάφραση ξεκινά στο εξόνιο 2. Τα μεγέθη των εξονίων και των ιντρονίων απεικονίζονται σε bp.



Η ανθρώπινη πρωτεΐνη TP53 (HTP53) διαιρείται σε πέντε επικράτειες:

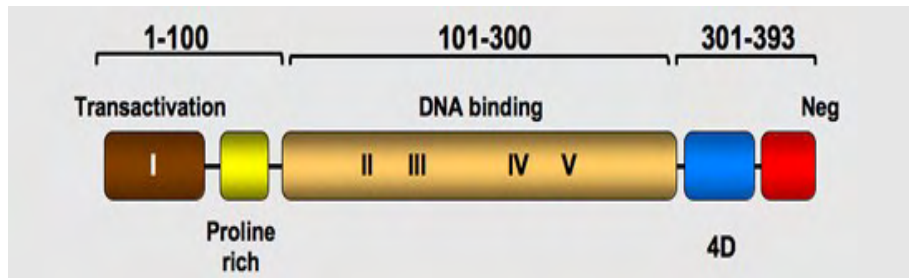
I. Το τμήμα του αμινοτελικού άκρου 1-42 περιλαμβάνει την αμινοξική επικράτεια trans ενεργοποίησης και τη θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης mdm2. Περιέχει επίσης την υψηλά συντηρημένη επικράτεια I (HCD I).

II. Η περιοχή 40-92 περιλαμβάνει σειρές επαναλαμβανόμενων αμινοξικών προλίνης, οι οποίες διατηρούνται στην πλειονότητα των πρωτεϊνών TP53. Περιέχει επίσης μια δεύτερη επικράτεια trans ενεργοποίησης.

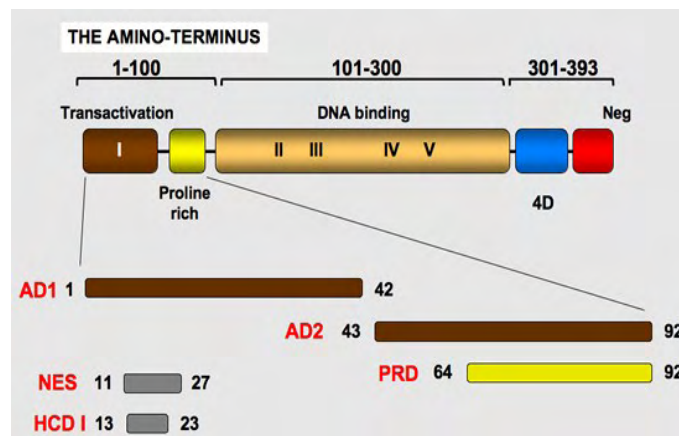
III. Η κεντρική περιοχή 101-306 περιλαμβάνει την επικράτεια δέσμευσης του DNA. Είναι ο στόχος του 90% των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης TP53 που βρίσκονται σε ανθρώπινους καρκίνους. Περιέχει την HCD II έως V.

IV. Η επικράτεια ολιγομερισμού 307-355, 4D αποτελείται από ένα βήτα κλώνο, που ακολουθείται από μία άλφα έλικα απαραίτητη για το διμερισμό, καθώς η πρωτεΐνη TP53 αποτελείται από ένα διμερές δύο διμερών. Ένα πυρηνικό σήμα εξόδου (NES) εντοπίζεται σε αυτή την επικράτεια ολιγομερισμού.

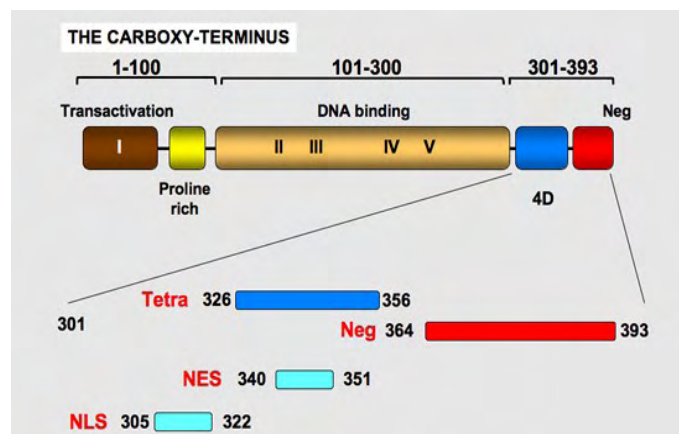
V. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης TP53 356-393 περιέχει τρία σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μία μη ειδική επικράτεια δέσμευσης του DNA που προσδένεται σε κατεστραμμένο DNA. Αυτή η περιοχή εμπλέκεται επίσης στην καταστολή της δέσμευσης του DNA από την κεντρική επικράτεια.



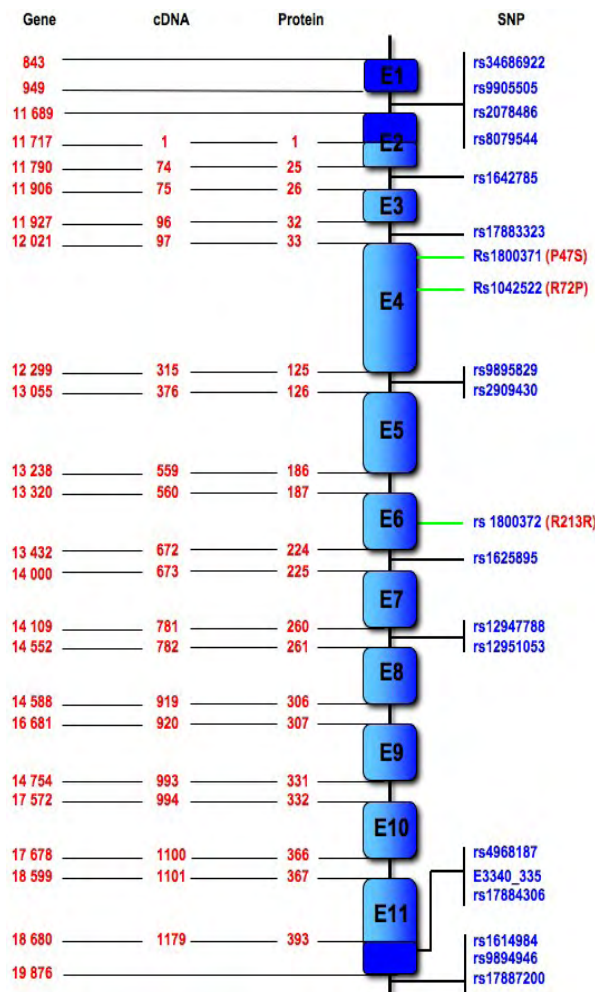
Εικόνα 31: Το αμινοτελικό άκρο της TP53. AD1: επικράτεια ενεργοποίησης 1, AD2: επικράτεια ενεργοποίησης 2, PRD: επικράτεια πλούσια σε προλίνη, NES: επικράτεια πυρηνικού αποκλεισμού, HCD I: υψηλά συντηρημένη περιοχή I.



Εικόνα 32: Το καρβοξυτελικό άκρο της TP53. Tetra (4D): επικράτεια ολιγομερισμού, AD2: επικράτεια ενεργοποίησης 2, NEG: επικράτεια αρνητικής ρύθμισης, NES: επικράτεια πυρηνικού αποκλεισμού, NLS: επικράτεια πυρηνικού εντοπισμού.



**Εικόνα 33:** Στο γονίδιο TP53 εντοπίζονται αρκετοί πολυμορφισμοί. Κάποιοι αναλύονται σε μεγάλη πληθυσμιακή κλίμακα και η κατανομή τους στον ανθρώπινο πληθυσμό είναι γνωστή (κωδικόνιο 72 (Arg/Pro), η επικάλυψη 16 pb στο ιντρόνιο 3 και στο ιντρόνιο 6 G/A SNP), ενώ άλλοι περιγράφονται περιστασιακά και η σημασία τους μένει να αναλυθεί. Πολύ σπάνιοι πολυμορφισμοί ή πολυμορφισμοί που περιγράφονται σε μία μόνο δημοσίευση δεν παρατίθενται εδώ.



### 1.9. Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη TP53 ανήκει σε μία μικρή οικογένεια, η οποία περιλαμβάνει δύο ακόμη πρωτεΐνες, τις p63 και p73. Αν και τα τρία μέλη της οικογένειας σχετίζονται τόσο δομικά όσο και λειτουργικά, οι πρωτεΐνες p63 και p73 έχουν διακριτούς ρόλους στη φυσιολογική ανάπτυξη, ενώ η πρωτεΐνη TP53 θεωρείται

ότι αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα των ανώτερων οργανισμών, με στόχο την αποτροπή της δημιουργίας νεοπλασμάτων. Η πρωτεΐνη TP53 ενεργοποιείται από μηνύματα που προκαλούν κυτταρικό stress (π.χ. απώλεια μηνυμάτων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου, υποξία, ανοξία, αλλοιώσεις του DNA, ογκογονίδια, ελάττωση της διαθεσιμότητας των ριβονουκλεοτιδίων, αναστολές των μικροσωληνίσκων και τελομεριδιακές αλλοιώσεις) και κακοήθη εξαλλαγή. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TP53 οδηγεί στην αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων καθώς και σε μία ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, όπως είναι η ανασχεση του κυτταρικού κύκλου, η γήρανση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, επιλογή που εξαρτάται από ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες. Σε κάποιες περιπτώσεις η πρωτεΐνη TP53 συμβάλλει επίσης στην επιδιόρθωση αλλοιώσεων του γενετικού υλικού, πράγμα που επιτρέπει την επαναφορά στον κύκλο πολλαπλασιασμού του κυττάρου στο οποίο αποκαταστάθηκε η αλλοίωση. Εντούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις η επαγωγή της πρωτεΐνης TP53 οδηγεί σε μη αντιστρεπτή αναστολή της κυτταρικής αύξησης, καθώς καταλήγει στην ενεργοποίηση της απόπτωσης.

