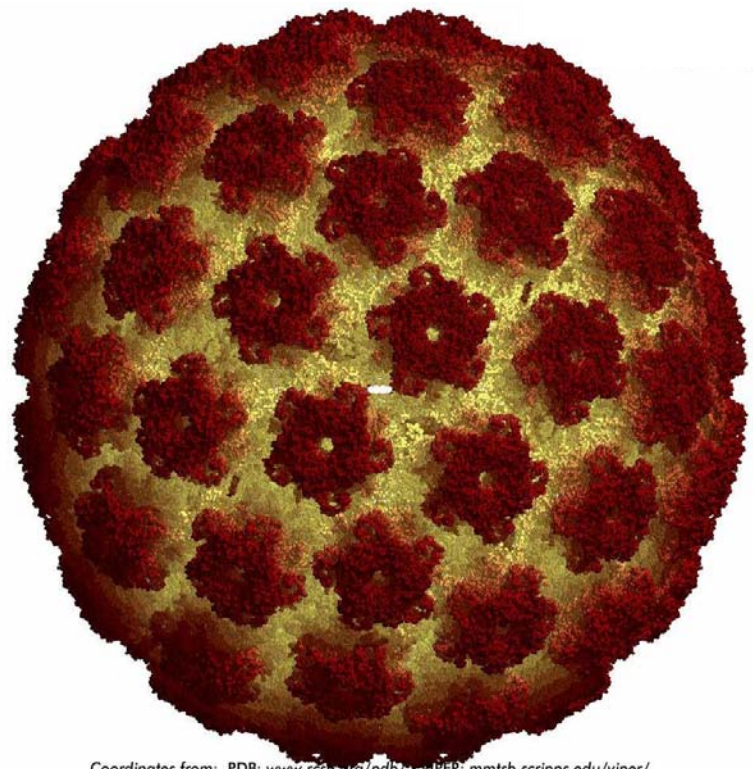


# ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ E7/E1-L1 ΚΑΙ E2-L1 ΤΩΝ ΙΩΝ HPV16 ΣΕ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΑΙ ΥΨΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ



Υπεύθυνος Καθηγητής:  
Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Coordinates from: PDB: [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/) \* VIPER: [mmtsb.scripps.edu/viper/](http://mmtsb.scripps.edu/viper/)

ΜΩΥΣΙΪΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

**«Εντοπισμός Αναδιατάξεων E7/E1-L1 και E2-L1 των ιών HPV16 σε χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες»**

**«Identification of rearranged sequences of HPV16 DNA in low and high grade neoplasias»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

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

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

**Αμούτζιας Γρηγόριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Περίληψη

---

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) είναι μια ομάδα ιών με δίκλωνο, κυκλικό DNA, χωρίς περίβλημα. Προσβάλλουν το βασικό επιθήλιο του δέρματος, και του βλενογόνου, προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων, όπως τα κοινά κονδυλώματα, νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο. Ο HPV16 είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Επίμονη λοίμωξη με τον ιό έχει συνδεθεί με την αυξημένη πιθανότητα ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή και αποτελεί κρίσιμο βήμα για την εξέλιξη προκαρκινικών τραχηλικών κακοηθειών σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV16 σε τραχηλικούς όγκους, ενώ στην καρκινική σειρά CaSki έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη αλληλουχιών που αποτελούσαν συνδυασμό τμημάτων μη γειτονικών γονιδίων του HPV16.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση αναδιατάξεων στην αλληλουχία του HPV16 σε τραχηλικά δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίας. Με τη μέθοδο της RS-PCR ανιχνεύθηκαν αναδιαταγμένες αλληλουχίες σε 4 από τα εξετασθέντα δείγματα. Οι αλληλουχίες αυτές περιλάμβαναν τη σύνδεση τμημάτων ιικού DNA μη γειτονικών γονιδίων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αναδιάταξεις μεταξύ των γονιδίων E1 και L1.

Συμπερασματικά, η ανίχνευση αναδιατάξεων του HPV16 σε κλινικά δείγματα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την παρουσία βλαβών του χρωμοσωμικού DNA και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο για την εξέλιξη τραχηλικών κακοηθειών.

## ***Abstract***

---

Human Papillomaviruses (HPVs) are small, non-enveloped, double stranded, circular DNA viruses. They infect cutaneous and mucosal epithelia and cause a diverse range of epithelial lesions, such as common warts, cervical neoplasia and cancer. HPV16 is responsible for approximately 50% of all cervical cancers. Persistent HPV-16 infection is associated with an increasing risk of integration of viral episomes into the host chromosome and is a crucial event for the progression of precancerous cervical malignancies to cervical cancer development.

Rearranged intra-viral sequences of HPV16 DNA have been previously reported in cervical tumors, while non contiguous HPV 16 viral junctions with inverted orientation were recently described in the CaSki cancer cell line.

Aim of the present study was the identification of HPV16 rearranged intra-viral sequences in HPV16-positive low-grade and high-grade cervical neoplasia. Using the method of Restriction Site-PCR (RS-PCR) we found rearrangements in four of our samples. These rearrangements consisted of non contiguous HPV 16 viral junctions with inverted orientation. Specifically, rearrangement occurred between the E1 and L1 genes.

In conclusion, the detection of HPV16 rearrangements in clinical samples offers valuable information about the presence of chromosomal damages and could be used as a prognostic tool for the progression of cervical malignancy.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>6</b>
1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	6
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ PAPILOMA ΙΩΝ .....	7
1.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPVs).....	9
1.3.1 Δομή του Καψιδίου .....	9
1.3.2 Οργάνωση του Γονιδιώματος.....	10
1.3.3 Η μορφή του γονιδιώματος των HPV .....	16
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ.....	17
1.4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο .....	17
1.4.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	18
1.4.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	19
1.4.4 Σύνθεση ιικών καψιδίων και απελευθέρωση του ιού .....	20
1.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	20
1.6 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ, HPV16 .....	21
1.7 ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΣΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΟΥ HPV16 .....	21
1.8 ΣΚΟΠΟΣ .....	22
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>23</b>
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	23
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	24
2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	25
2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ HPV16 ΕΝΔΟ-ΙΙΚΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ .....	26
2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ .....	28
2.5.1 Απομόνωση προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης .....	28
2.5.2 Κλωνοποίηση με το StrataClone PCR Cloning Kit.....	29
2.5.3 Καθαρισμός πλασμιδίων.....	30
2.6 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ .....	32
2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	33
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>34</b>
3.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	34
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	36
3.3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗΣ .....	38
3.4 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ .....	39
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>41</b>
<b>5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>43</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>44</b>

---

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές πληροφορίες

Οι ιοί των θηλωμάτων (Papillomaviruses, PVs) είναι μια ομάδα DNA ιών χωρίς περίβλημα. Το γονιδίωμά τους είναι κυκλικό, μεγέθους περίπου 8kb και συγκροτούν την οικογένεια των Papillomaviridae (de Villiers et al., 2004). Προσβάλλουν το βασικό επιθήλιο τόσο των ανθρώπων (δέρμα, βλενογόνο), όσο και άλλων σπονδυλωτών, όπου προκαλούν καλοήθεις βλάβες του δέρματος (μυρμηγκιές) και των βλεννογόνων (κονδυλώματα). Στον άνθρωπο, μερικοί PVs έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη επιθηλιακών κακοηθειών και ιδιαίτερα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Howley PM, Lowy DR, 2007). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV) εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV) (Van Doorslaer 2013, de Villiers, 2013).

Τα κονδυλώματα ήταν γνωστά από την αρχαία Ελλάδα και Ρώμη και η μολυσματική τους φύση είχε αναγνωριστεί, ωστόσο τα γενετικά κονδυλώματα θεωρούνταν πως ήταν μια μορφή σύφιλης ή γονόρροιας. Η ιική φύση τους ανακαλύφθηκε στις αρχές του εικοστού αιώνα, όταν οι ερευνητές παρατήρησαν πως τα κονδυλώματα ήταν μεταδιδόμενα. Ο πρώτος ζωικός Papilloma ιός που εντοπίστηκε από τον Richard Shope το 1930 στο κουνέλι αποτέλεσε τον πρώτο ογκογόνο DNA ιό που απομονώθηκε. Ο ιός Shope Papillomavirus είναι πλέον γνωστός ως CRPV (cottontail rabbit papillomavirus). Στα επόμενα χρόνια οι PVs δεν μελετήθηκαν ιδιαίτερα, μέχρι τη δεκαετία του '70 όταν η έλευση της μοριακής κλωνοποίησης ήταν η αιτία έναρξης εκτενέστερης μελέτης των Papilloma ιών (Howley PM, Lowy DR, 2007). Τότε αναγνωρίστηκε και η πληθώρα των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs).

Τα πρώτα πειράματα για τη συσχέτιση μόλυνσης από HPV και του καρκίνου της μήτρας ξεκίνησαν το 1972, ενώ οι τρεις πρώτες αναφορές για την ύπαρξη HPV αλληλουχιών σε ανθρώπινους όγκους δημοσιεύτηκαν το 1982. Τα επόμενα χρόνια όλο και περισσότεροι τύποι HPV ανιχνεύθηκαν σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, μεταξύ των οποίων και οι HPV-16 και HPV-18 (zur Hausen 2009).

Είναι πλέον γνωστό πως εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, οι HPV σχετίζονται και με άλλους καρκίνους, όπως του πέους, του πρωκτού, του αιδοίου, του λάρυγγα, της γλώσσας και άλλων στοματοφαρυγγικών καρκινωμάτων, καθώς και με καρκίνο του δέρματος (zur Hausen H 2009). Ανάλογα, λοιπόν, με την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου, οι HPV χωρίζονται σε υψηλού, ενδιάμεσου, και χαμηλού κινδύνου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1** Ταξινόμηση των HPV σε ομάδες επικινδυνότητας (Bzhalava et al., 2013)

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

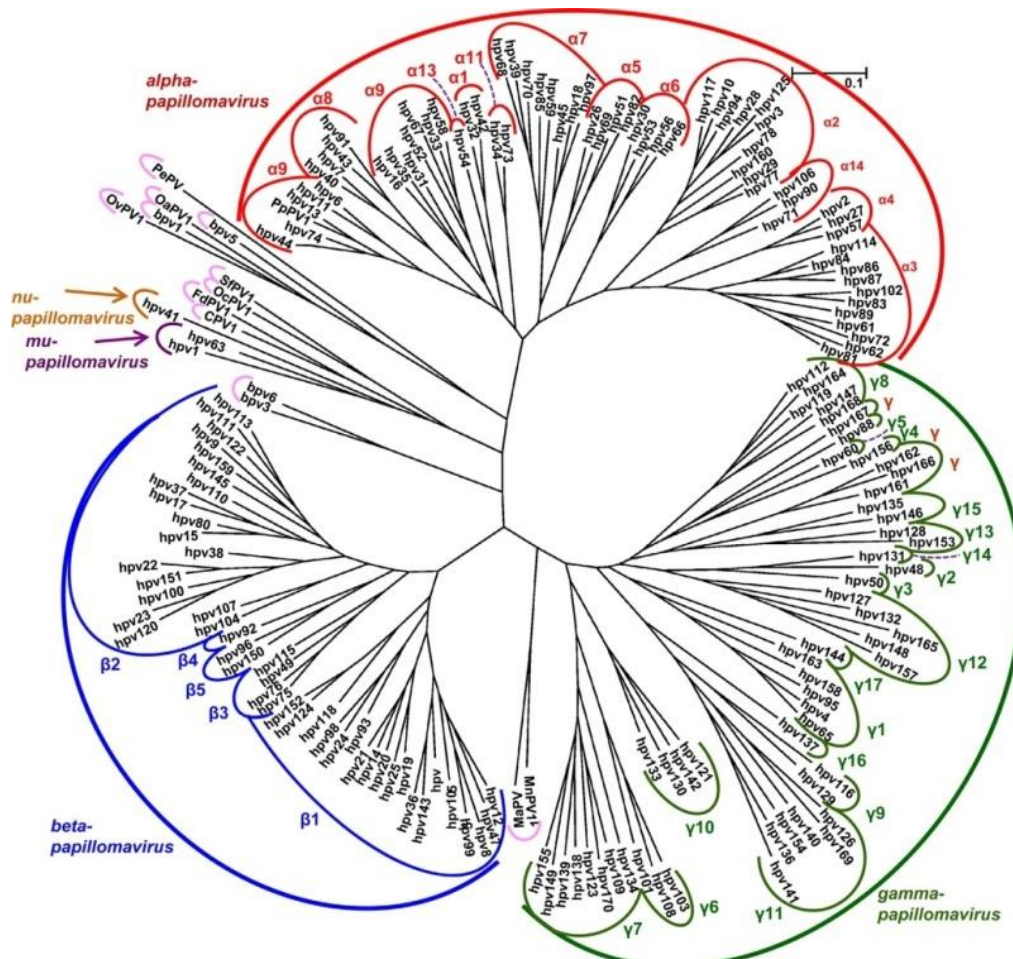
## 1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Οι Papilloma ιοί είναι μια μεγάλη και ετερογενής ομάδα ιών. Αρχικά είχαν ομαδοποιηθεί μαζί με τους polyoma ιούς σε μία οικογένεια που ονομαζόταν Papovaviridae. Αυτό συνέβει καθώς οι δύο αυτές ομάδες ιών έχουν παρόμοια, χωρίς περίβλημα καψίδια και κυκλικό γονιδίωμα δίκλωνου DNA. Αργότερα αποκαλύφθηκε πως οι δύο αυτές ομάδες ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος (οι Papilloma ιοί έχουν γονιδίωμα ~8kbp, ενώ οι Polyoma ιοί περίπου 5kbp), τα οποία παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική οργάνωση, ενώ δεν υπάρχει καμία σημαντική ομοιότητα σε νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες. Έτσι, έχουν πλέον αναγνωριστεί επίσημα από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) ως δύο ξεχωριστές οικογένειες, αυτή των *Papillomaviridae* και αυτή των *Polyomaviridae* (de Villiers et al., 2004).