### **1.10. Μηχανισμοί απώλειας της πρωτεΐνης TP53**

#### Μεταλλαγές του γονιδίου που κωδικεύει την πρωτεΐνη TP53

Στα κακοήθη νεοπλάσματα παρατηρείται απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης TP53, η οποία οφείλεται σε αλλοιώσεις που παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση της, σε μεταλλαγές στο γονίδιο που την κωδικεύει ή σε μεταλλαγές σε μόρια στόχους της πρωτεΐνης TP53, που είναι απαραίτητα για τη δράση της πρωτεΐνης. Μεταλλαγές του γονιδίου που κωδικεύει την πρωτεΐνη TP53 έχουν διαπιστωθεί περίπου στους μισούς νεοπλασματικούς όγκους του ανθρώπου που έχουν μελετηθεί. Αποτέλεσμα αυτών των μεταλλαγών είναι η απώλεια της αποπτωτικής λειτουργίας στα καρκινικά κύτταρα. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, μόνο το 5% των μεταλλαγών εντοπίζεται στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου (στο αμινο-τελικό και στο καρβοξυ-τελικό άκρο), ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των μεταλλαγών εκτείνεται στην κεντρική περιοχή του γονιδίου, που κωδικεύει το τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τις ειδικές θέσεις πρόσδεσης στο DNA. Οι μεταλλαγές του γονιδίου που κωδικεύει την πρωτεΐνη TP53 είναι κατά κύριο λόγο σημειακές (93.6%) και έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Επιπλέον, παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταλλαγών στα κωδικόνια 175, 245, 248, 249, 273 και 282, όπου εντοπίζεται το 28% των σημειακών μεταλλαγών. Η αντικατάσταση ενός αμινοξικού καταλοίπου δεν εμποδίζει πολλά καρκινικά κύτταρα να εκφράζουν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες TP53, οι οποίες συχνά χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη και εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Μία ερμηνεία της επιλογής υπέρ

της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης είναι ότι αυτή μπορεί να δρα ως επικρατής αρνητικός αναστολέας της ενεργότητας της φυσιολογικής πρωτεΐνης, δηλαδή συναγωνίζεται τη φυσιολογική πρωτεΐνη παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την ενεργότητά της. Σημειώνεται ότι η πρωτεΐνη TP53 δρα ως τετραμερές. Η διαπίστωση ότι πολλά νεοπλάσματα που φέρουν σημειακές μεταλλαγές χαρακτηρίζονται και από απώλεια ετεροζυγωτίας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του φυσιολογικού αλληλομόρφου, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επικρατής αρνητική δράση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μπορεί να μην είναι πλήρης και είναι σχεδόν σίγουρο ότι εξαρτάται από τη φύση της σημειακής μεταλλαγής. Εκτός από την επικρατή αρνητική αναστολή της φυσιολογικής πρωτεΐνης, κάποιες από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες εμπλέκονται και σε νέες λειτουργίες μετασχηματισμού που συμβάλλουν στην καρκινική εξέλιξη. Συγκεκριμένα, έχουν διαπιστωθεί μεταλλαγμένες πρωτεΐνες TP53 που αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία ανεξάρτητα από τη φυσιολογική πρωτεΐνη TP53. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της λειτουργίας δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί, αλλά πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζει την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TP53 να αλληλεπιδρά με τα άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας (τις p63 και p73) και να αναστέλλει τις ενεργότητές τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δε χαρακτηρίζουν τη φυσιολογική πρωτεΐνη TP53 και ρυθμίζονται από ένα πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 72, ο οποίος παρατηρείται σε μεγάλη συχνότητα.

#### Μεταλλαγές των γονιδίων που κωδικεύουν ρυθμιστές ή μόρια-στόχους της πρωτεΐνης TP53

Μοριακή ανάλυση νεοπλασμάτων που διατηρούν τη φυσιολογική πρωτεΐνη TP53 έχει αποκαλύψει την ύπαρξη αλλοιώσεων, είτε στις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που επιτρέπουν τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης TP53 κατά την απόκριση σε μηνύματα που προκαλούν κυτταρικό stress, είτε στα μόρια-στόχους που είναι απαραίτητα για την αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη MDM2 συμμετέχει σε ένα βρόχο αυτορύθμισης της πρωτεΐνης TP53, που εξασφαλίζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης στη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη. Η πρωτεΐνη MDM2 στοχεύει την πρωτεΐνη TP53 και την αποικοδομεί μέσω της ενεργότητας λιγάσης της ουβικουιτίνης που διαθέτει. Η ενεργοποίηση και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης TP53 σχετίζονται με την αναστολή της δράσης της MDM2, πράγμα που εξηγεί τη διαπίστωση αλλοιώσεων οδών μεταγωγής μηνυμάτων που παρεμποδίζουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης MDM2 σε νεοπλάσματα με φυσιολογική πρωτεΐνη TP53. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα διαφορετικά μηνύματα κυτταρικού stress χρησιμοποιούν διακριτές οδούς, που επιτρέπουν στην πρωτεΐνη TP53 να διαφεύγει από το ρυθμιστικό έλεγχο της MDM2. Υπάρχει επομένως δυνατότητα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης TP53 μέσω εναλλακτικών δρόμων, με αποτέλεσμα αλλοιώσεις που λαμβάνουν χώρα σε έναν μόνο εξ' αυτών, να μην αρκούν για την αναστολή της επαγωγής της πρωτεΐνης, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μίας άλλης οδού. Σε αυτή την πολλαπλότητα των οδών ενεργοποίησης είναι δυνατό να οφείλεται η πειραματική παρατήρηση (π.χ. στον καρκίνο του παχέος εντέρου) ότι οι

μεταλλαγές του γονιδίου που κωδικεύει την πρωτεΐνη TP53 αποτελούν όψιμο γεγονός της καρκινογένεσης.

### 1.11. Αποπτωτικές δράσεις της πρωτεΐνης TP53

Η πρωτεΐνη TP53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων τα οποία περιλαμβάνουν στις ρυθμιστικές τους περιοχές θέσεις πρόσδεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Από αναζητήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί με προγράμματα βιοπληροφορικής στο σύνολο των γνωστών γονιδίων του ανθρώπου (πριν γίνει διαθέσιμη η πλήρης αλληλουχία του ανθρώπινου γενώματος) έχουν προκύψει πάνω από 4000 πιθανές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης TP53. Πειραματικά έχει επιβεβαιωθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων ρυθμίζεται σε φυσιολογικές συνθήκες από την πρωτεΐνη TP53. Αυτά τα γονίδια στόχοι είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν σε ομάδες ανάλογα με τη συμμετοχή τους σε συγκεκριμένες λειτουργίες που επιτελούνται από την πρωτεΐνη TP53, όπως είναι η αναστολή της κυτταρικής έκφρασης, η επιδιόρθωση του DNA, η ενεργοποίηση της απόπτωσης και η ρύθμιση της αγγειογένεσης. Ειδικότερα, όσον αφορά τη λειτουργία της απόπτωσης, έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια που ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη TP53 και συμμετέχουν τόσο στις οδούς αποπτωτικών μηνυμάτων που επάγονται από υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και στις μιτοχονδριακές αποπτωτικές οδούς, στις οποίες θεωρείται ότι η πρωτεΐνη TP53 κατέχει κεντρική θέση, καθώς σχετίζεται με την απελευθέρωση από το μιτοχόνδριο του κυτοχρώματος c και του παράγοντα SMAC. Η πρωτεΐνη TP53 δεν ενεργοποιεί μόνο γονίδια που επάγουν την απόπτωση, αλλά και γονίδια που αναστέλλουν τις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων της κυτταρικής επιβίωσης. Η δυνατότητα της πρωτεΐνης TP53 να επάγει απόπτωση συμμετέχοντας σε πολλαπλές οδούς είναι δυνατό να σχετίζεται με την ογκοκατασταλτική λειτουργία της, καθώς η απώλεια της προ-αποπτωτικής γονιδιακής λειτουργίας είναι πολύ συχνό γεγονός στην καρκινική εξέλιξη. Επιπλέον, η πρωτεΐνη TP53 είναι σε θέση να καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση και να δρα ανεξάρτητα από τη ρύθμιση της μεταγραφής, λειτουργία που επίσης συνδέεται στενά με την ογκοκατασταλτική της ενεργότητα, όπως προκύπτει από μελέτες σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες TP53 που προέρχονται από νεοπλασματικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, αρκετά γονίδια με αντι-αποπτωτική ενεργότητα έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν στόχους της κατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης TP53 in vivo. Οι λειτουργίες της πρωτεΐνης TP53 που είναι ανεξάρτητες από τη γονιδιακή μεταγραφή αποτελούν αντικείμενο διχογνωμίας μεταξύ των επιστημόνων, καθώς είναι δύσκολος ο πειραματικός τους προσδιορισμός. Οι δράσεις αυτές της πρωτεΐνης TP53 είναι δυνατό να συνίστανται στην κινητικότητα, στην κυτταρική επιφάνεια των υποδοχέων που δίνουν το έναυσμα για τις αποπτωτικές οδούς, καθώς και στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Τέλος, νέα στοιχεία για τη φύση αυτών των δράσεων

της πρωτεΐνης TP53, οι οποίες δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί, προκύπτουν από τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια κάποιων κυττάρων.

### **1.12. Αποπτωτικά μηνύματα ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη TP53**

Η πρωτεΐνη TP53 ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο, εντούτοις, η επαγωγή της δεν οδηγεί απαραίτητως στην έναρξη πλήρους αποπτωτικής κυτταρικής απόκρισης, καθώς υπάρχουν αποπτωτικά ερεθίσματα που συνεργάζονται με την οδό που ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη TP53, χωρίς να εξαρτώνται από αυτή ή να αποτελούν μέλη της και συμβάλλουν στο να ξεπεραστεί το κατώφλι που οδηγεί στην απόπτωση. Απώλεια ενός από τα μέλη αυτών των αποπτωτικών οδών που συνεργάζονται με την πρωτεΐνη TP53 είναι επομένως δυνατό να αναστέλλει την αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης TP53.

### **1.13. Ρύθμιση της αποπτωτικής ενεργότητας της πρωτεΐνης TP53**

Η διαπίστωση του σημαντικού ρόλου των συνεργαζομένων αποπτωτικών μηνυμάτων συμπληρώνει την ερμηνεία των αποπτωτικών δράσεων της πρωτεΐνης TP53, η οποία όμως έχει άμεσο ρόλο στην επιλογή των οδών απόκρισης που ενεργοποιεί. Πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης θέσεων πρόσδεσης υψηλής ή χαμηλής συνάφειας για την πρωτεΐνη TP53 στους υποκινητές γονιδίων που έχουν ρόλο στην ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου ή στην απόπτωση, αντιστοίχως. Είναι λοιπόν πιθανό, η ύπαρξη μεταλλαγμένων πρωτεϊνών TP53 που χαρακτηρίζονται από τροποποιημένη διαμόρφωση στο χώρο ή χαμηλών επιπέδων πρωτεΐνης φυσιολογικού τύπου (π.χ. σε καρκινικά κύτταρα) να οδηγούν σε ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου, επειδή κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι δυνατή η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TP53 μόνο με τις θέσεις πρόσδεσης υψηλής συνάφειας. Αντιθέτως, η φυσιολογική πρωτεΐνη TP53, που εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα μέσα στο κύτταρο, είναι ικανή να προκαλεί απόπτωση μέσω αλληλεπίδρασης και με τις θέσεις πρόσδεσης χαμηλής συνάφειας, που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων που συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που εμπλέκουν τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TP53 κατά την ενεργοποίηση της μεταγραφής στην εκάστοτε επιλογή των γονιδίων-στόχων. Στη ρύθμιση της αποπτωτικής απόκρισης θεωρείται ότι συμβάλλουν και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TP53 και επηρεάζουν άμεσα την πρόσδεση της στο DNA, δηλαδή δρουν ως αποπτωτικοί συμπαράγοντες. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία μίας τουλάχιστον εκ των πρωτεϊνών p63 και p73 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της απόπτωσης. Καθώς η φυσιολογική πρωτεΐνη TP53 δεν προσδένεται στις p63 και p73, η συμβολή

αυτών των πρωτεϊνών στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TP53 με κάποιους υποκινητές, πιστεύεται ότι είναι έμμεση. Επιπρόσθετα, παράγοντες που είναι πιθανό να αναστέλλουν την αποπτωτική λειτουργία της πρωτεΐνης TP53, χωρίς όμως να έχει διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους, είναι η απορύθμιση της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων E2F, η οποία παρατηρείται στην πλειοψηφία των νεοπλασμάτων του ανθρώπου, καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας NF κB, ο οποίος έχει ισχυρή αντι-αποπτωτική δράση σε κάποια κυτταρικά συστήματα.

#### **1.14. Άλλα επίπεδα ρύθμισης της αποπτωτικής ενεργότητας της πρωτεΐνης TP53**

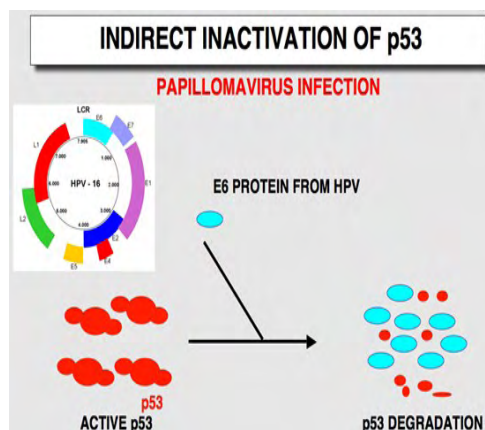
Η αποπτωτική διαδικασία ρυθμίζεται επίσης από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις των μελών της αποπτωτικής μηχανής. Η πρωτεΐνη TP53 χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες φωσφορυλιώσεις. Ειδικότερα, φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων σχετίζεται με την επαγωγή απόπτωσης από την πρωτεΐνη TP53. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φωσφορυλίωση της σερίνης 46, που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων στόχων που προκαλούν απόπτωση, αλλά όχι για την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 46 αποτελεί, επομένως, κομβικό σημείο στην επιλογή της φυσιολογικής λειτουργίας που ακολουθεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TP53. Γι' αυτό, εμπλέκονται στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης αρκετές κινάσες, καθώς και μία φωσφατάση που αλληλεπιδρά με κινάσες αναστέλλοντας τη δράση τους. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβάλλει η φωσφορυλίωση στην ενεργοποίηση της απόπτωσης δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί. Πιθανή είναι η αλλαγή της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεσή της στους υποκινητές των αποπτωτικών γονιδίων στόχων, ενώ δε μπορεί να αποκλειστεί και η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης TP53 με πρωτεΐνες που έχουν ρόλο αποπτωτικού συμπαραγόντα. Εκτός από τη φωσφορυλίωση, ρόλο στη ρύθμιση της αποπτωτικής απάντησης έχουν και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η ακετυλίωση. Η ενεργότητα της πρωτεΐνης TP53, συμπεριλαμβανομένων των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και της ικανότητας αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, ελέγχεται περαιτέρω μέσω της ρύθμισης της εντόπισης στα διαμερίσματα του κυττάρου των μελών των οδών που ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη TP53. Η πρωτεΐνη TP53 εισέρχεται ή εξέρχεται από τον πυρήνα και εντοπίζεται σε διακριτές δομές, τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν υποπυρηνικές δομές που ονομάζονται πυρηνικά σωμάτια και οι οποίες θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής και την επαγωγή της κυτταρικής απόκρισης μέσω της πρωτεΐνης TP53 αφού, σύμφωνα με πειραματικά ευρήματα, σε αυτά συσσωρεύονται όχι μόνο μόρια της



πρωτεΐνης TP53, αλλά και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, κινάσες, καθώς και αποπτωτικοί συμπαράγοντες. Τέλος, η επαγωγή της απόπτωσης από την πρωτεΐνη TP53 ανακόπτεται από παράγοντες που ευνοούν την επιβίωση του κυττάρου και σχετίζονται με την ενεργοποίηση της κινάσης AKT, η οποία επιτελεί την αντι-αποπτωτική της δράση, είτε ενεργοποιώντας μέσω φωσφορύλιωσης την πρωτεΐνη MDM2, είτε παρεμποδίζοντας τη μεταγωγή του αποπτωτικού μηνύματος από την πρωτεΐνη TP53 προς τα γονίδια-στόχους της. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη TP53 αντισταθμίζει την ανασταλτική δράση της AKT, επάγοντας την έκφραση της φωσφατάσης PTEN, η οποία αναστέλλει την ενεργοποίηση της κινάσης AKT.

### 1.15. Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Η ιική ογκοπρωτεΐνη E6 που εκφράζεται από τον HPV προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη TP53 και επάγει την αποικοδόμηση της (Scheffner et al., 1990). Η παρατήρηση αυτή, εξηγεί τη σπανιότητα των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Crook et al., 1992). Η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης TP53 από μία ιική πρωτεΐνη δεν αποδεικνύεται σε άλλους ανθρώπινους καρκίνους που σχετίζονται με ιική λοίμωξη, όπως στον HCC (που σχετίζεται με τον ιό HBV) ή στο λέμφωμα Burkitt (που σχετίζεται με τον ιό EBV).



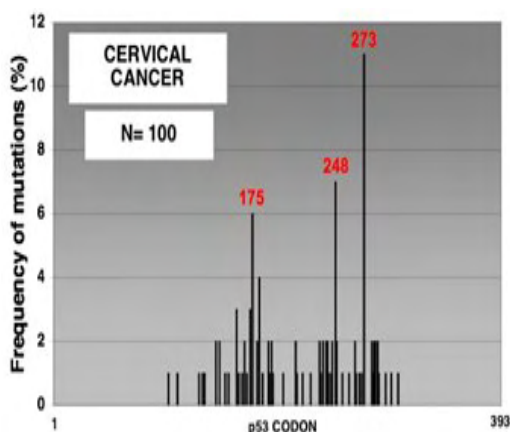
Συγκεκριμένοι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων συνδέονται με ορισμένους ανθρώπινους καρκίνους του γεννητικού συστήματος και κυρίως με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Howley et al., 1991, Zur Hausen, Schneider et al., 1987). Συγκεκριμένα, σε ποσοστό παραπάνω από 90% τα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας περιέχουν DNA από κάποιον HPVs υψηλού κινδύνου (ως επί το πλείστον HPV 16 και HPV 18 και σε σπανιότερες περιπτώσεις HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52 και HPV 56). Το DNA βρίσκεται συνήθως ενσωματωμένο, αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου είναι φαινομενικά εξωχρωμοσωμικό.

Η διαπίστωση ότι η ιική ογκοπρωτεΐνη E6 των HPVs υψηλού κινδύνου μπορεί να επάγει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης TP53, είτε *in vitro*, είτε *in vivo*, οδήγησε στην πρόταση ένα τέτοιο μονοπάτι απενεργοποίησης να εμπλέκεται σε νεοπλασματική διαδικασία και να οδηγεί πιθανών σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Crook et al., 1991, Scheffner et al., 1990). Αυτή η παρατήρηση κατεύθυνε ένα σημαντικό αριθμό ερευνητών να στραφεί στη μελέτη της κατανομής των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης TP53 σε ανθρώπινα πρωτογενή τραχηλικά καρκινώματα ή σε κυτταρικές σειρές, με ή χωρίς λοίμωξη από HPV.