Οι Papilloma ιοί αποτελούν εξαίρεση στους κλασικούς κανόνες που εφαρμόζονται για τη δημιουργία ενός συστήματος ταξινόμησης, καθώς δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε κυτταρικά υποστρώματα. Επίσης, οι ιοί αυτοί δεν μπορούν να μεταδοθούν σε πειραματόζωα (de Villiers, 2013). Έτσι, για την ταξινόμηση και την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων των Papilloma ιών χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο L1, καθώς είναι το πιο καλά διατηρημένο γονίδιο για όλους τους γνωστούς PVs. Οι ιοί διακρίνονται σε διαφορετικά γένη που ονομάστηκαν με βάση το ελληνικό αλφάβητο, όπως για παράδειγμα τα γένη Alpha, Beta, Gamma Papillomavirus. Όλα τα μέλη ενός γένους εμφανίζουν ομοιότητα 60% στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του L1 γονιδίου. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 (Εικόνα 1.1). Ένας νέος τύπος PV ορίζεται όταν η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει κατά 10% από τους είδη γνωστούς τύπους των PVs. Διαφορές 2%-10% ορίζουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορές μικρότερες από 2% ορίζουν μία παραλλαγή (Bernardet et al., 2010, de Villiers et al., 2004).

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPVs) κατανέμονται σε πέντε γένη, και συγκεκριμένα στα Alpha, Beta, Gamma, Mu και NuPapillomavirus. Το γένος Alpha αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα HPV και περιλαμβάνει τους τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου, ενώ κάποιοι, όπως ο HPV-2, προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος. Περισσότεροι από 30 τύποι HPV είναι γνωστό ότι προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου και μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Οι σχετιζόμενοι με εμφάνιση καρκίνου τύποι HPV ταξινομούνται ως υψηλού κινδύνου (highrisk). Οι πιο διαδεδομένοι είναι οι HPV-16 και HPV-18, με τον HPV-16 να είναι υπεύθυνος για περίπου 50% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Οι υπόλοιποι τύποι του γένους ταξινομούνται ως ενδιάμεσου (middlerisk) ή χαμηλού κινδύνου (lowrisk), ανάλογα με τη συχνότητα που ανευρίσκονται σε καρκίνους. Οι χαμηλού κινδύνου HPV ενώ σχετίζονται σπάνια με καρκίνο προκαλούν θηλώματα στο ουρογεννητικό σύστημα, μια σημαντική σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια (Doorbar, 2006).





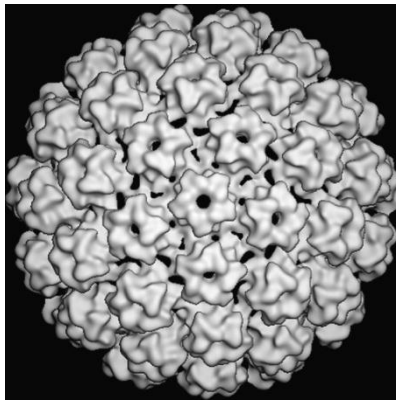
**Εικόνα 1.1** Η φυλογενετική ανάλυση των PVs με βάση τις αλληλουχίες L1 ORF 170 τύπων HPV, καθώς και μεμονωμένων ζωικών PVs. Το δέντρο κατασκευάστηκε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 5.1 (deVilliers, 2013)

Οι υπόλοιποι HPVs, που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος ανήκουν στα γένη Beta, Gamma, Mu και Nu. Οι Beta PVs συνήθως σχετίζονται με αφανείς μολύνσεις του δερματικού επιθηλίου στον άνθρωπο. Ωστόσο, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και σε ασθενείς που πάσχουν από επιδερμική δυσπλασία (EV) μπορούν να εξαπλωθούν ανεξέλεγκτα και να προκαλέσουν την ανάπτυξη μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος. Τέλος, οι Gamma, Mu και Nu Papillomaviruses προκαλούν δερματικά θηλώματα και τις μυρμηγκιές των ποδιών που δεν εξελίσσονται σε καρκίνο (Doorbar, 2006).

## 1.3 Δομή των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων(HPVs)

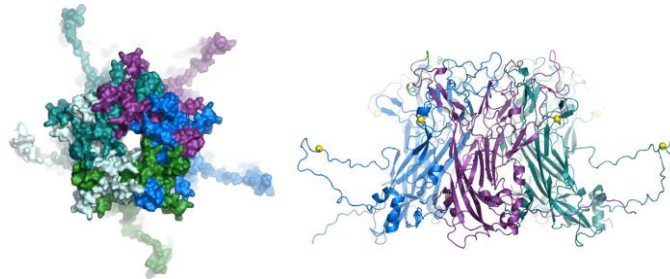
### 1.3.1 Δομή του Καψιδίου

Οι ανθρωπίνου Papilloma ιοί είναι μια ομάδα DNA ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα, διαμέτρου 50-60 nm, οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Το γονιδίωμα τους συνδέεται με ιστόνες και πακετάρεται σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2. Η εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου αποτελείται από 72 καψομερή που σχηματίζουν T=7 (triangulation number) εικοσαεδρικά καψίδια και κάθε καψομερές περιλαμβάνει πέντε μόρια της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης L1 που συνδέονται με ένα μόριο της L2 (Baker T.S et al., 1991).



**Εικόνα 1.2** Ανακατασκευή ενός ψευδο-ισοσωματίου του HPV16 μέσω Cryo-EM. Όπως φαίνεται, τα καψομερή(στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου) έχουν αστεροειδή μορφή (Bucket al., 2013)

Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη L1 με μοριακό βάρος ~50kDa σχηματίζει ολόκληρη την εξωτερική επιφάνεια του σταθεροποιημένου ώριμου ιού, και συνεπώς μεσολαβεί και στην αρχική προσκόλληση του ιού στους ιστούς ή τα κύτταρα ξενιστές. Τα N- και C-τελικά άκρα της L1 είναι τοποθετημένα ως προεξέχουσες θηλιές, οι οποίες σχηματίζουν τον χώρο μεταξύ των πενταμερών (Εικόνα 1.3.). Ένας δισουλφιδικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ των L1 των γειτονικών καψομερών, προσδίδοντας σταθερότητα στο καψίδιο.



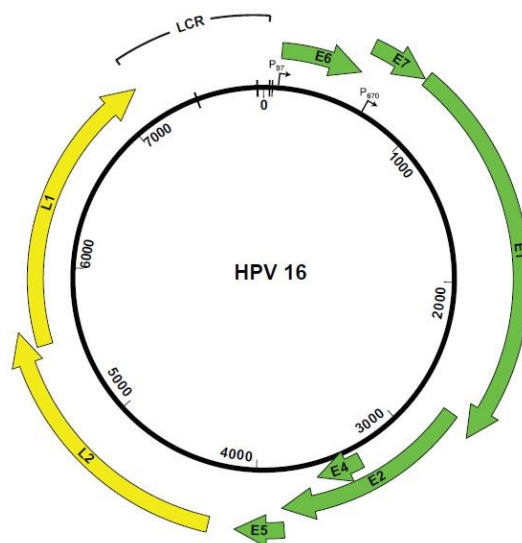
**Εικόνα 1.3** Δομή ενός L1 καψομερούς. Κάθε μία από τις πέντε αλυσίδες L1 έχει χρωματιστεί διαφορετικά. Αριστερά φαίνεται ένα L1 πενταμερές από την κορυφή, όπου διακρίνονται οι αλληλοεμπλεκόμενες θηλιές. Δεξιά παρουσιάζεται μια πλάγια όψη του καψομερούς, με τους δισουλφιδικούς δεσμούς να απεικονίζονται ως κίτρινες σφαίρες (Bucket al., 2013)

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 έχει μοριακό βάρος ~55 kDa και κρύβεται κάτω από την επιφάνεια του καψιδίου. Στο C-τελικό άκρο της L2 υπάρχει μία θέση πρόσδεσης με την L1, η οποία επιτρέπει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση αυτή φάνηκε να είναι υδροφοβικής φύσης. Η L2 συμμετέχει σε διάφορες και σημαντικές διεργασίες, όπως η είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή και η μετακίνηση των ιικών σωματιδίων στα κατάλληλα κυτταρικά όργανα. Η βασικότερη, όμως, λειτουργία της L2 είναι η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες L1 και E2 κατά το σχηματισμό των ώριμων ιικών σωματιδίων (Wang et al., 2013).

### 1.3.2 Οργάνωση του Γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, το γονιδίωμα των Papilloma ιών είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA μεγέθους περίπου 8kb η οργάνωση του οποίου είναι όμοια σε όλους τους PVs. Το γονιδίωμα των PVs μπορεί να διαιρεθεί, σε τρεις κύριες περιοχές: την πρώιμη (early), την όψιμη (late) και την ρυθμιστική περιοχή(longcontrolregion, LCR) (Εικόνα 1.4).

Η πρώιμη περιοχή καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γονιδιώματος του ιού και περιλαμβάνει έξι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, πολλές φορές αναφέρονται και ως γονίδια), τα E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που μεταφράζονται σε μεμονωμένες ομώνυμες πρωτεΐνες. Η όψιμη περιοχή καταλαμβάνει σχεδόν το 40% του γονιδιώματος του ιού, βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής και περιλαμβάνει δύο ORF, το L1 και το L2 απ' τα οποία προκύπτουν οι καψιδιακές πρωτεΐνες. Η περιοχή LCR καταλαμβάνει ένα τμήμα περίπου 850 bp (10% του γονιδιώματος του HPV) και αποτελεί τη ρυθμιστική περιοχή του ιικού γονιδιώματος. Φέρει την θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλαπλές θέσεις δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων, σημαντικές για τη ρύθμιση της έκφρασης τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων γονιδίων από την RNA πολυμεράση II (Zheng et al., 2006).

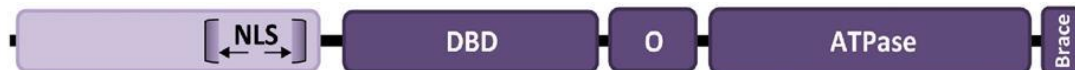


**Εικόνα 1.4** Γονιδιωματικός χάρτης του HPV-16. Με πράσινο απεικονίζονται τα πρώιμα γονίδια, ενώ με κίτρινο τα όψιμα (Fields Virology, page 1666)

### 1.3.2.1 Η πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που συνδέεται ειδικά με την θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of DNA replication, ori). Αποτελεί το μόνο ένζυμο που κωδικοποιείται από τους ραριόλομοιούς και είναι η πιο διατηρημένη πρωτεΐνη μεταξύ των ιών αυτών. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης καθρεφτίζει τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η E1 κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού (Howley PM & Lowy DR 2007, Bergvall et al., 2013).

Η E1 έχει μέγεθος από 600 έως 650 αμινοξέα, ανάλογα με τον τύπο HPV από τον οποίο προέρχεται. Μπορεί να διαιρεθεί σε τρία κύρια λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.5): Σε μία N-τελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αντιγραφή του ιού, σε μία κεντρική περιοχή που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής και σε μία C-τελική ενζυμική περιοχή, ικανή να αυτοσυγκροτείται σε εξαμερή, η οποία έχει δραστικότητα ATPάσης και βοηθά στο ξετύλιγμα μικρών δίκλωνων τμημάτων DNA.



**Εικόνα 1.5** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E1 του BPV1, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Από αριστερά προς τα δεξιά αυτά είναι: το N-τελικό άκρο με τη ρυθμιστική περιοχή, η DNA-binding domain και η ATPάση (με δραστικότητα DNA ελικάσης) (Bergvall et al., 2013).

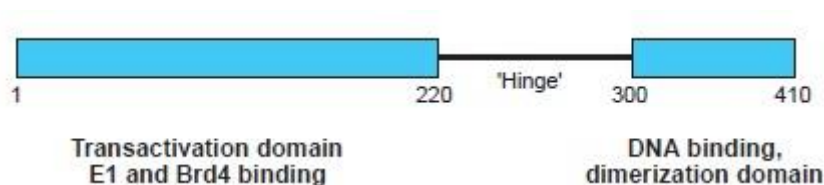
Ως ATP-εξαρτώμενη DNA ελικάση η κυριότερη λειτουργία της ιικής E1 πρωτεΐνης είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων των ιικών επισωμάτων κατά τη μόλυνση των βασικών κερατινοκυττάρων. Με άλλα λόγια, η E1 είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ιικό DNA στην επισωμική του μορφή (Bergvall et al., 2013). Για να συμβεί αυτό η E1 πρέπει πρώτα να συνδεθεί στη θέση ori του ιικού DNA. Από μόνη της, η E1 έχει χαμηλή συγγένεια με το DNA, όμως σε συνδυασμό με την E2 η σύνδεση σταθεροποιείται. Εκτός από την E2, η E1 αλληλεπιδρά και με κυτταρικές πρωτεΐνες, στρατολογώντας τον κυτταρικό μηχανισμό έναρξης της αντιγραφής στην ιική θέση έναρξης της αντιγραφής. (Howley PM & Lowy DR 2007)

### 1.3.2.2 Η πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που προσδένεται σε συγκεκριμένη θέση του ιικού DNA, εντός της LCR. Εμπλέκεται σε πολλές ιικές διεργασίες, που κυρίως συνδέονται με μεταγραφή και αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού (McBride, 2013).

Η E2 έχει μέγεθος 200 αμινοξέων και μπορεί να διαιρεθεί σε δύο λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.6): Σε μία συντηρημένη N-τελική περιοχή διενεργοποίησης (transactivation domain, TAD), η οποία εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1 και σε μία C-τελική

περιοχή, υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό DNA και τον διμερισμό της E1 (DNA-binding/dimerization domain, DBD) (Howley PM & Lowy DR 2007).



**Εικόνα 1.6** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E2 του BPV1, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Αριστερά, στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται η περιοχή TAD, ενώ δεξιά η C-τελική περιοχή που λειτουργεί ως DBD και dimerization domain (Howley PM & Lowy DR 2007).