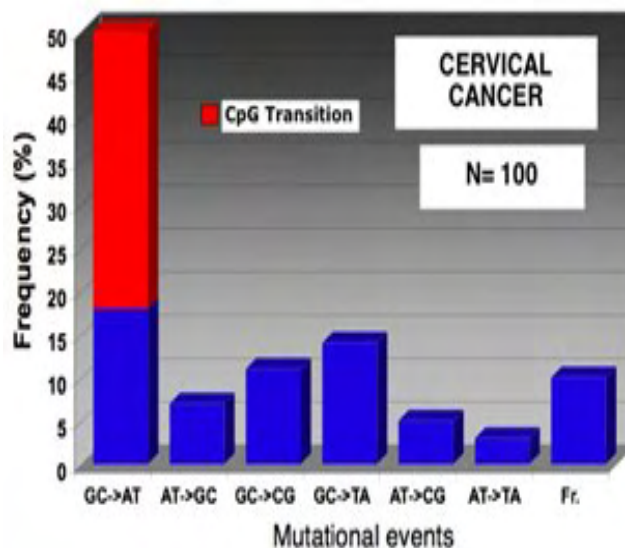
Σε μία πρώτη έκθεση, ο Crook (Crook et al., 1991) απέδειξε ότι έξι θετικές HPV κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας εξέφρασαν πρωτεΐνη TP53 άγριου τύπου, ενώ δύο φαινομενικά αρνητικές HPV κυτταρικές σειρές εξέφρασαν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη TP53. Αργότερα, ο Scheffner (Scheffner et al., 1991) ανέφερε πως δύο άλλες αρνητικές HPV κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας εξέφρασαν επίσης μεταλλαγμένη πρωτεΐνη TP53. Η ανάλυση καρκινικών δειγμάτων 28 γυναικών, που έπασχαν από πρωτογενή καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, έδειξε ότι οι 25 ήταν θετικές σε HPV 16 ή HPV 18, αν και η αλληλούχηση ολόκληρης της κωδικής περιοχής του γονιδίου της πρωτεΐνης TP53 απέτυχε να καταδείξει οποιαδήποτε μετάλλαξη (Crook et al., 1992). Αντιθέτως, η αλληλούχηση αποκάλυψε σημειακές μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη TP53 των τριών HPV αρνητικών καρκινικών όγκων.

Το γεγονός ότι τα HPV αρνητικά καρκινώματα έχουν τελικά χειρότερη πρόγνωση από τα HPV θετικά καρκινώματα ενισχύει σημαντικά όλα τα παραπάνω. Ακόμη, η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης TP53 από την πρωτεΐνη E6 οδηγεί μονάχα σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης TP53, ενώ αντίθετα οι σωματικές μεταλλάξεις συνοδεύονται από την έκφραση μίας εξαλλαγμένης πρωτεΐνης TP53, η οποία παρεμβαίνει στην πρωτεΐνη TP53 άγριου τύπου και προκαλεί εξακολουθητικά θετική δραστικότητα μετασχηματισμού.

**Εικόνα 34: Κατανομή των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.**



Εικόνα 35: Γεγονότα μεταλλάξεων στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.



#### 1.16. Ο πολυμορφισμός Arg72Pro της πρωτεΐνης TP53 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Ένας κοινός πολυμορφισμός της πρωτεΐνης TP53 στο αμινοξύ 72 χαρακτηρίζεται ως Arg72Pro και οδηγεί τελικά είτε σε αμινοξύ προλίνης Pro72 (TP53Pro) είτε σε αμινοξύ αργινίνης Arg72 (TP53Arg). Και οι δύο μορφές κατέχουν βιολογική δραστικότητα άγριου τύπου (Thomas et al., 1999), αν και οι δύο παραλλαγές της πρωτεΐνης TP53 στο κωδικόνιο 72, πιθανώς συμβάλλουν με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μάλιστα, ο Storey απέδειξε ότι η παραλλαγή TP53Arg αδρανοποιείται σαφώς πιο αποτελεσματικά από την ιική ογκοπρωτεΐνη E6 των τύπων HPVs υψηλού κινδύνου, απ' ό,τι η παραλλαγή TP53Pro. Επιπροσθέτως, ανέλυσε τραχηλικά δείγματα ως προς την κατανομή των δύο παραλλαγών της πρωτεΐνης TP53 ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς γυναίκες (Storey et al., 1998), και απέδειξε πως οι γυναίκες με αλληλομορφικό τύπο Arg/Arg διατρέχουν σημαντικότερο κίνδυνο εμφάνισης HPV σχετιζόμενου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας απ' ό,τι οι γυναίκες με αλληλομορφικό τύπο Pro/Pro ή οι ετεροζυγώτες. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο κλινικό εύρημα παραμένει ακόμη και σήμερα αντικείμενο συζήτησης, καθώς οι επακόλουθες μελέτες δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν τα επιδημιολογικά δεδομένα που αναφέρθηκαν από τον Storey. Την ίδια στιγμή, ορισμένες άλλες έρευνες κατέδειξαν έναν παρατηρούμενο συνωστισμό ως προς το αλληλόμορφο Arg72 σε γυναίκες ασθενείς με καρκίνο σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες (Agorastos et al., 2000, Helland et al., 1998, Hildesheim et al., 1998,

Josefsson et al., 1998, Lanham et al., 1998, Makni et al., 2000, Minaguchi et al., 1998, Zehbe et al., 1999, 2001).

Ωστόσο, η ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία, στην οποία μάλιστα εμπλέκονται ποικίλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, επομένως μπορούν δυνητικά να εξηγηθούν οι αποκλίσεις των διαφόρων μελετών. Είναι ακόμη πιθανό, η παρουσία πρόσθετων παραγόντων κινδύνου να καθιστά ακόμη και ανούσια τη συμβολή του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης TP53 στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Για παράδειγμα, αναφέρθηκε πως οι ενδοτοπικές φυσικές παραλλαγές HPV ίσως εμπλέκονται στον καθορισμό της εξέλιξης ή της υποχώρησης HPV επαγόμενων βλαβών (Zehbe, Tommasino et al., 1999). Επιπλέον, τα λειτουργικά δεδομένα που αναφέρθηκαν από τον Storey και τους συναδέλφους του (Storey et al., 1998) απέδειξαν πως και οι δύο παραλλαγές της πρωτεΐνης TP53 αποτελούν στόχο της πρωτεΐνης E6, αν και η TP53Arg θεωρείται προτιμότερο υπόστρωμα απ' ότι η TP53Pro. Πιθανόν, οι διαφορετικές αποδόσεις αποικοδόμησης των πολυμορφικών μορφών της πρωτεΐνης TP53 κατέχουν σε οριακό βαθμό επιπτώσεις στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας και κατά συνέπεια ανιχνεύεται μονάχα μία ασθενής συσχέτιση μεταξύ του TP53Arg αλληλομόρφου και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

### 1.17. Ο διπλασιασμός E1-1374<sup>^</sup>63nt του γονιδίου E1 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Στο 5' άκρο του γονιδίου E1 ανιχνεύθηκε ένας ενδογονιδιακός διπλασιασμός 63 νουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1311 και 1374 εντοπίστηκε διαδοχικά διπλασιασμένη χωρίς ωστόσο να καταστραφεί το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου. Επιπλέον, ο ενδογονιδιακός διπλασιασμός προκάλεσε επανάληψη της θέσης μεταξύ των αμινοξέων 150 έως 170 στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E1, το οποίο ευθύνεται για την πρόσδεσή της στην ιστόνη H1 (Swindle, 1998, Wilson et al., 2002).

Η ανίχνευση του διπλασιασμού οδήγησε στη μελέτη της επικράτησής του σε τραχηλικά κλινικά δείγματα προερχόμενα από τον ελληνικό πληθυσμό και στον μετέπειτα προσδιορισμό της σημασίας του στη δομή και στη λειτουργία της πρωτεΐνης E1. Μελετήθηκαν κλινικά δείγματα χαρακτηρισμένα τόσο ως χαμηλού όσο και ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου. Η ανίχνευση του διπλασιασμού πραγματοποιήθηκε μέσω PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές E1F1-E1R3, οι οποίοι υβριδίζονται σε θέσεις που περιλαμβάνουν την περιοχή του διπλασιασμού. Το προϊόν της αντίδρασης είχε μέγεθος 645bp, ενώ το προϊόν που περιελάμβανε το διπλασιασμό 708bp. Η ενίσχυση του 5' άκρου του γονιδίου E1 με τους εκκινητές οδήγησε στην ανίχνευση της ζώνης μεγέθους 708bp

στο 24% των εξεταζόμενων δειγμάτων, ενώ το 76% αυτών έφεραν την κανονική ζώνη μεγέθους 645bp. Κατόπιν, η ανάλυση της αλληλουχίας της ζώνης μεγέθους 708bp απέδειξε την ύπαρξη διαδοχικού διπλασιασμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1311 και 1374. Ο διπλασιασμός των 63 νουκλεοτιδίων ανιχνεύθηκε στο 30.4% των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης και στο 18% των δειγμάτων υψηλού βαθμού αλλοίωσης. Επομένως, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του διπλασιασμού και της σοβαρότητας της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (Tsakogiannis et al., 2014).

Ο διπλασιασμός E1-1374<sup>63nt</sup> προκάλεσε την επανάληψη της περιοχής μεταξύ των αμινοξέων 150 έως 170 στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E1. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν εξελικτική μελέτη της περιοχής του διπλασιασμού για τη διερεύνηση κάποιας πιθανής επίδρασης στη δομή και στη λειτουργία του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης λόγω του διπλασιασμού. Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης που ασκείται στο γονίδιο και του μέσου ρυθμού υποκατάστασης του πρώτου, δεύτερου και τρίτου νουκλεοτιδίου του κωδικονίου απέδειξε ότι στην περιοχή του διπλασιασμού ασκείται αρνητική επιλεκτική πίεση. Άρα, η περιοχή του γονιδίου E1 είναι αρκετά συντηρημένη και η δομή ή λειτουργία του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης δεν επηρεάζονται αρνητικά. Ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο ο διπλασιασμός επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης E1, πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογισμού του λόγου dN/dS ως προς την επίδραση της εξέλιξης με επακόλουθη την ανίχνευση άσκησης αρνητικής επιλεκτικής πίεσης στην περιοχή του διπλασιασμού (Tsakogiannis et al., 2014). Η εξέλιξη επομένως, διατηρεί σταθερή τη συγκεκριμένη περιοχή χωρίς να επηρεάζει αρνητικά τη δομή και τη λειτουργία του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης E1 (Vandepoele et al., 2005). Η υπόθεση ενισχύθηκε από πρόσφατη έρευνα πρόβλεψης και απεικόνισης μέσω βιοπληροφορικής της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της πρωτεΐνης E1 που φέρει το διπλασιασμό των 21 αμινοξέων, προτείνοντας ότι ο διπλασιασμός E1-1374<sup>63nt</sup> και η αμινοξική μετάλλαξη E63D τοποθετούνται και εντοπίζονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης E1 χωρίς επομένως την πρόκληση σημαντικών αλλαγών στη δομή και στη λειτουργία της εξαιτίας του διπλασιασμού (Sabol et al., 2012).

Μέχρι στιγμής, ο διπλασιασμός των 63 νουκλεοτιδίων του γονιδίου E1 αναφέρθηκε στην Κίνα, στην Κροατία, στη Σλοβενία και στην Ελλάδα (Dong et al., 2000, Sabol et al., 2008, Bogovac et al., 2011, Sabol et al., 2012, Tsakogiannis et al., 2014). Συγκεκριμένα, ο ενδογονιδιακός διπλασιασμός, εντοπίστηκε στο 8% των εξεταζόμενων δειγμάτων στη Σλοβενία (Bogovac et al., 2011), στο 10% των εξεταζόμενων δειγμάτων στην Κροατία (Sabol et al., 2008, 2012), και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στην Κίνα, ενώ το 24% των εξεταζόμενων δειγμάτων του ελληνικού γυναικείου πληθυσμού φέρουν επίσης το διπλασιασμό E1-1374<sup>63nt</sup> (Tsakogiannis et al., 2014). Η υψηλή επικράτηση του διπλασιασμού στον ελληνικό πληθυσμό, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκριμένη παραλλαγή του γονιδιώματος του ιού παρουσιάζει αυξημένη κατανομή στις ανατολικές χώρες της Ευρώπης. Η μελέτη μέσω ευρύτερων δειγματοληψιών ευρωπαϊκών και ασιατικών πληθυσμών θα οδηγήσει στην εξακρίβωση της

παραπάνω υπόθεσης και στην ερμηνεία της διασποράς της καινούριας παραλλαγής του HPV 16 σε επίπεδο παγκόσμιου πληθυσμού.

Ως προς την ερμηνεία του μηχανισμού ύπαρξης του διπλασιασμού E1-1374<sup>63</sup>nt, η πρώτη άποψη υποστηρίζει ότι καθώς η πρωτεΐνη E1 είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος του HPV 16 ίσως συμβαίνει ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών στελεχών της ευρωπαϊκής παραλλαγής του γονιδιώματος του ιού, προκαλώντας τον ενδογονιδιακό διπλασιασμό των 63 νουκλεοτιδίων, ενώ η δεύτερη θεώρηση προτείνει πως η σύνδεση του διπλασιασμού E1-1374<sup>63</sup>nt με την ευρωπαϊκή παραλλαγή του HPV 16 ίσως αποτελεί ένδειξη της παρουσίας μίας νέας παραλλαγής του γονιδιώματος του ιού που κυκλοφορεί με υψηλή συχνότητα στον ευρωπαϊκό πληθυσμό (**Sabol et al., 2008**).

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Ασθενείς

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 60 γυναίκες, 14 υγιείς και 46 ασθενείς με διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης CIN ή καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Συγκεκριμένα, 23 από τις ασθενείς εμφάνισαν χαμηλού βαθμού δυσπλασία και 23 υψηλού βαθμού δυσπλασία. Τα κλινικά δείγματα αφορούσαν τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία συλλέχθηκαν στη διάρκεια της χρονικής περιόδου 2014-2015 σε υγρό μέσο ThinPrep, ενώ προήλθαν από το Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών "Άγιος Σάββας" (τετραψήφια αριθμητική κωδικοποίηση) και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών" ("S" κωδικοποίηση).

**Πίνακας 1: Η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, το έτος και το υλικό μέσο συλλογής, η προέλευση, καθώς και η κλινική εικόνα της ασθενούς.**

Κλινικό δείγμα	Έτος συλλογής	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση	Κλινική εικόνα
3500	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών "Άγιος Σάββας"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3515	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών "Άγιος Σάββας"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3539	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών "Άγιος Σάββας"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3570	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών	Υψηλού βαθμού δυσπλασία

			“Άγιος Σάββας”	
3571	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3578	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3591	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3592	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3603	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3611	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3623	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3624	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3629	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3670	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών	Υψηλού βαθμού δυσπλασία



			“Άγιος Σάββας”	
3674	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3676	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3677	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3807	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3841	2015	ThinPrep	Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών “Άγιος Σάββας”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 105-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 153-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 158-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 159-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 162-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 166-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 212-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικών”	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία

S 357-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 449-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 500-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 513-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 528-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 532-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 537-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 555-15	2015	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 558-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 626-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 889-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 900-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 912-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 1026-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 1083-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 1089-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό	Χαμηλού βαθμού

			Νοσοκομείο "Αττικών"	δυσπλασία
S 1099-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 1100-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 1229-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 1411-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 1759-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 1941-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 1958-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 2061-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 2063-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2085-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2087-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 2095-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2192-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2193-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 2417-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό	Υψηλού βαθμού

			Νοσοκομείο "Αττικών"	δυσπλασία
S 2418-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Φυσιολογικό
S 2420-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2541-14	2014	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών"	Υψηλού βαθμού δυσπλασία

## 2.2. Γενετική ανάλυση

### Εκχύλιση

Το γενωμικό DNA εκχυλίστηκε από αποθηκευμένα δείγματα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης GuSCN.

### Ταυτοποίηση

Οι εκκινητές της Multiplex PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ήταν: HPV16 L1F 5'-CACTATTTTGGAGGACTGGAAT-3' (Metabion) και HPV16 L1R 5'-GATGAGGTGGTGGGTGTAGC-3' (Metabion), HPV45 L1F 5'-TTTATCATGCAGGCAGTTCC-3' (Metabion) και HPV45 L1R 5'-CCACGACCAATTTCCATACC-3' (Metabion), HPV66 L1F 5'-CGCCGTAAACGTATTCCCTA-3' (Metabion) και HPV66 L1R 5'-CCAACAGCAAGCAACCTAGA-3' (Metabion). Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή RoboCycler σε 25  $\mu\text{l}$  μείγματος PCR, το οποίο περιείχε 3  $\mu\text{l}$  γενωμικού DNA, 2,5  $\mu\text{l}$  τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs 1 mM, 5  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος (1x Kara 2G Buffer A, Kara  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, Kara Biosystems), 0,1  $\mu\text{l}$  ενζύμου DNA πολυμεράσης 0,5 U (Kara 2G Fast HotStart DNA Polymerase, Kara Biosystems) και 1  $\mu\text{l}$  Forward Primer Mix 25 pmol και 1  $\mu\text{l}$  Reverse Primer Mix 25 pmol. Οι συνθήκες της PCR αφορούσαν αρχική θερμοκρασία  $95^{\circ}\text{C}$  για χρόνο 2 λεπτά, 40 κύκλους με αποδιάταξη στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 20 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 10 δευτερόλεπτα και τελική θερμοκρασία  $72^{\circ}\text{C}$  για χρόνο 1 λεπτό.

Ο πολυμορφισμός Arg72Pro της πρωτεΐνης TP53 προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) - RFLP (πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού).

Ο διπλασιασμός 1374<sup>^</sup>63nt του γονιδίου E1 προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

### **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Οι εκκινητές της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της πολυμορφικής περιοχής του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 ήταν: εμπρόσθιος 5'-TTCACCCATCTACAGTCC-3' και ανάστροφος 5'-CTCAGGCGAACTGACCGT-3'. Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή RoboCycler σε 50 μl μείγματος PCR, το οποίο περιείχε 3 μl γενωμικού DNA, 5 μl τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs 1 mM, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (1x Paq 5000<sup>™</sup> Reaction Buffer, 1x Mg<sup>2+</sup> 2 mM, Stratagene), 0,5 μl ενζύμου DNA πολυμεράσης 2,5 U (Paq 5000<sup>™</sup> DNA Polymerase, Stratagene) και 0,5 μl από τον εκκινητή p53FBur (Macrogen) 25 pmol και 0,5 μl από τον εκκινητή p53RBur (Macrogen) 25 pmol. Οι συνθήκες της PCR αφορούσαν αρχική θερμοκρασία 95°C για χρόνο 2 λεπτά, 50 κύκλους με αποδιάταξη στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 52°C για 20 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική θερμοκρασία 72°C για χρόνο 5 λεπτά.