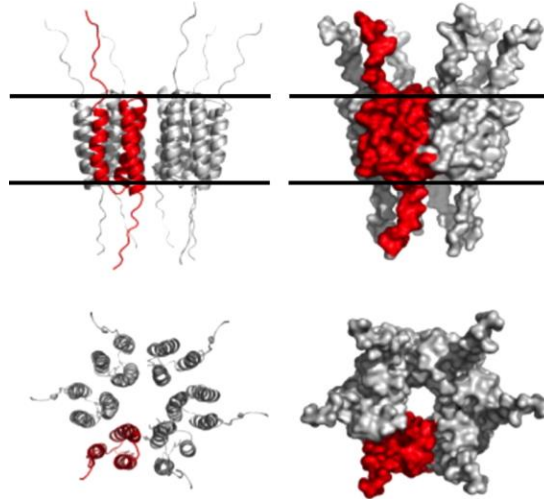
Η E2 ρυθμίζει τη μεταγραφή των PVs. Προσδένεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή της LCR και ανάλογα με τις κυτταρικές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά είτε επάγει είτε μειώνει τα επίπεδα έκφρασης κάποιων γονιδίων. Η E2 δρα και ως βοηθητικός παράγοντας στην αντιγραφή του DNA των PVs. Αλληλεπιδρώντας με την E1 διεγείρει την ικανότητα της να ξεκινήσει την αντιγραφή. Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελεί τη βάση για τη συναρμολόγηση ενός μεγαλύτερου συμπλόκου, το οποίο μετά την αφαίρεση της E2 χαλαρώνει το DNA και επιτρέπει την αντιγραφή ή τη μεταγραφή του (Howley PM, Lowy DR 2007).

#### 1.3.2.3 Η πρωτεΐνη E4

Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 1.4*, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης E4 βρίσκεται εντός του ORF της E2. Η πρωτεΐνη E4 μεταφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, του οποίου τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το γονίδιο E1. Η παραγόμενη πρωτεΐνη συνήθως αναφέρεται ως E1<sup>E4</sup> και ανιχνεύεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPV. Έχει προταθεί ότι η E4 επηρεάζει τον σκελετό των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Επίσης, πιθανολογείται ότι συμμετέχει στην αντιγραφή και την απελευθέρωση του ώριμου ιού, καθώς και στην καθήλωση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 (Doorbar, 2013).

#### 1.3.2.4 Η πρωτεΐνη E5

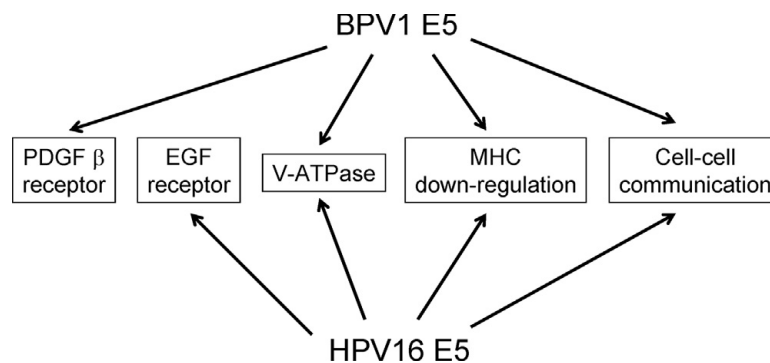
Η πρωτεΐνη E5 είναι μια μικρή μη ενζυμική διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Έχει μήκος 40-85 αμινοξέα, μεγάλο μέρος των οποίων είναι υδρόφοβα. Τα υδρόφοβα αυτά αμινοξέα συγκεντρώνονται σε μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης, επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή της με έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη περιέχει τρεις υδρόφοβες περιοχές, οι οποίες διασχίζουν την μεμβράνη και συμβάλλουν στον ολιγομερισμό της E5, οπότε η E5 σχηματίζει κανάλια ιόντων στη μεμβράνη (*Εικόνα 1.7*).



**Εικόνα 1.7** Μοντέλο ενός εξαμερούς καναλιού ιόντων που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη E5 *in vitro*. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η πλευρική όψη ενός μονομερούς της E5 με τρία διαμεμβρανικά τμήματα (κόκκινο χρώμα), ενώ στο κάτω μέρος η κάτω όψη της ίδιας αναπαράστασης. Η θέση της μεμβράνης ορίζεται με τις οριζόντιες γραμμές (DiMaio & Petti, 2013).

Η E5 πρωτεΐνη έχει ποικίλες επιπτώσεις στη συμπεριφορά των κυττάρων, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στην μεταμόρφωση/καρκινογένεση των κυττάρων και την παραγωγική φάση του κύκλου ζωής του ιού. Οι βιολογικές δραστηριότητες των πρωτεϊνών E5 πιθανώς απορρέουν από τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες (DiMaio, Petti, 2013).

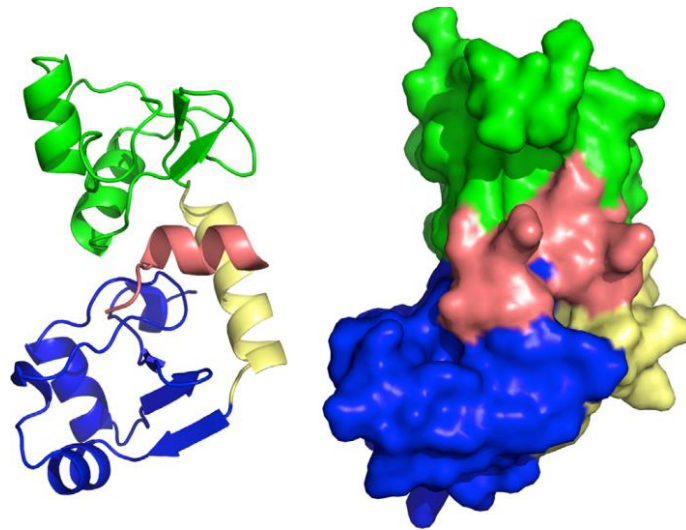
Οι αλληλεπιδράσεις αυτές θεωρούνται σημαντικές για την βιολογική δραστηριότητα της E5. Συγκεκριμένα, στον HPV16 μελέτες έδειξαν ότι η E5 ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του EGF-R (μονοπάτι MAPK) είτε συνεργαζόμενη με τον EGF, είτε ανεξάρτητα από αυτόν, επάγοντας έτσι την μιτογόνο δράση των πρώιμων κερατινοκυττάρων. Ακόμη, η E5 έχει την ικανότητά να μειώνει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (CKIs) p21 και p27, προκαλώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, και διεγείροντας έτσι τη μεταγραφή των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Η E5 εμπλέκεται και στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης αλληλεπιδρώντας άμεσα με την βαριά αλυσίδα του MHC I (Venuti et al., 2011).



**Εικόνα 1.8** Κύριοι στόχοι των BPV1 and HPV16 E5 πρωτεϊνών

### 1.3.2.5 Η πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6, μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται μετά τη μόλυνση με HPV, είναι μία σχετικά μικρή πρωτεΐνη μήκους περίπου 150 αμινοξέων. Στους υψηλού κινδύνου τύπους HPV (όπως στον HPV16) είναι ο ένας από τους δύο κύριους παράγοντες καρκινογένεσης. Στο N-τελικό, το οποίο διμερίζεται, και στο C-τελικό της άκρο η E6 έχει από μία δομική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc-binding domain). Οι δομές αυτές συνδέονται με μια έλικα και έτσι στην πρωτεΐνη σχηματίζεται μια κοιλότητα. Στην κοιλότητα αυτή υπάρχει μία θέση πρόσδεσης μοτίβων LXXLL. Μέσω αυτής της θέσης πρόσδεσης η E6 μπορεί να αλληλεπιδράσει με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (Boulet et al., 2004, Van de Pol et al., 2013).

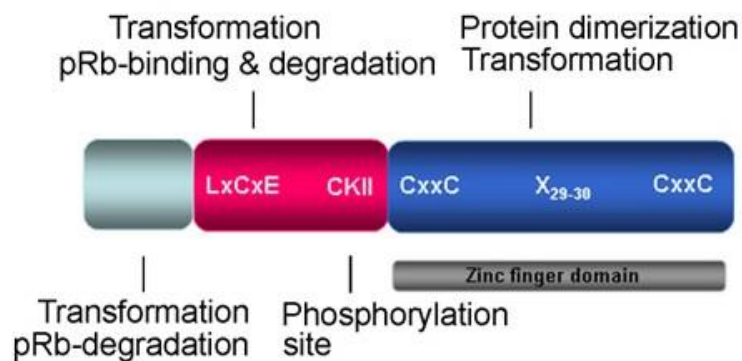


**Εικόνα 1.9** Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό και το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης φαίνονται με πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται η συνδετική αλληλουχία, ενώ με ροζ φαίνεται το πεπτιδίο LXXLL (Van de Pol and Klingelutz, 2013).

Η κύρια δράση της είναι η αναστολή της κυτταρικής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Συγκεκριμένα, μειώνει τα επίπεδα p53 στο κύτταρο επάγοντας την ουβικιτινοεξαρτώμενη αποδόμησή της. Η E6 αλληλεπιδρά με την ουβικιτινική λιγάση E6AP. Το διμερές αυτό σύμπλοκο, στη συνέχεια, στρατολογεί την p53 η οποία ουβικιτινώνεται και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Van de Pol and Klingelutz, 2013). Η E6 μπορεί να αλληλεπιδράσει και άμεσα με την p53 αναστέλλοντας την μεταγραφική της ικανότητα της. Επίσης, η E6 στοχεύει και στον συνενεργοποιητή της p53, p300/CBP παρέχοντας έναν δεύτερο μηχανισμό που μπορεί να εμποδίσει την δράση της p53. Στοχεύοντας στην p53 η E6 αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από βλάβες στο DNA ή από ογκογονίδα. Επίσης, μπορεί να παρέμβει στις ρυθμιστικές λειτουργίες της p53 στον κυτταρικό κύκλο και να προκαλέσει γενωμική αστάθεια. Μία σημαντική, ανεξάρτητη από την p53, λειτουργία της HPV16 E6, είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης στα κερατινοκύτταρα. Η συντήρηση του μήκους των τελομερών είναι απαραίτητη την αθανατοποίηση των κυττάρων και τον μετασχηματισμό (Howley PM, Lowy DR 2007).

### 1.3.2.6 Η πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη των υψηλού κινδύνου HPV. Αποτελείται από περίπου 100 κατάλοιπα αμινοξέων και όπως και η E6 παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού. Η πρωτεΐνη E7 έχει τρεις διατηρημένες περιοχές: τη N-τελική CR1 περιοχή, που είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποδόμηση της pRB, τη περιοχή CR2, που περιέχει μια συντηρημένη αλληλουχία πρόσδεσης για την pRB (LxCxE) καθώς και μια θέση φωσφωρυλίωσης καζεϊνικής κινάσης II (CKII) και την C-τελική περιοχή CR3 που περιέχει δύο μοτίβα C-x-x-C που εμπλέκονται στη σύνδεση της pRB και άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών του ξενιστή. Η C-τελική CR3 περιοχή, επιπλέον, περιέχει δομή δακτύλου ψευδαργύρου και μπορεί να λειτουργήσει και ως περιοχή διμερισμού (Boulet et al., 2007).



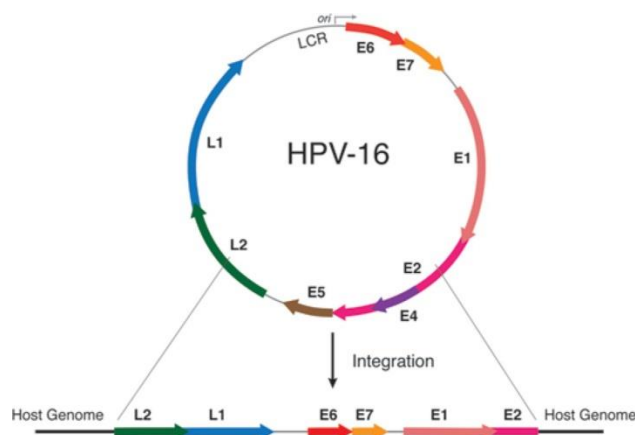
**Εικόνα 1.10** Σχηματική αναπαράσταση της ογκοπρωτεΐνης E7. Μπορεί να χωριστεί σε τρεις συντηρημένες περιοχές (CR). Την N-τελική CR1 περιοχή που απεικονίζεται με γκρι, τη CR2 περιοχή που φαίνεται με κόκκινο και τη C-τελική CR3 περιοχή που είναι μπλε (Boulet et al., 2007).

Η κύρια δράση της E7 είναι καταστολή της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRB). Στην ενεργή της μορφή η pRB είναι αποφωσφωρυλιωμένη και συνδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, αναστέλλοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Απενεργοποιείται από κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cdk) κατά τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, οπότε ο E2F απελευθερώνεται και μπορεί να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση κυτταρικού DNA και την πρόοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η E7 συνδέεται κατά προτίμηση στην αποφωσφωρυλιωμένη pRB, οπότε εμποδίζει τη σύνδεσή της με τον E2F και επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F. Επίσης, η E7 αλληλεπιδρά με αναστολείς των cdk (p21, p27) επιτρέποντας την αντιγραφή του DNA των HPV (Howley PM, Lowy DR 2007).



### 1.3.3 Η μορφή του γονιδιώματος των HPV

Το γονιδίωμα των HPVs συναντάται σε δύο μορφές. Υπό φυσιολογικές για τον ιό συνθήκες, αφού εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα του μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου διατηρεί την κυκλική του μορφή (επίσωμα) (Howley PM, Lowy DR 2007). Επίμονη λοίμωξη από υψηλού κινδύνου HPV μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση του ιικού επισώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή. Κατά την ενσωμάτωση συνήθως γίνεται ρήξη των γονιδίων E1 ή/και E2, με αποτέλεσμα το κυκλικό γονιδίωμα του ιού να μετατρέπεται σε γραμμικό DNA. Η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα του ξενιστή είναι κρίσιμη για τη μετατροπή προκαρκινικών τραχηλικών κακοηθειών σε καρκίνο (Xu et al., 2013).