Οι εκκινητές της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου E1 ήταν: εμπρόσθιος 5'-CAGGTACCAATGGGAAGA-3' και ανάστροφος 5'-GAAAACTCACCCCGTATAAC-3'. Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή RoboCycler σε 50 μl μείγματος PCR, το οποίο περιείχε 3 μl γενωμικού DNA, 5 μl τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs 1 mM, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (1x Paq 5000<sup>™</sup> Reaction Buffer, 1x Mg<sup>2+</sup> 2 mM, Stratagene), 0,5 μl ενζύμου DNA πολυμεράσης 2,5 U (Paq 5000<sup>™</sup> DNA Polymerase, Stratagene) και 0,5 μl από τον εκκινητή E1F1 (Metabion) 25 pmol και 0,5 μl από τον εκκινητή E1R3 (Metabion) 25 pmol. Οι συνθήκες της PCR αφορούσαν αρχική θερμοκρασία 95°C για χρόνο 2 λεπτά, 40 κύκλους με αποδιάταξη στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική θερμοκρασία 72°C για χρόνο 5 λεπτά.

### **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Ένα τμήμα DNA μεγέθους 309 bp ενισχύθηκε και ακολούθως πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με τη χρήση 1 μl ενζύμου περιορισμού 10 U (Acc II, Takara), 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος (10x M Buffer, Takara) και 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (10x Loading Buffer, Takara). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και χρόνου 2 ωρών.

### Ηλεκτροφόρηση

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν 10 μl των προϊόντων ενίσχυσης ή πέψης μέσω οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2% με χρωστική το βρωμιούχο αιθίδιο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 1,2 g αγαρόζης, 60 ml TBE (Tris, Boric acid, EDTA) καθώς και διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου EtBr<sub>2</sub> για την παρασκευή του πηκτώματος, στο οποίο μεταφέρθηκαν ο μάρτυρας μοριακού βάρους DNA Ladder 100 bp και 10 μl προϊόντος ενίσχυσης ή πέψης αναμεμειγμένα με 2 μl χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης αφορούσαν ένταση 120 V, 50 mA και χρόνο 30 λεπτά.

Ένα τμήμα 498 bp του γονιδίου της β ακτίνης ενισχύθηκε παράλληλα χρησιμοποιώντας τους εκκινητές B.ACTINF (Metabion) και B.ACTINR (Metabion) για τον έλεγχο της αντίδρασης ενίσχυσης. Οι συνθήκες της PCR ήταν αρχικά 2 λεπτά στους 95°C, 40 κύκλοι με 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, 20 δευτερόλεπτα στους 60°C, 10 δευτερόλεπτα στους 72°C και τελικά 1 λεπτό στους 72°C.

### 2.3. Στατιστική ανάλυση

Η κατανομή των γονοτύπων ελέγχθηκε μεταξύ ασθενών και υγείων ώστε να εξακριβωθεί αν βρίσκονταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των υγείων και των ασθενών με δυσπλασίες χαμηλού και υψηλού βαθμού υπολογίστηκε μέσω της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά, όταν η πιθανότητα ύπαρξης τυχαίων ευρημάτων ήταν μικρότερη από 5% ( $P < 0,05$ ). Οι αναλογίες των πιθανοτήτων υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν με 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Το σύνολο των στατιστικών αναλύσεων διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας GraphPad Software.

**Πίνακας 2: Η ονομασία, η αλληλουχία 5'→3' και η τοποθεσία των εκκινήτων, καθώς και το μέγεθος του τμήματος.**

Ονομασία εκκινήτη	Αλληλουχία 5'→3'	Τοποθεσία	Μέγεθος τμήματος (bp)
p53FBur	TTCACCCATCTACAGTCC	Κωδικόνιο 72	309
p53RBur	CTCAGGCCGAACCTGACCGT	Κωδικόνιο 72	309
E1F1	CAGGTACCAATGGGGAAGA	Γονίδιο E1	645
E1R3	GAAAAACTCACCCCGTATAAC	Γονίδιο E1	645
HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	Γονίδιο L1	291
HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	Γονίδιο L1	291
HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	Γονίδιο L1	233
HPV45 L1R	CCACGACCAATTCATACC	Γονίδιο L1	233
HPV66 L1F	CGCCGTAAACGTATTCCCTA	Γονίδιο L1	168
HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	Γονίδιο L1	168
B.ACTINF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	Γονίδιο B.ACTIN	498
B.ACTINR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	Γονίδιο B.ACTIN	498

### 3. Αποτελέσματα

Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 ταυτοποιήθηκε και στις 46 ασθενείς, ενώ η κατανομή του συγκρίθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία  $\chi^2$ .

Μεταξύ των δυσπλασιών χαμηλού και υψηλού βαθμού δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις γονοτυπικές κατανομές και στις αλληλομορφικές συχνότητες του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53. Οι συχνότητες των γονότυπων της πρωτεΐνης TP53 μεταξύ των 14 υγείων ήταν 28,6% Arg/Arg, 50,0% Arg/Pro, 21,4% Pro/Pro και οι συχνότητες των αλληλομόρφων Arg και Pro ήταν 0,54 και 0,46 αντίστοιχα. Οι συχνότητες των γονότυπων της πρωτεΐνης TP53 μεταξύ των 23 ασθενών με δυσπλασία χαμηλού βαθμού ήταν 34,8% Arg/Arg, 47,8% Arg/Pro, 17,4% Pro/Pro και οι συχνότητες των αλληλομόρφων Arg και Pro ήταν 0,59 και 0,41 αντίστοιχα. Οι συχνότητες των γονότυπων της πρωτεΐνης TP53 μεταξύ των 23 ασθενών με δυσπλασία υψηλού βαθμού ήταν 43,5% Arg/Arg, 34,8% Arg/Pro, 21,7% Pro/Pro και οι συχνότητες των αλληλομόρφων Arg και Pro ήταν 0,61 και 0,39 αντίστοιχα.

**Πίνακας 3: Η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, ο πολυμορφισμός Arg72Pro, ο διπλασιασμός 1374<sup>Δ</sup>63nt και η κλινική εικόνα της ασθενούς.**

Κλινικό δείγμα	Πολυμορφισμός Arg72Pro	Διπλασιασμός 1374 <sup>Δ</sup> 63nt	Κλινική εικόνα
S 513-15	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 528-15	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 537-15	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 555-15	Arg/Arg	-	Φυσιολογικό
S 558-15	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 1026-14	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 1100-14	Arg/Arg	-	Φυσιολογικό
S 1229-14	Pro/Pro	-	Φυσιολογικό
S 1941-14	Pro/Pro	-	Φυσιολογικό



S 1958-14	Arg/Arg	-	Φυσιολογικό
S 2061-14	Pro/Pro	-	Φυσιολογικό
S 2087-14	Arg/Arg	-	Φυσιολογικό
S 2193-14	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 2418-14	Arg/Pro	-	Φυσιολογικό
S 105-15	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 159-15	Arg/Pro	+	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 212-15	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 357-15	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 900-14	Pro/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 912-14	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 1089-14	Arg/Arg	+	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 1759-14	Arg/Arg	+	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2085-14	Arg/Pro	+	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2095-14	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 2192-14	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3515	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3539	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3571	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3592	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού

			δυσπλασία
3603	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3611	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3623	Pro/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3629	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3674	Pro/Pro	+	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3677	Arg/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3807	Arg/Arg	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
3841	Pro/Pro	-	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
S 153-15	Arg/Pro	+	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 158-15	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 162-15	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 166-15	Pro/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 449-15	Pro/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 500-15	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 532-15	Pro/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 626-14	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 889-14	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία

S 1083-14	Pro/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 1099-14	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 1411-14	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2063-14	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2417-14	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2420-14	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
S 2541-14	Arg/Pro	+	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3500	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3570	Arg/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3578	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3591	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3624	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3670	Arg/Arg	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία
3676	Pro/Pro	-	Υψηλού βαθμού δυσπλασία

Οι ομοζυγώτες Arg/Arg εμφάνισαν δύο ζώνες 134 bp και 175 bp, οι ετεροζυγώτες Arg/Pro εμφάνισαν τρεις ζώνες 134 bp, 175 bp και 309 bp και οι ομοζυγώτες Pro/Pro εμφάνισαν μονάχα μία ζώνη 309 bp.

**Εικόνα 1: Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR ενίσχυσης του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53.**

Οριζόντια γραμμή: 309 bp

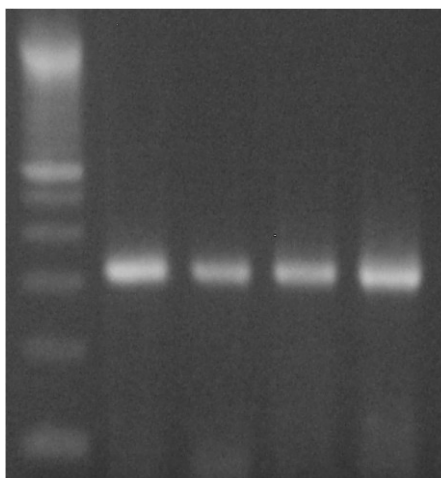
Κατακόρυφη στήλη 1: Δείκτης DNA

Κατακόρυφη στήλη 2: Ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 3: Ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 4: Ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 5: Ζώνη 309 bp



Εικόνα 2: Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού.

Οριζόντιες γραμμές: 134 bp, 175 bp, 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 1: Δείκτης DNA

Κατακόρυφη στήλη 2: Ζώνη 309 bp

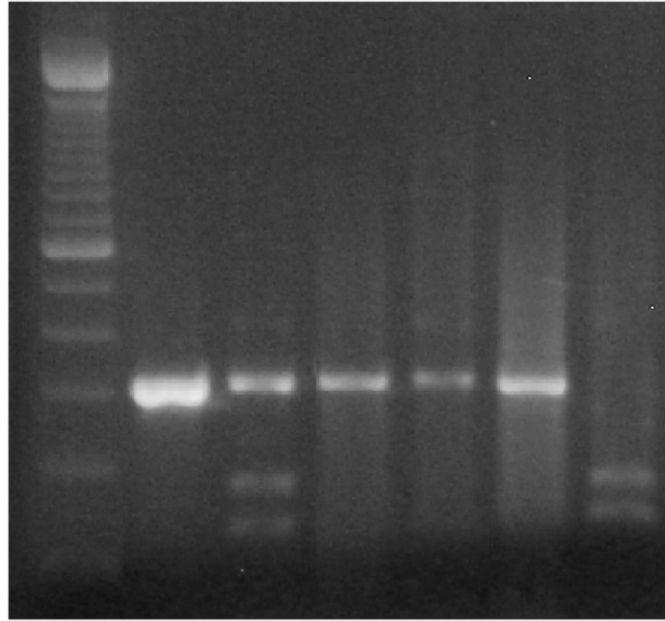
Κατακόρυφη στήλη 3: Arg/Pro: Τρεις ζώνες 309 bp, 175 bp, 134 bp

Κατακόρυφη στήλη 4: Ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 5: Pro/Pro: Μία ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 6: Ζώνη 309 bp

Κατακόρυφη στήλη 7: Arg/Arg: Δύο ζώνες 175 bp, 134 bp



**Εικόνα 3: Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR ενίσχυσης του γονιδίου E1.**

Οριζόντιες γραμμές: 645 bp, 708 bp

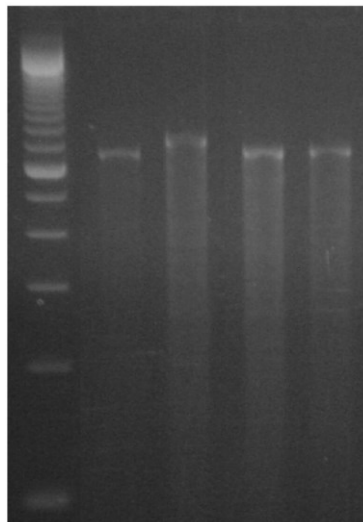
Κατακόρυφη στήλη 1: Δείκτης DNA

Κατακόρυφη στήλη 2: Ζώνη 645 bp

Κατακόρυφη στήλη 3: Ζώνη 708 bp

Κατακόρυφη στήλη 4: Ζώνη 645 bp

Κατακόρυφη στήλη 5: Ζώνη 645 bp



**Πίνακας 4: Οι γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 σε υγιείς και ασθενείς με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας.**

	Σύνολο	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Αλληλόμορφο	
					Arg	Pro
<b>Φυσιολογικό</b>	14	4 (28,6%)	7 (50,0%)	3 (21,4%)	0,54	0,46
<b>Χαμηλού βαθμού δυσπλασία</b>	23	8 (34,8%)	11 (47,8%)	4 (17,4%)	0,59	0,41
<b>Υψηλού βαθμού δυσπλασία</b>	23	10 (43,5%)	8 (34,8%)	5 (21,7%)	0,61	0,39
<b>Σύνολο</b>	60	22	26	12		

	Σύνολο	Arg/Arg	Pro/Pro	Arg/Pro
<b>Φυσιολογικό</b>	14	7	7	7
<b>Χαμηλού βαθμού δυσπλασία</b>	23	12	11	11
<b>Υψηλού βαθμού δυσπλασία</b>	23	15	8	8
<b>Σύνολο</b>	60	34	26	26

Φυσιολογικό, Χαμηλού βαθμού δυσπλασία

Η τιμή P με τη δοκιμασία Fisher ισούται με 1,0000, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  με διόρθωση Yates ισούται με 0,016 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,8979, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  χωρίς διόρθωση Yates ισούται με 0,016 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,8979, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Φυσιολογικό, Υψηλού βαθμού δυσπλασία

Η τιμή P με τη δοκιμασία Fisher ισούται με 0,4933, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  με διόρθωση Yates ισούται με 0,324 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,5693, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  χωρίς διόρθωση Yates ισούται με 0,836 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,3605, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

#### Χαμηλού βαθμού δυσπλασία, Υψηλού βαθμού δυσπλασία

Η τιμή P με τη δοκιμασία Fisher ισούται με 0,5499, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  με διόρθωση Yates ισούται με 0,359 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,5492, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  χωρίς διόρθωση Yates ισούται με 0,807 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,3690, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

#### **Πίνακας 5: Ο διπλασιασμός 1374<sup>63nt</sup> του γονιδίου E1 σε ασθενείς με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας.**

	Σύνολο	1374	1374 <sup>63nt</sup>
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	23	18	5
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	23	21	2
Σύνολο	46	39	7

Η τιμή P με τη δοκιμασία Fisher ισούται με 0,4140, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  με διόρθωση Yates ισούται με 0,674 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,4117, άρα η συσχέτιση θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  χωρίς διόρθωση Yates ισούται με 1,516 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,2182, άρα η συσχέτιση θεωρείται στατιστικά σημαντική.

#### **Πίνακας 6: Η συσχέτιση του πολυμορφισμού Arg72Pro της πρωτεΐνης TP53 και του διπλασιασμού 1374<sup>63nt</sup> του γονιδίου E1.**

	Σύνολο	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
1374	39	16	15	8

<b>1374^63nt</b>	7	2	4	1
<b>Σύνολο</b>	46	18	19	9

	<b>Σύνολο</b>	<b>Arg/Arg Pro/Pro</b>	<b>Arg/Pro</b>
<b>1374</b>	39	24	15
<b>1374^63nt</b>	7	3	4
<b>Σύνολο</b>	46	27	19

Η τιμή P με τη δοκιμασία Fisher ισούται με 0,4244, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  με διόρθωση Yates ισούται με 0,258 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,6118, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Το  $\chi^2$  χωρίς διόρθωση Yates ισούται με 0,854 με 1 βαθμό ελευθερίας και η τιμή P ισούται με 0,3553, άρα η συσχέτιση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.



## 4. Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε η σύνδεση ανάμεσα σε μία πολυμορφική θέση στην πλούσια σε προλίνη περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου της πρωτεΐνης TP53 και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στην Ελλάδα. Η TP53 αποτελεί μία βασική πρωτεΐνη στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο της πρωτεΐνης TP53, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p13, κωδικοποιεί για μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA, που ρυθμίζει τη μεταγραφή πλήθους γονιδίων. Η λειτουργική απενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης TP53 μέσω γενετικών και επιγενετικών γεγονότων, που επηρεάζουν το ίδιο το γονίδιο της πρωτεΐνης TP53 και/ή τους παράγοντες κινδύνου με τους οποίους αλληλεπιδρά, σχετίζεται με υψηλή συχνότητα καρκίνου.

Είναι πλέον γνωστό, πως ένας τύπος του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης TP53, που εντοπίζεται στο γενικό πληθυσμό, οδηγεί σε υποκατάσταση είτε Arg είτε Pro στο αμινοξύ 72 προκαλώντας μία σημαντική αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης TP53 (**Matlashewski et al., 1987**), ενώ καθολικά οι πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης TP53 συσχετίζονται συχνά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ποικίλων μορφών καρκίνου. Τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης κατέληξαν σε μια γονοτυπική κατανομή στο κωδικόνιο 72 παραπλήσια με αυτή των φυσιολογικών δειγμάτων, χωρίς την ύπαρξη κάποιας σύνδεσης μεταξύ του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αν και σε γενικό πλαίσιο η συσχέτιση αυτών των παραμέτρων διαφέρει μεταξύ των εθνοτήτων, υποδεικνύοντας την επιρροή του φαινομένου από τη φυσική επιλογή (**Beckman, Birgander, Sjalander et al., 1994**). Παρότι λοιπόν, η TP53 αποτελεί πρωτεΐνη κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου, τα δεδομένα της μελέτης δεν υποστηρίζουν καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Η σύνδεση του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου σε άλλες μελέτες, πιθανόν οφείλεται στις διαφορές των αλληλομορφικών συχνοτήτων μεταξύ των εθνοτήτων, στη γενετική ετερογένεια της παθογένεσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς και στους διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Εύλογη εξήγηση των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων, πέραν των εθνικών και γεωγραφικών παραλλαγών, αποτελεί η ατελής ταξινόμηση των αλληλομόρφων στα δείγματα ως επακόλουθο των ξεχωριστών επιδόσεων των εργαστηρίων, η διαφορετικότητα ως προς τον καθορισμό του πληθυσμού ελέγχου ή τη συλλογή των δειγμάτων, οι διαφορές επιβεβαίωσης της HPV κατάστασης των γυναικών και οι στατιστικοί περιορισμοί που αφορούν το μη ικανό συχνά αριθμό εξετασθέντων ατόμων, οδηγώντας στην υπερεκτίμηση της

δυνατότητας ανίχνευσης σχέσης μεταξύ του πολυμορφισμού και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (**Makni, Franco, Kaiano et al., 2000**).