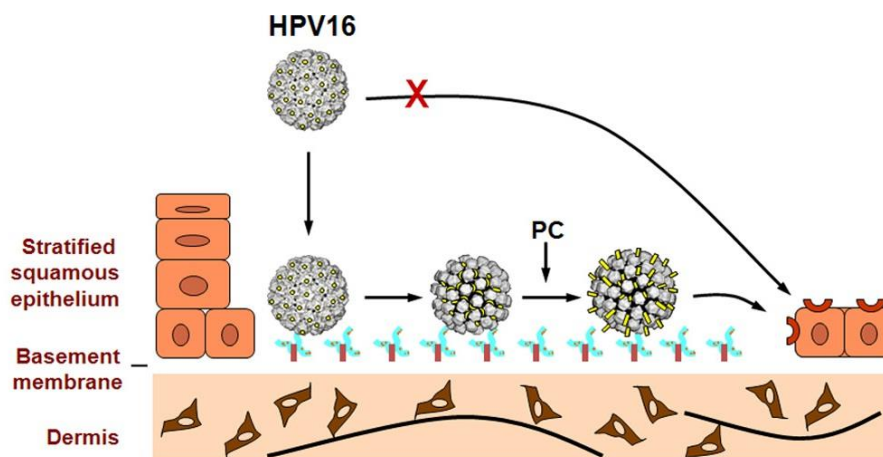
**Εικόνα 1.11** Επάνω φαίνεται το επίσωμα του HPV16, ενώ ακριβώς από κάτω φαίνεται το γραμμικό πλέον ιικό DNA ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του ξενιστή (Sathish et al., 2014)

## 1.4 Κύκλος ζωής

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα. Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Ο κύκλος ζωής των ιών ακολουθείτο πρόγραμμα διαφοροποίησης των επιθηλιακώνκυττάρων του ξενιστή. Η γονιδιακή έκφραση του ιού ρυθμίζεται αυστηρά, καθώς το μολυσμένο κύτταρο της βασικής στοιβάδας μεταναστεύει προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Στο κατώτερα στρώματα του επιθηλίου η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 οδηγεί τα κύτταρα στη φάση S, δημιουργώντας ένα περιβάλλον κατάλληλο για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ενίσχυση του ιικού DNA εξαρτάται από την παράλληλη έκφραση αρκετών ιικών πρωτεϊνών και εμποδίζεται μέχρι αυτές να φτάσουν σε κατάλληλα επίπεδα. Οι καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού εκφράζονται σε κύτταρα του ανώτερου επιθηλίου, τα οποία εκφράζουν επίσης την ιική πρωτεΐνη E4 (Doorbar 2005).

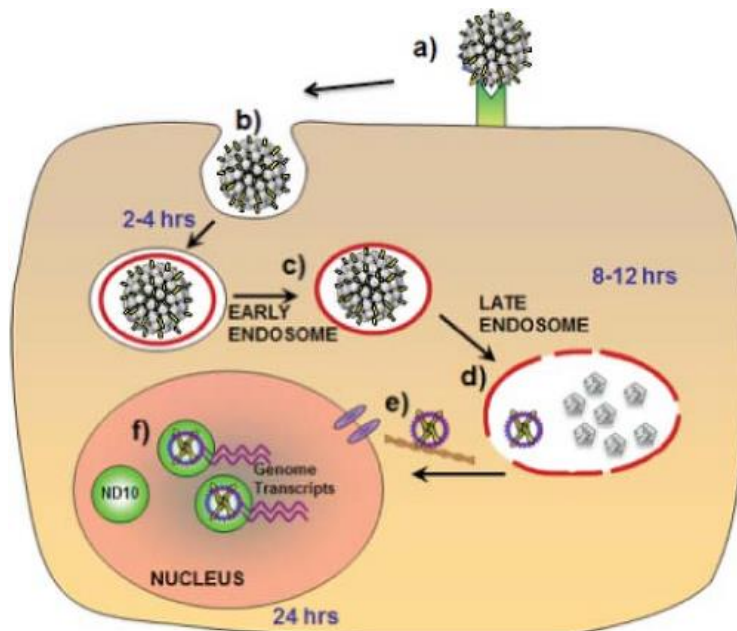
### 1.4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Για τη μόλυνση από HPV πρέπει τα ιικά σωματίδια να αποκτήσουν πρόσβαση στη βασική στοιβάδα του επιθηλίουκαι να εισχωρήσουν στα διαιρούμενα κύτταρα. Πιστεύεται ότι μικροτραυματισμοί του επιθηλίου ανοίγουν το δρόμο για την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Η είσοδος του ιού στα κύτταρα προϋποθέτει τη σύνδεσή του σε κυτταρικούς υποδοχείς. Τον ρόλο του υποδοχέα φαίνεται να αναλαμβάνει η θειική ηπαρίνη των πρωτεογλυκανών (HsPG). Όπως πολλοί άλλοι ιοί, έτσι και οιHPV χρειάζονται και έναν δεύτερο υποδοχέα για την επιτυχή σύνδεση και είσοδό τους στο κύτταρο, που στην περίπτωση τους είναι η A6 ιντεγρίνη (Doorbar, 2006). Η λαμινίνη μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως υποδοχέας των HPV (Doorbar, 2012).



**Εικόνα 1.12** Μοντέλο των γεγονότων που οδηγούν σε *in vivo* μόλυνση. Τα καψίδια δένονται στη HSPG, υφίστανται αλλαγές που οδηγούν στην επεξεργασία της L2, ένα μέρος της οποίας κόβεται και έτσι συνδέεται ο ιός και στον δεύτερο υποδοχέα (Kines et al., 2009)

Μετά την πρόσδεση του ιοσωματίου στον κυτταρικό υποδοχέα πραγματοποιούνται μορφολογικές αλλαγές στο καψίδιο του. Συγκεκριμένα, οι αλλαγές που συμβαίνουν στο καψίδιο φέρνουν στην επιφάνεια ένα μέρος της πρωτεΐνης L2. Τότε, ένα τμήμα του N-τελικού άκρου της L2καψιδιακής πρωτεΐνης κόβεται από φουρίνη, γεγονός που επάγει τη σύνδεση του καψιδίου στον δεύτερο υποδοχέα. Τελικά, τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύττωση. Στους περισσότερους HPV, όπως και στον HPV16, η ενδοκύττωση πραγματοποιείται με κυστιδία κλαθρίνης. Σε άλλους, όπως ο HPV31, η ενδοκύττωση γίνεται μέσω κυστιδίων καβεολίνης. Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το καψίδιο αποσυναρμολογείται στα ενδοσώματα ή/και λυσοσώματα και απελευθερώνεται ένα σύμπλοκο καψιδιακής πρωτεΐνης L2 και ιικού DNA. Το σύμπλοκο L2-DNA μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου και το DNA εισέρχεται σε αυτόν κατά πάσα πιθανότητα κατά τη μίτωση των κυττάρων (Schiller et al., 2010).



**Εικόνα 1.13** α) Ο ιός συνδέεται σε κυτταρικούς υποδοχείς και β) εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύττωση. γ) Το ιοσωμάτιο εισέρχεται στα ενδοσώματα, όπου δ) διαλύεται ο καψίδιο. ε) Η πρωτεΐνη L2 μαζί με το ιικό DNA ξεφεύγει από το ενδοσώμα και μεταφέρει το DNA στον πυρήνα. ς) Μετά την είσοδο του ιικού DNA στον πυρήνα ξεκινάει η μεταγραφή του (Howley PM, Lowy DR 2007).

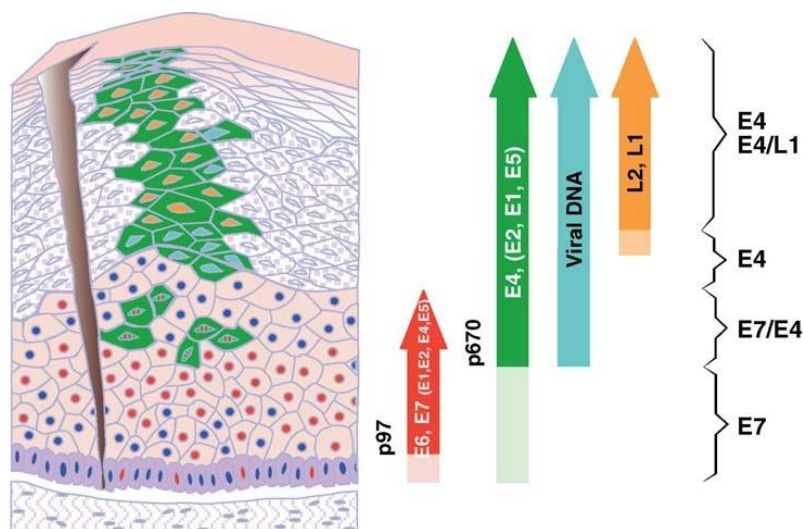
#### 1.4.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, οι HPV περνούν από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματος τους (McBride, 2008). Μία αρχική φάση αντιγραφής πραγματοποιείται αμέσως μετά την είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και ακολουθείται από τη διατήρηση του ιικού επισώματος σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων που αντιστοιχούν σε περίπου 200 ανά κύτταρο (Doorbar et al., 2006). Απαραίτητες για την αντιγραφή αυτή είναι οι δύο πρώιμες

πρωτεΐνες του HPV, η E1 και E2. Η E1, μια ATP-εξαρτώμενη ελικάση, είναι η κύρια πρωτεΐνη αντιγραφής των HPV. Ένα διμερές της E1 συνδέεται σε συνεργασία με ένα διμερές της E2 στο ιικό DNA (στη θέση έναρξης της αντιγραφής). Τότε η E2 αποδεσμεύεται και η E1 ξετυλίγει το DNA ανοίγοντας το δρόμο για τις πρωτεΐνες αντιγραφής του κυττάρου. Η επόμενη φάση της αντιγραφής συμβαίνει παράλληλα με την αντιγραφή του γονιδιώματος των κερατινοκυττάρων, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Δημιουργούνται έτσι δύο αντίγραφα του ιικού επισώματος, από τα οποία μεταβιβάζεται ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό το ικό γονιδίωμα σταθεροποιείται στο επιθήλιο. Η τρίτη και τελευταία φάση αντιγραφής στον κύκλο ζωής του HPV πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια (McBride, 2008).

### 1.4.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, τόσο η αντιγραφή του ιικού DNA, όσο και η μεταγραφή των γονιδίων των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Οι HPVs έχουν δύο κύριους υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους, τον πρώιμο και το όψιμο υποκινητή. Στον HPV16 οι δύο αυτοί υποκινητές είναι ο p97 και ο p670. Οι υποκινητές αυτοί ελέγχονται αυστηρά από τη ρυθμιστική περιοχή LCR, στην οποία συνδέονται τόσο κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όσο και ο ιικός ενεργοποιητής/καταστολέας E2 (Kajitani et al., 2012, Zheng et al., 2006).



**Εικόνα 1.6** Οργάνωση του κύκλου ζωής κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης από HPV16. Αριστερά φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση του δέρματος όπου φαίνεται το μοτίβο γονιδιακής έκφρασης του HPV καθώς το μολυσμένο κύτταρο μεταναστεύει προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Αμέσως μετά τη μόλυνση της βασικής μεμβράνης ο υποκινητής p97 κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7, που είναι απαραίτητα για την είσοδο του κυττάρου στη φάση S (κόκκινο). Σε ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες ρυθμίζεται θετικά ο υποκινητής p670 και οι ιικές πρωτεΐνες αντιγραφής (E1, E2, E4, E5) εκφράζονται σε αφθονία (πράσινο), διευκολύνοντας την ενίσχυση των ιικών γονιδιωμάτων (μπλε). Στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου όπου πλέον παράγονται οι ιικές καψιδιακές πρωτεΐνες (κίτρινο) (Doorbar 2005).

Ο πρώιμος υποκινητής p97 βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των έξι πρώιμων γονιδίων του ιού (E1, E2, E4, E5, E6, E7) στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Από την άλλη, ο όψιμος υποκινητής p670 είναι τοποθετημένος εντός του ORF της E7 και ενεργοποιείται στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων επάγει την έκφραση των γονιδίων E1 και E2, επιτρέποντας την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος. Επιπλέον, ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων του ιού (L1 και L2), η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των ισωματίων (Doorbar et al., 2012, Zheng et al., 2006).

#### **1.4.4 Σύνθεση ιικών καψιδίων και απελευθέρωση του ιού**

Το τελευταίο στάδιο στον κύκλο ζωής των HPV είναι η συναρμολόγηση και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων. Για τη συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματίων εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 είναι απαραίτητη και η πρωτεΐνη E2, η οποία πιστεύεται ότι βοηθάει στην είσοδο του ιικού γονιδιώματος στο καψίδιο.

Η πρωτεΐνη L2, που αρχίζει να εκφράζεται πριν την L1, μετά την έκφρασή της εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου σε κάποιες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA. Από την άλλη, η πρωτεΐνη L1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου σχηματίζει τα L1 πενταμερή, τα οποία αποτελούν τη βασική δομική μονάδα των HPV καψιδίων. Τα L1 πενταμερή μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί, ένα τμήμα της C-τελικής περιοχής της L2 συνδέεται με τα L1 πενταμερή μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.

Η ωρίμανση του ιού συμβαίνει στα κερατινοκύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας. Στα κύτταρα υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες για τη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των L1 πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη παραγωγή σταθερών μολυσματικών ιικών σωματίων. Εν τέλει, ο ιός απελευθερώνεται από το κύτταρο χωρίς να προκαλέσει τη λύση τους. Πιστεύεται πως στην απελευθέρωση του ιού εμπλέκεται η E4 πρωτεΐνη, η οποία είναι ικανή να διαρρήξει το δίκτυο κερατίνης που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια.

### **1.5 Κλινικά συμπτώματα**

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων παρουσιάζουν διαφορετικούς επιθηλιακούς τροπισμούς. Μπορούν να προσβάλλουν τα επιθήλια του δέρματος και του βλεννογόνου, όπου προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων, όπως τα κοινά κονδυλώματα, νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου, συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήγηθ θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμένουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλείφονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αυτοί οι τύποι HPV σπάνια έχουν σχετιστεί με νεοπλασίες ή καρκίνο στον γενικό πληθυσμό. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας,

ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου των γεννητικών οργάνων και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου του κεφαλιού και του λαιμού. Οι υψηλής επικινδυνότητας HPV ιοί που συναντώνται στον γενικό πληθυσμό συνήθως προκαλούν στοματοφαρυγγικές αλλοιώσεις ή τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (Doorbar et al., 2012).

## **1.6 Καρκινογένεση, HPV16**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι υψηλού κινδύνου HPV συνδέονται συχνά με την εμφάνιση καρκίνου. Συγκεκριμένα, οι τύποι HPV16 και HPV18 είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο προκαλούμενος από ιούς καρκίνος προκύπτει συχνά σε περιοχές όπου η παραγωγική μόλυνση δεν μπορεί να υποστηριχθεί σωστά. Η ανάπτυξη υψηλού βαθμού τραχηλικής νεοπλασίας είναι αποτέλεσμα χρόνιας λοίμωξης από υψηλού κινδύνου HPV. Η συνεχής διέγερση της φάση S του κυτταρικού κύκλου και ο ασταμάτητος πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε συνδυασμό με την απώλεια των p53-εξαρτώμενων μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA επιτρέπει την συσσώρευση δευτερογενών μεταλλάξεων στο κυτταρικό γονιδίωμα που τελικά μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο (Doorbar, 2006).

Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 στο χρωμόσωμα του κυττάρου-ξενιστή αποτελεί κρίσιμο γεγονός στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Συνήθως, η ενσωμάτωση συμβαίνει με ρήξη του γονιδίου E1 ή/και E2 και πιο σπάνια με ρήξη στα γονίδια L1 και L2. Σε κάθε περίπτωση τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται ανέπαφα. Ωστόσο, η ενσωμάτωση οδηγεί συχνά στην απώλεια των γονιδίων E2 και E4 του ιού, οι πρωτεΐνες των οποίων φυσιολογικά καθυστερούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και οδηγεί στην απορρύθμιση της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Τα γεγονότα αυτά είναι κρίσιμα για την αυξημένη ανάπτυξη των τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (Doorbar, 2006, Xu et al., 2013).

## **1.7 Αναδιατάξεις σε ενσωματωμένο γονιδίωμα του HPV16**

Ο Arias-Pulido και οι συνεργάτες του έχουν αναφέρει την ύπαρξη αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV16 σε τραχηλικούς όγκους. Οι αναδιατάξεις αυτές σχετίζονται με φαινόμενα διπλασιασμού και ελλείψεων εντός των γονιδίων E1 και E2 (Arias-Pulido et al., 2014). Επίσης, σε παλαιότερες μελέτες που έγιναν πάνω στο DNA της καρκινικής κυτταρικής σειράς CaSki βρέθηκαν συνεχόμενες αλληλουχίες του ιικού γονιδιώματος που περιείχαν τμήματα μη γειτονικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες αυτές αποτελούσαν συνδυασμό των γονιδίων E1 με L1 και E2 με L1 (Meissner 1999, Baker C.C. et al., 1987). Μια πιο πρόσφατη μελέτη, στην οποία πραγματοποιήθηκε αλληλουχηκή ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος της καρκινικής κυτταρικής σειράς Caski περιέγραψε συνεχόμενες αλληλουχίες ιικού γονιδιώματος αποτελούμενες από μη γειτονικά γονίδια με ανεστραμμένο προσανατολισμό (Akagi et al., 2014)

## **1.8 Σκοπός**

Σκοπός, λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV16 σε θετικά στον ιό τραχηλικά δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίας.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 60 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας, προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Δεκαεννέα (19) από αυτά ήταν υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG), είκοσι (20) χαμηλού (LG) και εικοσιένα (21) φυσιολογικά (WNL). Τα δείγματα αυτά διατέθηκαν από το από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο “ΑΤΤΙΚΟΝ”. Επίσης εξετάστηκαν και τέσσερα παλαιότερα δείγματα, ένα (1) υψηλού βαθμού δυσπλασίας και τρία (3) χαμηλού, τα οποία επίσης προέρχονταν από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο “ΑΤΤΙΚΟΝ”. Όλα τα HG και LG δείγματα σύμφωνα με τις πληροφορίες που δόθηκαν από το νοσοκομείο ήταν θετικά σε HPV16. Τα δείγματα βρίσκονταν στο μέσο ThinPrep.

**Πίνακας 2.1** Δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

	Δείγματα		
	HG	LG	WNL
ΑΤΤΙΚΟΝ	<b>s2541-14</b>	s1089-14	s1026-14
	s2063-14	s1207-14	s1100-14
	<b>s889-14</b>	s1209-14	s1229-14
	<b>500-15</b>	s1213-14	s1941-14
	<b>s1083-14</b>	<b>s159-15</b>	s1942-14
	<b>s1099-14</b>	s175-15	s1955-14
	s1220-14	<b>s1759-14</b>	s1958-14
	<b>s2417-14</b>	s2085-14	s1959-14
	<b>s2420-14</b>	s2095-14	s2061-14
	<b>s153-15</b>	<b>s212-15</b>	s2087-14
	<b>s162-15</b>	s2192-14	s2177-14
	<b>s166-15</b>	s346-15	s2179-14
	s532-15	s519-15	s2187-14
	s449-15	s522-15	s2193-14
	s1411-14	<b>s900-14</b>	s2418-14
	s626-14	s901-14	s513-15
	s397-14	<b>s912-14</b>	s528-15
	s1225-14	<b>s357-15</b>	s537-15
	<b>s158-15</b>	s147-15	s555-15
	<b>s704-11</b>	<b>s105-15</b>	s558-15
		<b>E819-11</b>	s911-14
		<b>E551-11</b>	
		<b>E717-11</b>	



Παράλληλα με τα κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές CaSki και SiHa. Και οι δύο καρκινικές σειρές προέρχονται από τον τράχηλο της μήτρας και έχουν ενσωματωμένα στο γονιδιωματά τους πολλαπλά αντίγραφα του γονιδιώματος του HPV16. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία του ιού HPV16 μέσω μίας MultiplexPCR η οποία περιγράφεται παρακάτω. Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της MultiplexPCR ο αριθμός των δειγμάτων περιορίστηκε σε δώδεκα HG και 10LG τα οποία παρουσιάζονται με έντονα γράμματα στον Πίνακα 1.1. Τα φυσιολογικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο ως αρνητικοί μάρτυρες.

## 2.2 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995).

Σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml τοποθετήθηκαν 10μl γλυκογόνου, 300μl Lysis Buffer GuSCN και 100μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), τα σωληνάρια αναδεύτηκαν ισχυρά και πραγματοποιήθηκε επώαση στους -20°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000rcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% (-20°C). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000 rcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Η επιβεβαίωση της ακεραιότητας του εκχυλισμένου DNA και ο έλεγχος της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε σε μια Multiplex-PCR παράλληλα με την ταυτοποίηση των δειγμάτων., όπως περιγράφεται παρακάτω.

**Πίνακας 2.2** Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA των δειγμάτων και η δράση τους

Αντιδραστήριο	Δράση
<b>Γλυκογόνο (100mg/ml)</b>	Το γλυκογόνο είναι ένα πολυμερές μεγάλου μοριακού βάρους. Καθώς είναι θετικά φορτισμένο συμλοκοποιείται με τα νουκλεϊκά οξέα (στην συγκεκριμένη περίπτωση με το κυτταρικό και ιικό DNA και RNA). Έτσι, τα νουκλεϊκά οξέα αποκτούν βάρος και κατακρημνίζονται.
<b>Lysis Buffer GuSCN</b>	Η θειοκυανιούχος γουανιδίνη είναι ένας χαοτροπικός παράγοντας, ο οποίος μειώνει το φαινόμενο της υδροφοβικότητας, οδηγώντας στη λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης, απενεργοποιεί τις νουκλεάσες, συνεισφέροντας στην διατήρηση της ακεραιότητας των νουκλεϊκών οξέων, ενώ επιτρέπει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών

<b>Ισοπροπανόλη</b>	Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αδιάλυτα στην ισοπροπανόλη, οπότε η χρήση της επιτυγχάνει την καθίζηση τους (ίζημα, pellet)
<b>Αιθανόλη 70%</b>	Η αιθανόλη απελευθερώνει το DNA από το γλυκογόνο και καθώς τα νουκλεϊκά οξέα είναι αδιάλυτα στην αιθανόλη κατακρημνίζονται και δημιουργούν ίζημα μετά από φυγοκέντηση.
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Χρησιμοποιήθηκε για την επαναδιάλυση του DNA

## 2.3 Ταυτοποίηση δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα ακολούθησε μία Multiplex-PCR όπως αυτή περιγράφεται από τους Tsakogiannis et al. (2014). Η PCR αυτή επιτρέπει την γρήγορη ταυτοποίηση των τύπων HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58 και 66. Για την επιτυχία της έχουν σχεδιαστεί τρία διαφορετικά μίγματα εκκινητών, καθένα από τα οποία ανιχνεύει τρεις από τους παραπάνω τύπους HPV. Πιο αναλυτικά, το PrimerMix I περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 16, 45, και 66. Αντίστοιχα, το PrimerMix II περιέχει εκκινητές ειδικούς για τους HPV 18, 33, και 35 και το PrimerMix III για τους 35, 31 και 51 (Πίνακας 2.3). Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν σε μια περιοχή του γονιδίου L1 του ιού. Καθώς το γονίδιο αυτό είναι καλά συντηρημένο μεταξύ των HPV οι εκκινητές για τους στενά συγγενικούς ιούς σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να υπάρχουν τουλάχιστον δύο mismatch στις τελευταίες 5 βάσεις του 3' άκρου τους. Κάθε PrimerMix περιέχει επιπλέον ένα ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο της β-ακτίνης, που λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο το PrimerMix I καθώς θέλαμε απλά να επιβεβαιώσουμε την παρουσία του HPV16. Επίσης, με την παρουσία των εκκινητών β-ακτίνης ελέγχθηκε παράλληλα η ορθότητα και η ποιότητα της απομόνωσης του DNA καθώς και η ύπαρξη αναστολέων της PCR. Επίσης, παράλληλα με τα κλινικά δείγματα εξετάστηκαν κύτταρα των καρκινικών κυτταρικών σειρών CaSki και SiHa ως θετικοί μάρτυρες για τον HPV16.

**Πίνακας 2.3** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην Multiplex PCR

HPV Identification Mix I			
	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν PCR
<b>β-ακτίνη</b>	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	498 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	
<b>HPV 16</b>	HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291 bp
	HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
<b>HPV45</b>	HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233 bp
	HPV45 L1R	CCACGACCAATTTCCATACC	
<b>HPV66</b>	HPV66 L1F	CGCCGTAAACGTATTCCTA	168 bp
	HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Το PrimerMix I περιείχε 25pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών και 10pmol του ζεύγους β-ακίνης. Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε το μίγμα των εκκινητών, 5X KAPA2G Buffer A (KAPA, Boston, Massachusetts, USA) το οποίο περιείχε 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM dNTPs και 0.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA2GFast DNA polymerase, KAPA, Boston, Massachusetts, USA).

ΗPCRπραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min
- 40 κύκλοι:
  - 95°C για 30s
  - 58°C για 50s και
  - 72°C για 10s
- Τελική ενίσχυση στους 72°C για 1 min

Η ταυτοποίηση των HPVκαι η ανίχνευση της β-ακτίνης έγινε με βάση το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

## **2.4 Ταυτοποίηση HPV16 ενδο-ικών αναδιατάξεων**

Η ανίχνευση των ενδο-ικών αναδιαταγμένων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε μέσω RS-PCR (Restriction Site PCR). Η RS-PCR είναι μια άμεση μέθοδος με την οποία άγνωστες αλληλουχίες, οι οποίες όμως γειτνιάζουν με γνωστές αλληλουχίες, μπορούν να ανακτηθούν πολύ γρήγορα. Η RS-PCR απαιτεί την ύπαρξη ενός εκκινητή ο οποίος αναγνωρίζει μία θέση αναγνώρισης κάποιου περιοριστικού ενζύμου, συνδέεται σε αυτήν και προωθεί τη σύνθεση DNA. Για την ανάκτηση μιας άγνωστης αλληλουχίας, η PCR διεξάγεται με έναν εκκινητή που αντιστοιχεί στο κομμάτι της γνωστής αλληλουχίας και ένα restriction site oligonucleotide (RSO) που λειτουργεί ως εκκινητής για το άλλο άκρο του άγνωστου τμήματος. Η άγνωστη αλληλουχία βρίσκεται, δηλαδή, μεταξύ του εκκινητή της γνωστής αλληλουχίας και του RSO. Ακολούθως, μία Nested PCR διεξάγεται σε μικρό κλάσμα της πρώτης PCR, στην οποία χρησιμοποιείται ο ίδιος RSO και ένας εσωτερικός εκκινητής της γνωστής αλληλουχίας. Το προϊόν της Nested PCR αλληλουχείται (Sarkar et al., 1993). Στην παρούσα εργασία, η RS-PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση HPV16 τυποειδικών εκκινητών σε συνδυασμό με τέσσερεις RSO (Πίνακας 2.4).

	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία(5'-3')
RS-PCR	HPV16-768-24D	ACAAAGCACACACGTAGACATTCCG
	HPV16-1545-26D	AGTAATAAATCAACGTGTTGCGATTG
	HPV16-2836-25D	TTTGTTTACAACCATTAGCAGATGC
	HPV16-2929-24D	GTGCCAACACTGGCTGTATCAAAG
	HPV16-5156-74U	TACCAATTCTACTGTACCTAATGCCAG
	HPV16-5883-27U	ACTTATTGGGGTCAGGTAAATGTATTC
	HPV16-6668-25U	AGTAGATATGGCAGCACATAATGAC
	HPV16-7591-22D	GTTGGCAAGCAGTGCAGGTCAG
Nested PCR	HPV16-790-25D	CGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGG
	HPV16-1587-26D	GGACTTACACCCAGTATAGCTGACAG
	HPV16-2414-26D	AATAGGTATGTTAGATGATGCTACAG
	HPV16-2964-25D	ACAAGCAATTGAACTGCAACTAACG
	HPV16-5121-25U	GAGGTTAATGCTGGCCTATGTAAAG
	HPV16-5850-28U	CCCTGTATTGTAATCCTGATACTTTAGG
	HPV16-6651-25U	TGCGTGTAGTATCAACAACAGTAAC
	HPV16-7524-26U	TTAAACCATAGTTGCTGACATAGAAC
RSO primers	RSO-Bam	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGGATCC
	RSO-Eco	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNNGAATTC
	RSO-Xma	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNCCCGGG
	RSO-Sau	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGATC

**Πίνακας 2.4** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ενδο-ικών αλληλουχιών του HPV16 σε κλινικά δείγματα. Οι αριθμοί που ακολουθούν το HPV αντιστοιχούν στη θέση της ικής αλληλουχίας, ενώ τα γράμματα D και U δείχνουν τον προσανατολισμό του εκκινητή (D για Forward Primer & U για Reverse Primer). Οι RSO που χρησιμοποιήθηκαν συνδέονται στις αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI, EcoRI, XmaI και Sau3AI, αντίστοιχα.