Είναι πλέον γενική συμφωνία πως η καρκινογένεση στον τράχηλο της μήτρας είναι μία HPV εξαρτώμενη διαδικασία (**Bosch, Munoz, De Sanjose et al., 1994**). Κατά συνέπεια, οι προκαρκινικές ή καρκινικές αλλοιώσεις του τραχηλικού επιθηλίου πρέπει να θεωρούνται απόρροια της λοίμωξης από τον ιό HPV, κυρίως όταν εμπλέκονται τα λεγόμενα ογκογόνα στελέχη του ιού (**Bosch, Manos, Munoz et al., 1995**). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης E6 και της πρωτεΐνης TP53 θεωρείται το σημαντικότερο γεγονός στην HPV σχετιζόμενη καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, κάποιες *in vitro* μελέτες κατέδειξαν πως η πρωτεΐνη E6 εμφανίζει υψηλότερη τάση σύνδεσης και αλληλεπίδραση πιο αποτελεσματικά με τη γενετική παραλλαγή αργινίνη (Arg) στη θέση 72 και άρα θεωρείται επιρρεπής στην αποδόμηση μέσω της οδού ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος. Μία κοινή λοιπόν παραλλαγή της πρωτεΐνης TP53 στη θέση 72, οδήγησε στην ανάπτυξη καθοριστικών μελετών, ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Μία καλά σχεδιασμένη μελέτη για τον πολυμορφισμό της πρωτεΐνης TP53 σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας σχετιζόμενους με τον ιό HPV ανέδειξε την αξιοπρόσεκτη παρουσία της ομόζυγης Arg στο κωδικόνιο 72 σε ασθενείς με καρκίνο, συγκρινόμενους με υγιή πληθυσμό. Οι ερευνητές πρότειναν ότι ομόζυγα άτομα Arg/Arg στο κωδικόνιο 72 είναι επτά φορές πιο επιδεκτικά σε καρκινογένεση σχετιζόμενη με τον ιό HPV, από ότι οι ετεροζυγώτες (**Storey, Thomas, Kalita et al., 1998**).

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μία ανασκόπηση όλων των δημοσιευμένων αναφορών ευρωπαϊκών πληθυσμών, ώστε να εκτιμηθεί ο συνολικός κίνδυνος αυτού του πολυμορφισμού, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της γεωγραφικής θέσης και της εθνότητας ως ένα σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό του γενετικού προφίλ (**Sousa, Santos, Pinto, Medeiros et al., 2007**). Ωστόσο, ελάχιστες μονάχα αναφορές επιβεβαίωσαν τα δεδομένα και αποκάλυψαν μία συσχέτιση ανάμεσα στην παραλλαγή αργινίνη και στην ευπάθεια E6 μεσολαβούμενης αποικοδόμησης, επισημαίνοντας πως δεν υφίσταται σύνδεση μεταξύ του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης TP53 και της ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο πολυμορφισμός δεν αντιπροσωπεύει δείκτη κινδύνου για την ανάπτυξη τραχηλικών αλλοιώσεων στην πλειονότητα των ευρωπαϊκών χωρών, ενώ εμφανίζεται ποικιλοτρόπως κατανεμημένος σε διαφορετικές εθνότητες ή γεωγραφικές περιοχές. Ως εκ τούτου, παρουσιάστηκε μία προέκταση αυτής της γενετικής παραλλαγής συνδεδεμένη φυσικά με ένα καθορισμένο γενετικό υπόβαθρο, η οποία εξήγησε τις προτάσεις των μελετών για αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σχετιζόμενου με την παραλλαγή αργινίνη της πρωτεΐνης TP53. Ωστόσο, σε χώρες με χαμηλά ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός θα μπορούσε ίσως να αποτελέσει ένα γενετικό δείκτη (**Sousa, Santos, Pinto, Medeiros et al., 2011**), ή και να υποδείξει ένα ανεξάρτητο προφίλ πρώιμου screening σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν την ύπαρξη μίας αρνητικής σχέσης μεταξύ της ομοζυγωτίας p53Arg και μίας μη υπολογίσιμης διαφοράς στη συχνότητα του πολυμορφισμού του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης TP53 ανάμεσα στις υγιείς και τις ασθενείς με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασία. Μη στατιστικά σημαντική κρίθηκε και η συσχέτιση του δεδομένου πολυμορφισμού με το διπλασιασμό 1374<sup>63</sup>nt του γονιδίου E1. Παρόλα αυτά, απαιτείται μελλοντικά η πραγματοποίηση περαιτέρω πολυκεντρικών, μοριακών, επιδημιολογικών μελετών, βασιζόμενων κυρίως σε ευρείες πληθυσμιακές ομάδες, ώστε να καθοριστεί εάν οι παραλλαγές των αλληλομόρφων αποτελούν ουσιαστικό εργαλείο προληπτικού ελέγχου γυναικών με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης τραχηλικής νεοπλασίας και τελικά να προσδιοριστεί πλήρως η σχέση μεταξύ του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης TP53 και της λοίμωξης HPV 16.

## 5. Αναφορές

Agorastos T, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Kotsis A, Bontis JN. 2000. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.

Burroni E, Bisanzi S, Sani C, Puliti D, Carozzi F. 2013. Codon 72 Polymorphism of p53 and HPV Type 16 E6 Variants as Risk Factors for Patients With Squamous Epithelial Lesion of the Uterine Cervix.

Busby-Earle RMC, Steel CM, Williams ARW, Cohen B, Bird CC. 1994. p53 mutations in cervical carcinogenesis low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status.

Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. 2000. Induction of apoptosis in human papillomavirus positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein.

Crook T, Wrede D, Vousden KH. 1991. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines.

Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human papillomavirus negative tumors.

Denk C, Butz K, Schneider A, Durst M, Hoppe-Seyler F. 2001. p53 mutations are rare events in recurrent cervical cancer.

Dokianakis D.N. and Spandidos D.A. 2000. p53 Codon 72 Polymorphism as a Risk Factor in the Development of HPV Associated Cervical Cancer.

Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Iwamoto S, Enomoto T. 1992. Alterations of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection.

Harrington EA, Fanidi A and Evan GI. 1994. Oncogenes and cell death.

Harris CC. 1993. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment.

Helland A, Holm R, Kristensen G, Kaern J, Karlsen F, Trope C, Nesland JM, Borresen AL. 1993. Genetic alterations of the TP53 gene, p53 protein expression and HPV infection in primary cervical carcinomas.

Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. 1998. p53 polymorphism and risk of cervical cancer.

Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M. 1998. p53 polymorphism and risk of cervical cancer.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18.

Iwasaka T, Oh-uchida M, Matsuo N, Yokoyama M, Fukuda K, Hara K, Fukuyama K, Hori K, Sugimori H. 1993. Correlation between HPV positivity and state of the p53 gene in cervical carcinoma cell lines.

Jones CJ, Brinton LA, Hamman RF, Stolley PD, Lehman HF, Levine RS, Mallin K. 1990. Risk factors for in situ cervical cancer: results from a case control study.

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Quarforth-Tubbin P, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB. 1998. p53 polymorphism and risk of cervical cancer.

Kim HJ, Song ES, Hwang TS. 2001. Higher incidence of p53 mutation in cervical carcinomas with intermediate risk HPV infection.

Kim JW, Cho YH, Lee CG, Kim JH, Kim HK, Kim EJ, Han KT, Namkoong, SE. 1997. Human papillomavirus infection and TP53 gene mutation in primary cervical carcinoma.

Ko LJ and Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm.

Lanham S, Campbell I, Watt P, Gornall R. 1998. p53 polymorphism and risk of cervical cancer.

Lechner MS, Laimins LA. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins.

Li X, Coffino P. 1996. High risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation.

Magnusson PK, Sparen P, Gyllensten UB. 1999. Genetic link to cervical tumors.

Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski, G. 2000. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus induced cervical cancer: effect of inter laboratory variation.

Mantovani F, Banks L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression.

Marchenko NK, Zaika A and Moll UM. 2000. Death signal induced localization of p53 protein to the mitochondria.

Marin MC, Jost CA, Irwin MS, DeCaprio JA, Caput D, Kaelin WG Jr. 1998. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73.

Milde-Langosch K, Albrecht K, Joram S, Schlechte H, Giessing M, Loning T. 1995. Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva.

Moll UM, Erster S, Zaika A. 2001. p53, p63 and p73—solos, alliances and feuds among family members.

Moreno V, Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Izzarugaza I, Navarro C, Vergara A, Viladiu P, Ascunce N, Shah KV. 1995. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer.

Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S. 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case control study.

Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX. 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case control study.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainau P. 2002. IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users.

Ostor AG. 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.

Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, Miller CW, Koeffler HP. 1994. p53 mutations in HPV negative cervical carcinoma.

Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE, Um SJ. 2001. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins.

Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300.

Pisani P, Bray F, Parkin DM. 2002. Estimates of the world wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population.

Sabbatini P and McCormick F. 1999. Phosphoinositol 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53 mediated transcriptionally dependent apoptosis.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.

Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. 1993. The HPV 16 E6 and E6 AP complex functions as a ubiquitin protein ligase in the ubiquitination of p53.

Schüler M and Green DR. 2001. Mechanisms of p53 dependent apoptosis.

Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. 2007. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta analysis review within European populations.

Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. 2011. Is there a biological plausability for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development?

Stambolic V et al. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53.

Srivastava S, Tong YA, Devadas K, Zou ZQ, Chen Y, Pirollo KF, Chang EH. 1992. The status of the p53 gene in human papilloma virus positive or negative cervical carcinoma cell lines.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. 1999a. Two polymorphic variants of wildtype p53 differ biochemically and biologically.

Thomas M, Pim D, Banks L. 1999b. The role of the E6 p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV.

Tommasino M. 2001. Early genes of human papillomaviruses. Encyclopedic reference of cancer.

Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Amoutzias G, Ruether IG, Dimitriou TG, Panotopoulou E, Markoulatos P. 2013. Identification of novel E6 E7 sequence variants of human papillomavirus 16.

Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Darmis F, Ruether I.G.A, Dimitriou T.G, Orfanoudakis G, Panotopoulou E, Markoulatos P. 2014. Prevalence of HPV16 E1-1374<sup>63nt</sup> Variants in Greek Women.

Tsakogiannis D, Papadopoulou A, Kontostathi G, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Orfanoudakis G, Markoulatos P. 2013. Molecular and evolutionary analysis of HPV 16 E6 and E7 genes in Greek women.

Vogelstein B, Lane D and Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.

Wang L et al. 2001. Analysis of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches.

Yaginuma Y, Westphal H. 1991. Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines.

Zehbe I, Tommasino M. 1999. The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M. 1999. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. 2001. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300.

Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.