Η RS-PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Το μίγμα της PCR περιείχε 2pmol του κάθε ικού τυποειδικού εκκινητή και 20pmol του εκκινητή RSO, 5 μl 5X KAPA2G Buffer A (KAPA), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) και 0.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA2G Robust DNA Polymerase, KAPA, Boston, USA). Ο ισυνθήκεσης PCR ήταν οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min
- 30 κύκλοι από:
  - 30s στους 95°C
  - 1 min στους 45°C, και
  - 2min στους 72°C
- τελική ενίσχυση στους 72°C για 5 min

Η Nested PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 2μl της πρώτης RS-PCR ως μήτρα. Ο τελικός όγκος της Nested PCR ήταν 25μl. Το μίγμα της PCR περιείχε 2pmol του κάθε ικού τυποειδικού εκκινητή και 20pmol από κάθε εκκινητή RSO, 5μl 5X KAPA2G Buffer A (KAPA), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM dNTPs (Invitrogen, Life Technologies,

Carlsbad, CAUSA) and 0.5U θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (KAPA2G Robust DNA Polymerase, KAPA, Boston, USA). Οι συνθήκες της PCR ήταν οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2min
- 35 κύκλοι από:
  - 95°C για 30s
  - 55°C για 1 min, και
  - 72°C για 2 min
- τελική ενίσχυση στους 72°C για 5min

## 2.5 Ανάλυση αλληλουχίας

Κάθε προϊόν της Nested PCR κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene Corporation, USA). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καθαρίστηκαν με τη χρήση του Nucleospin plasmid kit και αλληλουχήθηκαν από τη Macrogen Europe, Amsterdam, the Netherlands. Οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες χαρακτηρίστηκαν στο NCBI (National Centre for Biotechnology Information) με τη χρήση του αλγορίθμου MegaBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Η αρίθμηση των νουκλεοτιδικών θέσεων προσδιορίστηκε μέσω ευθυγράμμισης αλληλουχιών μεταξύ του γονιδιώματος πρότυπων στελεχών HPV16 και των αναγνωρισμένων αναδιαταγμένων αλληλουχιών του HPV16 με τη χρήση του αλγορίθμου MUSCLE του προγράμματος MEGAN.5.

### 2.5.1 Απομόνωση προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης

Τόσο μετά τη Nested RS-PCR, όσο και μετά την επιβεβαιωτική PCR ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχιση των δειγμάτων. Αφού, λοιπόν ελέγχθηκε και φωτογραφήθηκε το πήκτωμα της εκάστοτε PCR, τα προϊόντα τους έπρεπε να απομονωθούν. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του PCR clean-up Gel extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- 1) Για κάθε 100mg πηκτώματος (<2%) προστίθενται στο σωληνάκι 200μl Buffer TNT. Τα δείγματα επωάζονται για 5-10 λεπτά στους 50°C με ισχυρή ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά, προκειμένου να διαλυθεί το πήκτωμα.

- 2) Δέσμευση του DNA: Σε συλλεκτικό σωληνάκι τοποθετείται στήλη (NucleoSpin Geland PCR Clean-up Column) που περιέχει μια μεμβράνη silica. Στη στήλη προστίθενται μέχρι και 700μl από το σωληνάκι του πρώτου βήματος και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30s στα 11000g. Το υγρό που διηθήθηκε από τη μεμβράνη της στήλης απορρίπτεται. Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιήσαμε όλο το δείγμα του πρώτου βήματος επαναλαμβάνουμε το δεύτερο με την υπόλοιπη ποσότητα.
- 3) Έπειτα ακολουθεί πλύση της μεμβράνης silica: Προστίθενται 700μl Buffer NT3 και τα δείγματα φυγοκεντρούνται πάλι για 30s στα 11000g. Το υγρό που πέρασε στο συλλεκτικό σωληνάκι απορρίπτεται. Συνιστάται το βήμα αυτό να επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά.
- 4) Στη συνέχεια στεγνώνεται η μεμβράνη: τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται για 1min στα 11000g για την απομάκρυνση του υπολειπόμενου Buffer NT3 από τη μεμβράνη. Το συλλεκτικό σωληνάκι απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάκι των 2ml.
- 5) Διάλυση του DNA: μετά την αλλαγή του συλλεκτικού σωλήνα προστίθενται στη στήλη 15-30μl του Buffer NE. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και ακολούθως φυγοκεντρούνται για 1min στα 11000g. Το NE ξεπλένει το DNA από τη μεμβράνη με αποτέλεσμα αυτό να καταλήγει στο σωληνάκι των 2ml. Η στήλη απορρίπτεται.

Όλα τα προϊόντα του καθαρισμού υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση.

## 2.5.2 Κλωνοποίηση με το StrataClone PCR Cloning Kit

### • Ανασυνδυασμός πλασμιδίου

Προετοιμάζουμε το μίγμα της αντίδρασης προσθέτοντας με τη σειρά τα παρακάτω συστατικά:

- 3μl StrataClone Cloning Buffer
- 2μl of PCR product
- 1μl StrataClone Vector Mix amp/kan
- Αναδεύουμε απαλά με συνεχόμενο πιπετάρισμα και επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση τοποθετούμε την αντίδραση στον πάγο.

### • Μετασχηματισμός κυττάρων

- 1) Ξεπαγώνουμε ένα σωλήνα δεκτικών κυττάρων για κάθε δείγμα.

- 2) Προσθέτουμε 2 μl από την αντίδραση πρόσδεσης (ligation) σε κάθε σωλήνα και αναδεύουμε ήπια.
- 3) Επώαζουμε το μείγμα μετασχηματισμού για 20min στον πάγο, (κατά την επώαση προθερμαίνουμε το θρεπτικό μέσο LB στους 42°C).
- 4) Υποβάλλουμε το μείγμα μετασχηματισμού σε θερμικό σοκ στους 42°C για 45s.
- 5) Επώαζουμε το μείγμα μετασχηματισμού για 2min στον πάγο.
- 6) Προσθέτουμε 250μl από το προθερμασμένο θρεπτικό μέσο LB στο μείγμα μετασχηματισμού. Επιτρέπουμε στα δεκτικά κύτταρα να ανακάμψουν για τουλάχιστον 1h στους 37°C με ανακίνηση, (για καλύτερο αερισμό τοποθετούμε τους σωλήνες με τα κύτταρα οριζόντια στον αναδευτήρα, ο οποίος ρυθμίζεται στους 180 κύκλους/min).
- 7) Κατά την περίοδο της επώασης προετοιμάζουμε τα τριβλία με LB και αμπικιλίνη.
- 8) Μεταφέρουμε 5-100μl κάθε καλλιέργειας σε ένα τριβλίο με LB-agar με 1,5μl/ml LB-agar (6,6mg/ml stock).
- 9) Τέλος, προσθέτουμε 16μl X-Gal (50mg/ml).
- 10) Επώαζουμε τα τριβλία στους 37°C overnight.
- 11) Συλλέγουμε τις λευκές αποικίες.
- 12) Μεταφέρουμε κάθε αποικία σε 2ml LB-Broth με 1μl/ml LB-Broth (100μg/ml stock).
- 13) Επώαζουμε στους 37°C με έντονη ανάδευση (210 κύκλοι/min) overnight.
- 14) Ακολουθεί εκχύλιση των πλασμιδίων.

### 2.5.3 Καθαρισμός πλασμιδίων

Ο καθαρισμός των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin plasmid kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή:

- 1) Απομόνωση μετασχηματισμένων κυττάρων:
  - Απομόνωση 1-5ml από μία κορεσμένη καλλιέργεια E.Coli σε LB
  - φυγοκέντρηση για 30s στα 11000g ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα.
  - Απόρριψη του υπερκείμενου.
- 2) Λύση των κυττάρων:
  - Προστίθενται 250μl Buffer A1. Το συσσωμάτωμα των κυττάρων διαλύεται πλήρως μέσω ανάδευσης με vortex ή με πιπετάρισμα.

- Προστίθενται 250μl Buffer A2\* και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή 6-8 φορές. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Προστίθενται 300μl Buffer A3 και πραγματοποιείται απαλή ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές μέχρι να αλλάξει πλήρως το χρώμα των δειγμάτων.

\* Εάν το Buffer A2 παρουσιάζει λευκό ίζημα το θερμαίνουμε για μερικά λεπτά στους 30-40°C, μέχρι το ίζημα να διαλυθεί. Αναδεύουμε διεξοδικά και κρυώνουμε το Buffer σε θερμοκρασία δωματίου.

### 3) Καθαρισμός του λύματος:

- Φυγοκέντρηση για 5 min στα 11000g σε θερμοκρασία δωματίου

\* Σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται

### 4) Δέσμευση του DNA:

- Μία στήλη (NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column) τοποθετείται σε συλλεκτικό σωλήνα (Collection Tube) των 2ml
- Το υπερκείμενο του βήματος 3 μεταφέρεται στη στήλη (μέγιστος όγκος 750μl)
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000g σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της στήλης στο συλλεκτικό σωλήνα.

\* Το βήμα επαναλαμβάνεται σε περίπτωση που έχει μείνει υπερκείμενο από το βήμα 3

### 5) Πλύσιμο μεμβράνης Silica

- Εάν το πλασμιδιακό DNA προέρχεται από στελέχη που περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεασών συνιστάται η πραγματοποίηση ενός επιπλέον βήματος πλύσης με προσθήκη 500μl Buffer AW (προαιρετικά προθερμασμένο στους 50°C) και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000g
- Προστίθενται 600μl Buffer A4
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000g
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της στήλης στο συλλεκτικό σωλήνα.

### 6) Στέγνωμα μεμβράνης Silica

- Φυγοκέντρηση για 2 min στα 11000g
- Απομάκρυνση συλλεκτικού σωλήνα

### 7) Διάλυση DNA

- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα των 2ml
- Προστίθενται 50μl Buffer AE



- Πραγματοποιείται επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 1min στα 11000g
- Απομάκρυνση στήλης και αποθήκευση δείγματος.

## 2.6 Επιβεβαίωση αναδιατάξεων

Η HPV16 αναδιαταγμένες ενδο-ικές αλληλουχίες επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση ζευγών εκκινητών που ενισχύουν εκατέρωθεν του σημείου όπου έγινε η αναδιάταξη, αλλά και με τη χρήση του κατάλληλου τραχηλικού δείγματος ως μήτρα. Τα ζεύγη εκκινητών σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αναγνωρισθέντων αναδιατάξεων στο DNA του HPV16 και κατασκευάστηκαν μέσω του προγράμματος Primer3 (WhiteheadInstitute; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>). Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών για την αναδιάταξη E7,E1/L1, το *RSE1F1-RSE1R1*, καθώς η αναδιάταξη E2/L1 δεν ταυτοποιήθηκε.

	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση	Προϊόν PCR
<b>E7,E1/L1</b>	RSE1F1	TGT GTG CCC CAT CTG TTC T	828	251bp
	RSE1R1	TTG TCC ACC ATT AGA GTT ACC C	6208	

**Πίνακας 2.5** Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των αναδιαταγμένων θέσεων.

Η ενίσχυση με PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο των 50μl. Κάθε μίγμα PCR περιείχε 25pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών, 10X Taq Buffer (GeneON, Ludwigshafen am Rhein, Germany), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA USA) και 2.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Maximo Taq DNA Polymerase, GeneON, Ludwigshafen am Rhein, Germany).

Οι συνθήκες PCR για το ζεύγος εκκινητών *RSE1F1-RSE1R1* ήταν οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2min
- 40 κύκλοι από:
  - 95°C για 40s
  - 50°C για 40s, και
  - 72°C για 20s
- Τελική ενίσχυση στους 72°C για 5min

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε κλωνοποίηση και αλληλούχιση όπως περιγράφηκε παραπάνω.

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων των διαφόρων PCR έγινε με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης.

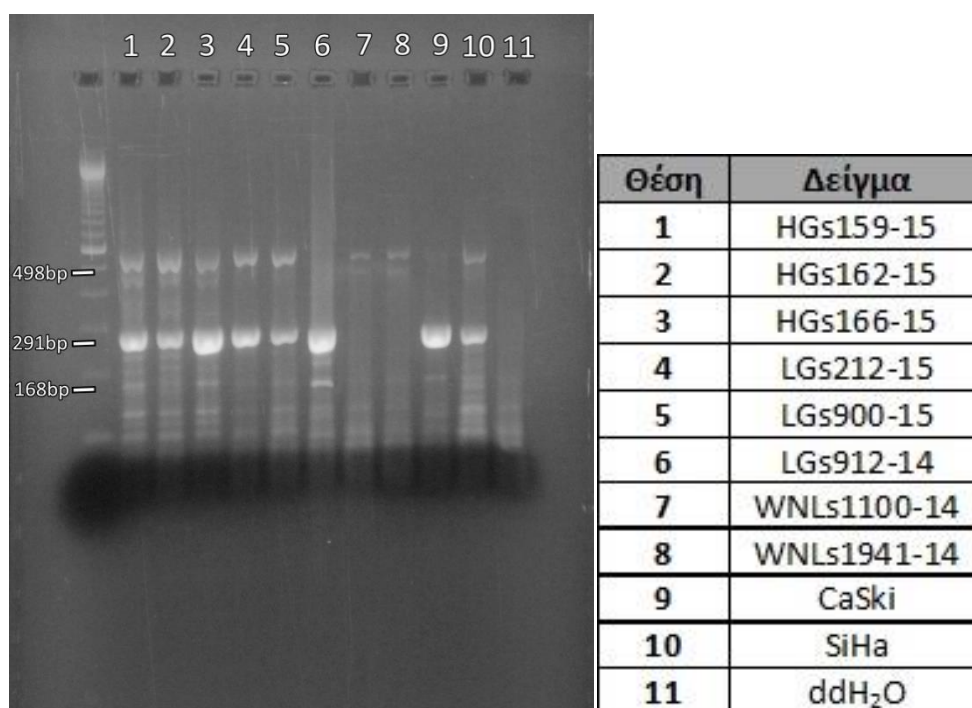
Για τα προϊόντα της Multiplex PCR χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Για το πήκτωμα αυτό διαλύθηκαν 1,2gr αγαρόζης σε 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric Acid). Το παραπάνω μίγμα θερμάνθηκε για λίγο ώστε να διαλυθεί καλά η αγαρόζη. Αφού η θερμοκρασία του έπεσε λίγο προστέθηκαν 60ml βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει σε υπεριώδες φως (μήκος κύματος 290nm) και καθώς έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο DNA, το κάνει ορατό στο πήκτωμα. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα 10ml του προϊόντος της PCR αναμιγνύονται με περίπου 1-2ml χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης σε 40% w/v σουκρόζης σε TBE) και φορτώνονται στο πήκτωμα. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 125 Volts για 30-60 λεπτά. Το πήκτωμα ακολούθως τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI) ώστε να γίνουν εμφανείς οι ζώνες των προϊόντων της PCR και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή μηχανή (Olympus digital camera).

Το πήκτωμα για την RS-PCR είχε επίσης συγκέντρωση 2%, οπότε χρησιμοποιήθηκαν ίδιες ποσότητες, ενώ για την ανάλυση των προϊόντων της επιβεβαιωτικής PCR παρασκευάστηκε πήκτωμα 2,5%.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων

Όπως προαναφέρθηκε, τα προϊόντα της Multiplex PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Δείγματα θετικά σε HPV16 εμφανίζουν ζώνη στα 291bp, ενώ τα θετικά σε HPV45 και HPV66 στα 233bp και 168 bp αντίστοιχα. Η β-ακτίνη δίνει ζώνη στα 498bp. Όπως δείχνουν και οι παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.1, 3.2), τα περισσότερα υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δείγματα ήταν θετικά στον HPV16. Μάλιστα, δύο χαμηλής δυσπλασίας δείγματα (τα LGs912-14 και LGs357-15) ήταν θετικά και στον HPV66, ενώ κανένα δείγμα δεν φάνηκε να είναι θετικό στον HPV45. Επίσης, όλα τα φυσιολογικά δείγματα ήταν αρνητικά σε όλους τους τύπους HPV που εξετάστηκαν. Στην *Εικόνα 3.1* φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Multiplex PCR από τρία θετικά σε HPV16 HG δείγματα, τρία θετικά σε HPV16 LG δείγματα (ένα από αυτά ήταν θετικό και για HPV66), δύο φυσιολογικά δείγματα (αρνητικά σε HPV16), η κυτταρική σειρά CaSki, η κυτταρική σειρά SiHa και ddH<sub>2</sub>O.



**Εικόνα 3.1** Ηλεκτροφόρηση μετά από Multiplex PCR για την ταυτοποίηση των HPV16, 45, 66. Αριστερά, πριν τα δείγματα υπάρχει ένας Ladder των 100bp. Σχεδόν όλα τα δείγματα έχουν ζώνη λίγο πιο κάτω από τα 300bp. Αυτή είναι η ζώνη ταυτοποίησης των HPV16. Εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα στις θέσεις 7 και 8 που προέρχονται από φυσιολογικό ιστό. Το δείγμα της θέσης 6 έχει έντονη ζώνη και λίγο πιο κάτω από τα 200bp, οπότε και είναι θετικό στον HPV66. Επίσης σχεδόν όλα τα δείγματα έχουν ζώνη στα 500 bp, η οποία αντιστοιχεί στη β-ακτίνη. Ωστόσο στο δείγμα 6 και στο θετικό μάρτυρα CaSki η ζώνη αυτή απουσιάζει (λόγω του ότι όλα τα υλικά της αντίδρασης καταναλώθηκαν κυρίως στην HPV 16 ανίχνευση δεδομένου ότι ο ιός ευρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα δείγματα αυτά). Στη θέση 11, το νερό λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας.

Ορισμένα δείγματα ενώ ήταν θετικά στη β-ακτίνη φάνηκαν να είναι αρνητικά στον HPV16. Σύμφωνα με τις πληροφορίες του νοσοκομείου όμως, όλα τα HG και LG δείγματα πρέπει να είναι θετικά σε HPV16. Η εικόνα αυτή πιθανώς να οφείλεται σε ρίξη του γονιδίου της L1 στο σημείο όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής. Άλλα δείγματα, όπως το CaSki, είχαν πολύ έντονη ζώνη στα 291 bp και πολύ αχνή έως απύουσα ζώνη στην β-ακτίνη. Στην περίπτωση αυτή τα γονίδια του HPV16 ενισχύθηκαν εντονότερα λόγω του αυξημένου αριθμού αντιγράφων του ιού στο δείγμα, οπότε και τα αντιδραστήρια δεν επαρκούσαν για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης. Το ίδιο συμβαίνει και στα δύο θετικά στον HPV66 LG δείγματα, όπου ενισχύθηκαν τα γονίδια των HPV16 και 66, αλλά όχι της β-ακτίνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα δείγματα ήταν αρνητικά τόσο στην β-ακτίνη, όσο και στους τρεις HPV. Πιθανή εξήγηση είναι ότι στα δείγματα αυτά υπήρχαν αναστολείς της PCR.

Δείγμα HG	β-ακίνη	HPV16	HPV45	HPV66	Δείγμα LG	β-ακίνη	HPV16	HPV45	HPV66
s2541-14	✓	✓	-	-	s1089-14	-	✓	-	-
s2063-14	✓	✓	-	-	s1207-14	✓	-	-	-
s889-14	✓	✓	-	-	s1209-14	✓	✓	-	-
500-15	✓	✓	-	-	s1213-14	-	-	-	-
s1083-14	✓	✓	-	-	s159-15	✓	✓	-	-
s1099-14	✓	✓	-	-	s175-15	✓	-	-	-
s1220-14	-	-	-	-	s1759-14	✓	✓	-	-
s2417-14	✓	✓	-	-	s2085-14	✓	✓	-	-
s2420-14	✓	✓	-	-	s2095-14	-	✓	-	-
s153-15	✓	✓	-	-	s212-15	✓	✓	-	-
s162-15	✓	✓	-	-	s2192-14	-	✓	-	-
s166-15	✓	✓	-	-	s346-15	✓	✓	-	-
s532-15	✓	✓	-	-	s519-15	✓	-	-	-
s449-15	✓	✓	-	-	s522-15	✓	-	-	-
s1411-14	-	✓	-	-	s900-14	✓	✓	-	-
s626-14	-	✓	-	-	s901-14	✓	-	-	-
s397-14	-	✓	-	-	s912-14	✓	✓	-	✓
s1225-14	-	✓	-	-	s357-15	✓	✓	-	✓
s158-15	✓	✓	-	-	s147-15	-	-	-	-
s704-11	✓	✓	-	-	s105-15	✓	✓	-	-
					E819-11	✓	✓	-	-
					E551-11	✓	✓	-	-
					E717-11	✓	✓	-	-

**Πίνακας 3.1** Αριστερά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των 20 HG δειγμάτων, ενώ δεξιά αυτά των 23 LG δειγμάτων.

Δείγμα WNL	β-ακίνη	HPV16	HPV45	HPV66
s1026-14	✓	-	-	-
<b>s1100-14</b>	✓	-	-	-
s1229-14	✓	-	-	-
<b>s1941-14</b>	✓	-	-	-
s1942-14	-	-	-	-
s1955-14	-	-	-	-
s1958-14	✓	-	-	-
s1959-14	-	-	-	-
s2061-14	✓	-	-	-
s2087-14	✓	-	-	-
s2177-14	✓	-	-	-
s2179-14	✓	-	-	-
s2187-14	✓	-	-	-
<b>s2193-14</b>	✓	-	-	-
<b>s2418-14</b>	✓	-	-	-
s513-15	✓	-	-	-
<b>s528-15</b>	✓	-	-	-
<b>s537-15</b>	✓	-	-	-
<b>s555-15</b>	✓	-	-	-
<b>s558-15</b>	✓	-	-	-
s911-14	-	-	-	-

**Πίνακας 3.2** Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των 21 φυσιολογικών δειγμάτων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται τα δείγματα με έντονη ζώνη β-ακτίνης.

Όπως προαναφέρθηκε, ο αριθμός των δειγμάτων που τελικά χρησιμοποιήθηκαν μειώθηκε, καθώς στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μόνο δείγματα θετικά σε HPV16 που είχαν και εμφανή ζώνη β-ακτίνης (παρουσιάζονται με έντονα γράμματα στον ανωτέρω πίνακα). Έτσι τελικά μελετήθηκαν 12 HG δείγματα, 10 LG δείγματα και 8 φυσιολογικά δείγματα.

### 3.2 Ανάλυση αλληλουχιών

Η RS-PCR είναι μια τεχνική που μπορεί να ανακτήσει άγνωστες αλληλουχίες που πλευρίζουν σε μια γνωστή αλληλουχία. Στην παρούσα εργασία η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ενσωματωμένων στο γονιδίωμα του ξενιστή αλληλουχιών του HPV16 που υπέστησαν ενδο-ικές αναδιατάξεις. Χρησιμοποιήθηκαν λοιπόν ειδικοί εκκινητές που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα του HPV16 σε συνδυασμό με εξειδικευμένα εκκινητικά μόρια RSOs (Restriction Site Oligonucleotides), τα οποία υβριδοποιούνται σε άγνωστες αλληλουχίες (Πίνακας 2.4). Με την παραπάνω τεχνική αναμένεται να ενισχυθούν τρεις κατηγορίες αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, αυτές είναι αλληλουχίες που περιλαμβάνουν μόνο ιικό

DNA, αλληλουχίες που περιλαμβάνουν μόνο κυτταρικό DNA και αλληλουχίες που περιλαμβάνουν τμήματα ιικού DNA που γειτνιάζουν σε κυτταρικό DNA. Η τελευταία κατηγορία αλληλουχιών προκύπτει μετά από ρήξη του ιικού γονιδιώματος και ενσωμάτωσης του στο DANN ξενιστή. Έτσι, από τις RS-PCR στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι RSO-Eco, RSO-Xma και RSO-Sau προέκυψαν τμήματα των αλληλουχιών των γονιδίων E1, E2, L1 και L2 από το DNA του HPV16, όπως και αλληλουχίες προερχόμενες αποκλειστικά από το κυτταρικό γονιδίωμα. Η εφαρμογή της RS-PCR με RSO-Bam αποκάλυψε εκτός από μεμονωμένες κυτταρικές και ικές αλληλουχίες και ενδο-ϊκά αναδιαταγμένες αλληλουχίες του HPV16.

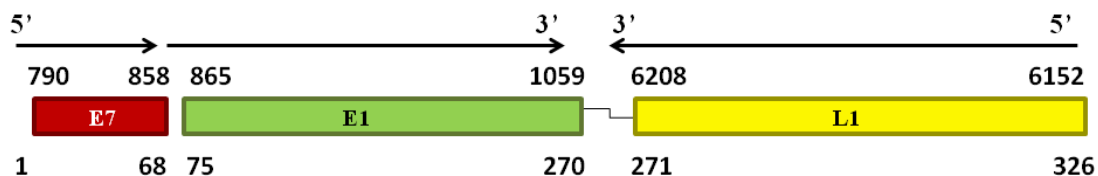
RSO Bam		
Κλινική εικόνα	Δείγμα	
LG	s159-15	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
LG	s1759-14	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
LG	s212-15	HPV16 αλληλουχίες
LG	s900-14	HPV16 αλληλουχίες
LG	s912-14	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
LG	s357-15	HPV16 αλληλουχίες
LG	s105-15	κυτταρικές αλληλουχίες
LG	E819-11	Αναδιαταγμένες ενδο-ϊκές αλληλουχίες (E7,E1/L1)
LG	E551-11	Αναδιαταγμένες ενδο-ϊκές αλληλουχίες (E7,E1/L1), κυτταρικές αλληλουχίες
LG	E717-11	Αναδιαταγμένες ενδο-ϊκές αλληλουχίες (E7,E1/L1), κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s2541-14	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s889-14	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	500-15	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s1083-14	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
HG	s1099-14	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
HG	s2417-14	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s2420-14	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s153-15	HPV16 αλληλουχίες
HG	s162-15	κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες
HG	s166-15	HPV16 αλληλουχίες
HG	s158-15	κυτταρικές αλληλουχίες
HG	s704-11	Αναδιαταγμένες ενδο-ϊκές αλληλουχίες (E7,E1/L1), HPV16 αλληλουχίες
φυσιολογικά	s1100-14	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s1941-14	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s2193-14	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s2418-14	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s528-15	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s537-15	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s555-15	κυτταρικές αλληλουχίες
φυσιολογικά	s558-15	κυτταρικές αλληλουχίες

**Πίνακας 3.3** Αποτελέσματα RS-PCR με χρήση RSO-Bam σε συνολικά 30 τραχηλικά δείγματα. Η μέθοδος έδειξε κυτταρικές αλληλουχίες, HPV16 αλληλουχίες και HPV16 ενδο-ϊκές αναδιαταγμένες αλληλουχίες.

Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.3, τμηματικές αλληλουχίες του HPV16 βρέθηκαν σε τρία δείγμα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και δύο δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας. Τόσο μεμονωμένες αλληλουχίες του κυττάρου όσο και του HPV16 βρέθηκαν σε τρία δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και τρία υψηλού βαθμού. Τέλος, τα χαμηλής δυσπλασίας δείγματα E819-11, E551-11 και E717-11 φιλοξενούν τόσο ενδο-ικά αναδιαταγμένες αλληλουχίες HPV16, όσο και κυτταρικές αλληλουχίες, ενώ το δείγμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας S704-11 περιείχε τόσο ενδο-ικά αναδιαταγμένες αλληλουχίες HPV16, όσο και απλές ιικές αλληλουχίες. Η αναδιάταξη E7,E1/L1 ταυτοποιήθηκε με RS-PCR και στην καρκινική κυτταρική σειρά CaSki. Η αναδιάταξη E2/L1 δεν ταυτοποιήθηκε σε κανένα από τα δείγματα.

### 3.3 Φαινόμενα αναδιάταξης

Σε μία περίπτωση υψηλού βαθμού δυσπλασίας (S704-11) και σε τρεις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (E819-11, E551-11 και E717-11) η ενίσχυση με τους εκκινητές HPV16-790-25D που υβριδοποιούνται στη θέση 790 του HPV-16 DNA (στο γονίδιο E7) και RSO-Bam που υβριδοποιείται σε άγνωστη αλληλουχία που περιλαμβάνει θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BamHI έδωσε ένα προϊόν αναδιαταγμένης αλληλουχίας με αναστροφή μήκους 326bp. Η ενδο-ικά αναδιαταγμένη αλληλουχία του HPV16, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2, συμπεριλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του γονιδίου E7 και ένα τμήμα του γονιδίου E1 με φορά 5' προς 3', όπως και ένα τμήμα του γονιδίου L1 με αντιπαράλληλο προσανατολισμό (3' προς 5').



**Εικόνα 3.2** Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων E7, E1 και L1. Από την θέση 1 έως την θέση 68 η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 790 ως 858 του γονιδίου E7 (κόκκινο χρώμα) και από τη θέση 75 ως τη 270 στα αντίστοιχα νουκλεοτίδια 856 ως 1059 του γονιδίου E1 (πράσινο χρώμα). Στη συγκεκριμένη περιοχή ο προσανατολισμός είναι 5'-3'. Από την θέση 270 έως την θέση 326 αντιστοιχεί η περιοχή του L1 γονιδίου (κίτρινο χρώμα) μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6208 και 6152. Ο προσανατολισμός στη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία είναι 3'-5'.

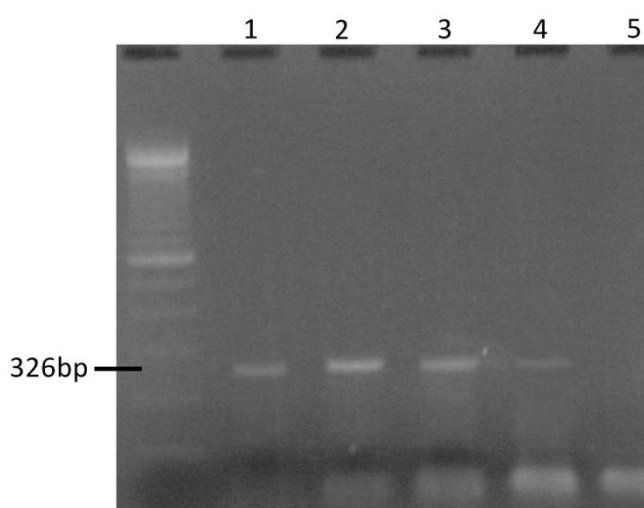
Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα αυτά, η αναδιαταγμένη αλληλουχία E7,E1/L1 στη θέση 1 έως 270 έχει υψηλή νουκλεοτιδική αντιστοιχία με την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 790 και 858 του γονιδίου E7 και την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 865 και 1059 του 5' άκρου του E1 γονιδίου, με προσανατολισμό 5' προς 3'. Στη θέση 271 με 326 η αναδιαταγμένη αλληλουχία έχει υψηλή

νουκλεοτιδική αντιστοιχία με την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6208 και 6152 του γονιδίου L1, με προσανατολισμό 3' προς 5'. Στην αναδιαταγμένη αλληλουχία η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 6152 είχε διαγραφεί (γωνίδια E2, E4, E5, L2 και τμήμα των γονιδίων E1 και L1). Επίσης, μετά από χαρτογραφική ανάλυση στα κλινικά δείγματα s704-11, E819-11, E551-11 και E717-11 παρατηρήθηκε μία νουκλεοτιδική έλλειψη αδερίνης στη θέση 6168 του γονιδίου L1.

### 3.4 Επιβεβαίωση αναδιατάξεων

Για να διερευνηθεί η ειδικότητα των αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV-16, καθώς και για να επιβεβαιωθεί ότι τα προϊόντα αυτά δεν δημιουργήθηκαν αυθόρμητα κατά την εφαρμογή της μεθόδου RS-PCR, σχεδιάστηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητικών, που στοχεύουν στα άκρα της αναδιαταγμένης αλληλουχίας. Για τα δείγματα s704-11, E819-11, E551-11 και E717-11 σχεδιάστηκε, λοιπόν, το ζεύγος RSE1R1-RSE1F1 ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενδο-ικού ανασυνδυασμού E7,E1-L1.

Για να επιβεβαιωθεί ότι ίδιες ενδο-ικές ανακατανομές μπορούν να αναπτυχθούν ανεξάρτητα, σε διαφορετικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε μία ακόμα εκχύλιση από τα τραχηλικά δείγματα που περιείχαν τον συγκεκριμένο ανασυνδυασμό. Το νεοεκχυλισμένο DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για ενίσχυση με PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι για την ανακατανομή εκκινητές που περιγράφηκαν παραπάνω. Μετά την ηλεκτροφόρηση, στο πήκτωμα αγαρόζης φάνηκε μία μοναδική ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος σε όλα τα εκχυλίσματα (Εικόνα 3.3).



**Εικόνα 3.3** Πήκτωμα αγαρόζης που επιβεβαιώνει την αναδιάταξη E7,E1/L1 των ενδο-ικών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας τον υποκινητή RSE1F1-RSE1R1. Από αριστερά προς τα δεξιά στην εικόνα φαίνεται ο Ladder (100bp) ακολουθούν με τη σειρά τα δείγματα s704-11, E819-11, E551-11 και E717-11 στις θέσεις 1, 2, 3 και 4. Τελευταίο (θέση 5) είναι το νερό (ddH<sub>2</sub>O) που χρησιμεύει ως αρνητικός μάρτυρας.



Η κλωνοποίηση και η ανάλυση της αλληλουχίας των προϊόντων της παραπάνω PCR αποκάλυψε σε όλα τα δείγματα την αναμενόμενη συζευγμένη αλληλουχία με τον ανεστραμμένο προσανατολισμό. Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι νέες ανεστραμμένες αλληλουχίες στην παθογένεια του ιού καθώς και ο τρόπος με τον οποίο έχουν σχηματιστεί, αποτελούν ακόμη αντικείμενο εργαστηριακής μελέτης.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η ενσωμάτωση του HPV16 DNA στο χρωμόσωμα του ξενιστή αποτελεί κρίσιμο βήμα που οδηγεί σε γενετική αστάθεια και τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η ενσωμάτωση του HPV16 έχει καταστροφικές επιδράσεις στο γονιδίωμα του ξενιστή, όπως είναι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, ελλείψεις, μεταθέσεις και αναδιπλασιασμοί. (Xu et al., 2013, Akagi et al., 2014). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι γονιδιακή ανάλυση της καρκινικής κυτταρικής σειράς CaSki δεν επιβεβαίωσε μόνο την παρουσία βλαβών στο χρωμόσωμα του ξενιστή, αλλά έδειξε ότι η ενσωμάτωση έχει αρνητικές επιπτώσεις και για τον ίδιο τον ιό, καθώς ανακαλύφθηκαν ενδο-ικικές αναδιαταγμένες αλληλουχίες του HPV16 (Meissner et al., 2002, Akagi et al., 2014). Με βάση αυτά τα δεδομένα, λοιπόν, μελετήθηκαν είκοσι δύο (22) κλινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας για την παρουσία αναδιαταγμένων αλληλουχιών στο γονιδίωμα του HPV16.

Η αναζήτηση HPV16 ενδο-ικών αναδιαταγμένων αλληλουχιών σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της RS-PCR (Restriction Site PCR). Η μέθοδος αυτή αποκάλυψε ενδο-ικά αναδιαταγμένες αλληλουχίες με ανεστραμμένο προσανατολισμό σε ένα δείγμα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας και σε τρία χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας.

Η ύπαρξη αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV16 σε τραχηλικούς όγκους έχουν ήδη αναφερθεί από τον Arias-Pulido και τους συνεργάτες του. Οι αναδιατάξεις αυτές σχετίζονται με φαινόμενα διπλασιασμού και ελλείψεων εντός των γονιδίων E1 και E2 (Arias-Pulido et al., 2014). Επίσης, σε παλαιότερες μελέτες που έγιναν πάνω στο DNA της καρκινικής κυτταρικής σειράς CaSki βρέθηκαν συνεχόμενες αλληλουχίες του ιικού γονιδιώματος που περιείχαν τμήματα μη γειτονικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες αυτές αποτελούσαν συνδυασμό των γονιδίων E1 με L1 και E2 με L1 (Meissner 1999, Baker C.C. et al., 1987). Μια πιο πρόσφατη μελέτη, στην οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος της καρκινικής κυτταρικής σειράς CaSki περιέγραψε συνεχόμενες αλληλουχίες ιικού γονιδιώματος αποτελούμενες από μη γειτονικά γονίδια με ανεστραμμένο προσανατολισμό (Akagi et al., 2014). Ο τύπος αναδιάταξης των ιικών αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκε στην παρούσα εργασία βρέθηκε και σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς CaSki. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη ενδο-ικών αναδιατάξεων σε φυσιολογικές περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό πιστεύουμε πως οι ενδο-ικές αναδιατάξεις δημιουργούνται σε δείγματα που περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του HPV16 γονιδιώματος. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των ενδο-ικά αναδιαταγμένων αλληλουχιών σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας επιβεβαιώνει ότι οι αναδιατάξεις στο ιικό γονιδίωμα δημιουργούνται σε ένα πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης τραχηλικής κακοήθειας.

Στην παρούσα αναφορά, εξετάστηκαν 22 θετικά σε HPV16 τραχηλικά δείγματα με σκοπό την ταυτοποίηση αναδιαταγμένων ιικών αλληλουχιών. Οι αναδιατάξεις του γονιδιώματος του HPV16 ταυτοποιήθηκαν σε τέσσερα τραχηλικά δείγματα, ένα

υψηλού βαθμού δυσπλασίας και τρία χαμηλού βαθμού δυσπλασίας. Η χαμηλή συχνότητα αναδιατάξεων σε υψηλού βαθμού δυσπλασίας δείγματα ίσως οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν. Επίσης, καθώς δεν είχαμε στη διάθεσή μας καρκινικά δείγματα στην παρούσα εργασία απουσιάζει η εικόνα αναδιατάξεων του HPV16 σε περιπτώσεις καρκίνου. Κατά συνέπεια, πρέπει να εξεταστούν περισσότερα τραχηλικά δείγματα διαφόρων βαθμών τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας αλλά και καρκίνου του τραχήλου, προκειμένου να προσδιοριστεί η συχνότητα των αναφερόμενων αναδιαταγμένων ιικών αλληλουχιών.

Σε μια προηγούμενη μελέτη από τον Akagi ]και τους συνεργάτες του αναφέρθηκαν οι χασοτικές επιδράσεις της ενσωμάτωσης HPV16 στο χρωμόσωμα του ξενιστή. Επίσης τονίστηκε ο ρόλος που διαδραματίζουν στο σχεδιασμό αλυσόμερων (concatemers) ιού και κυτταρικού DNA η μεσολαβούμενη από HPV ενθέματα αντιγραφή του DNA και ο ανασυνδυασμός (Akagi et al., 2014). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, προτείνουμε ότι οι ταυτοποιημένες αναδιατάξεις του ιικού γονιδιώματος ίσως είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης συσσώρευσης της χρωμοσωμικής βλάβης, η οποία προήλθε από HPV16 ενθέσεις. Παραταύτα, ο ρόλος των αναδιατάξεων στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας παραμένει άγνωστος. Η σύνδεση δύο διακριτών ενθεμάτων HPV16 με ανεστραμένο προσανατολισμό ίσως υποδεικνύει την αναστροφή και διαγραφή γειτονικών χρωμοσωμικών τμημάτων του ξενιστή. Ως αποτέλεσμα, η ανίχνευση αυτών των ενδο-ϊκά αναδιαταγμένων αλληλουχιών του HPV θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση γενωμικής αστάθειας και βλαβών στο DNA κλινικών δειγμάτων. Παρ' όλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες τόσο για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, όσο και για να αναλυθεί ο αντίκτυπος αυτών των ενδο-ϊκών αναδιατάξεων στην ανάπτυξη του καρκίνου.

## **5 Συμπεράσματα**

---

Συμπερασματικά, αναγνωρίσαμε και επιβεβαιώσαμε τη σύνδεση μη σχετιζόμενων μεταξύ τους ιικών αλληλουχιών με ανεστραμμένο προσανατολισμό σε κλινικά δείγματα. Συνιστάται λοιπόν η χρήση της ανάλυσης των γονιδίων E1 και E2 σε συνδυασμό με την ταυτοποίηση της δομής των ενδο-ικά αναδιαταγμένων αλληλουχιών για μια πιο ακριβή ανάλυση της μορφής στην οποία βρίσκεται το γονιδίωμα του HPV16 σε κάθε ασθενή. Τέλος, η ανίχνευση αναδιατάξεων του HPV16 σε κλινικά δείγματα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την παρουσία βλαβών του χρωμοσώματος και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο για την εξέλιξη τραχηλικών κακοηθειών.

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML (2014) Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *24(2):185-199*

Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol 44(5):1755-1762*

Baker C.C., Phelps W.C., Lindgren V., Braun M.J., Gonda M.A., Howley P.M., Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines, *J. Virol. 61 (1987) 962e991*

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J 60(6):1445-1456*

Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology 445(1-2):35-56*

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology 401(1):70-79*

Boulet G, Horvath C, VandenBroeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol 39(11):2006-2011*

Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology 445(1-2):169-174*

Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology 445(1-2):224-231*

Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods 53:25-36*

DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology 445(1-2):99-114*

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zurHausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology 324:17-27*

de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses, *Virology 445(1-2):2-10*

Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology 32S (2005) S7–S15*

Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science 110, (525–541)*

- Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445(1-2):80-98
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55-70
- Howley PM, Lowy DR. 2007. Papillomaviruses. In: Knipe. DM, Howley PM, eds. *Field's Virology*, Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, :1662–1703
- Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl AcadSci USA* 106(48):20458-20463
- McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 72:155-205
- McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445(1-2):57-79
- Meissner J., Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines, *J. Gen. Virol.* 80 (1999) 1725e1733.
- Sarkar G., Turner R.T., Bolander M.E., Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers, *PCR Methods Appl.* 2 (1993) 318e322
- Sathish N. Wang X. Yuan Y. (2014) Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *JDR Clinical Research Supplementz* vol.93 suppl. 1, issue 7:29S-36S
- Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *GynecolOncol* 118(1 Suppl):S12-S17
- Wang JW, Roden RB (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445(1-2):175-186
- Vande Pol SB, Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137
- Van Doorslaer K (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* 445(1-2):11-20
- Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M.S., Borzacchiello, G., 2011. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* 10, 140
- Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation
- zurHausen H (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account, *Virology* 384:260-265

Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Durst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. PLoS One 8(6):e66693