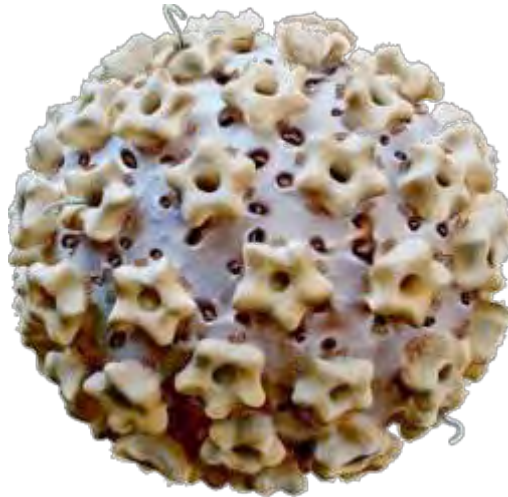


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**“Συχνότητα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στο
ουροποιογεννητικό σύστημα υγιών ανδρών αναπαραγωγικής
ηλικίας”**



Μάστορα Κ. Ειρήνη

2016

**“Συχνότητα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στο
ουροποιογεννητικό σύστημα υγιών ανδρών αναπαραγωγικής
ηλικίας”**

“Frequency of Human Papilloma Virus (HPV) in the urinary and reproductive tract of healthy men”

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Πετεινάκη Ευθυμία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη

Σίμος Γεώργιος

Καθηγητής Βιοχημείας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γερμενής Αναστάσιος

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

1.4.7. Ποσοτική ή Πραγματικού Χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

2. Υλικά και Μέθοδοι

3. Αποτελέσματα

4. Συζήτηση

5. Αναφορές

Πρόλογος

Η μόλυνση του γεννητικού συστήματος των γυναικών και των ανδρών από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων αφορά ένα από τα πλέον κοινά σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα ιογενούς αιτιολογίας παγκοσμίως, με ποσοστά που ποικίλουν σε διαφορετικές χώρες και πληθυσμιακές ομάδες. Ο καρκίνος στο ουροποιογεννητικό σύστημα είναι εξαιρετικά συχνός τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες. Ένας αριθμός κλινικών, επιδημιολογικών, μοριακών και πειραματικών στοιχείων απέδειξε την αιτιολογική σχέση μεταξύ ορισμένων σεξουαλικά μεταδιδόμενων υπότυπων HPV και των νεοπλασιών του γεννητικού συστήματος. Η συσχέτιση αφορά κυρίως τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες και τον καρκίνο του στοματοφάρυγγα στους άνδρες.

Με βάση τη συχνότητα ανίχνευσης των υπότυπων HPV από διάφορους βαθμούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN Βαθμοί I-III), οι ιοί HPV υποδιαιρούνται σε υψηλού κινδύνου υπότυπους (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) και σε χαμηλού κινδύνου υπότυπους (6, 11, 42-44). Τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων (πρακτικά γνωστά ως οξυτενή κονδυλώματα) συνδέονται με δύο υπότυπους HPV, τους HPV 6 και HPV 11.

Είναι πια γνωστό πως σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων γεννητικού καρκινώματος προκαλείται από μόλυνση με συγκεκριμένους υπότυπους του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, υποδηλώνοντας ότι η ορθή τυποποίηση των ιών υψηλού κινδύνου είναι πολύτιμη στο πλαίσιο της πρόγνωσης της κακοήθειας.

Ο πιο αξιόπιστος τρόπος χαρακτηρισμού των στελεχών του ιού στηρίζεται στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση και τυποποίηση των γεννητικών HPV σε κλινικά δείγματα, όπως τραχηλικά, κολπικά επιχρίσματα, ουρηθρικά εκκρίματα, τραχηλικά, κολπικά εκπλύματα, σπέρμα και βιοψίες.

Ακόμη, η εύρεση των συγκεκριμένων υπότυπων HPV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της προφύλαξης, μετά την εισαγωγή του προγράμματος εμβολιασμού έναντι του ιού HPV και στη χώρα μας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει εάν ο ασυμπτωματικός πληθυσμός είναι εκτεθειμένος στον ιό HPV καθώς και να συγκεκριμενοποιήσει τους υπότυπους χαμηλού και υψηλού κινδύνου που εντοπίζονται σε Έλληνες άνδρες, ώστε να εκτιμηθεί η σκοπιμότητα εμβολιαστικής κάλυψης του ανδρικού πληθυσμού έναντι του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής, για την επίβλεψη της

μεταπτυχιακής 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 δασκάλας με αξιοπρέπεια, ήθος και ευγένεια.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Σίμο, Καθηγητή Βιοχημείας και τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας, μα και για την προθυμία τους να με καθοδηγήσουν σε οποιοδήποτε επίπεδο.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στη διδάκτορα Ζωή Φλώρου, για τις επιστημονικές υποδείξεις, τις συστάσεις και την πολύτιμη βοήθειά της και ένα ακόμη στις υποψήφιες διδάκτορες Ειρήνη Σεβδαλή και Γερασιμίνα Τσιντή για τη συνεργασία και τη συνολική στήριξή τους.

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...

Περίληψη

Η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων μελετήθηκε συνολικά σε 57 ουρηθρικά δείγματα υγιών ασυμπτωματικών ανδρών αναπαραγωγικής ηλικίας, από την περιοχή της Αθήνας, κατά τη διετία 2015-2016. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των ιών HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο Real Time PCR. Το ποσοστό εύρεσης των υπότυπων χαμηλού κινδύνου ήταν 7% (HPV 6 3,5% και HPV 11 3,5%), ενώ το ποσοστό εύρεσης των υπότυπων υψηλού κινδύνου ήταν 12,3% (HPV 16 0%, HPV 18 0%, HPV 31 5,3%, HPV 33 5,3%, HPV 35 0%, HPV 39 0%, HPV 45 0%, HPV 51 0%, HPV 52 1,7%, HPV 56 0%, HPV 58 0%, HPV 59 0%) και αφορούσε αποκλειστικά τους υπότυπους HPV 31, HPV 33 και HPV 52, καθώς οι υπότυποι HPV 16, HPV 18, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 56, HPV 58 και HPV 59 δεν εντοπίστηκαν σε κανένα δείγμα. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη παρουσία περισσότερου του ενός υπότυπου. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδεικνύουν ότι ο ιός συναντάται συνολικά σε ποσοστό 19,3% στον ελληνικό ανδρικό πληθυσμό, παρότι δεν προκαλεί κλινική εκδήλωση.

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**).

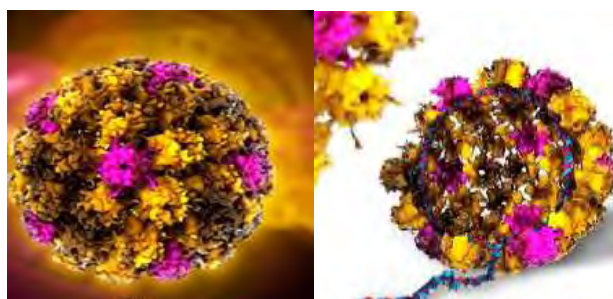
Οι συγκεκριμένοι ιοί ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μεταδίδονταν μεταξύ ατόμων μέσω ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous συσχέτισε τους ιούς Papilloma με τον καρκίνο του δέρματος, καθώς παρατήρησε πως κάποια μολυσμένα κουνέλια 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 HPVs (**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 HPVs βάσει του τροπισμού τους διαχωρίζονται σε δερματικούς ιούς και σε ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί τύποι HPVs 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).



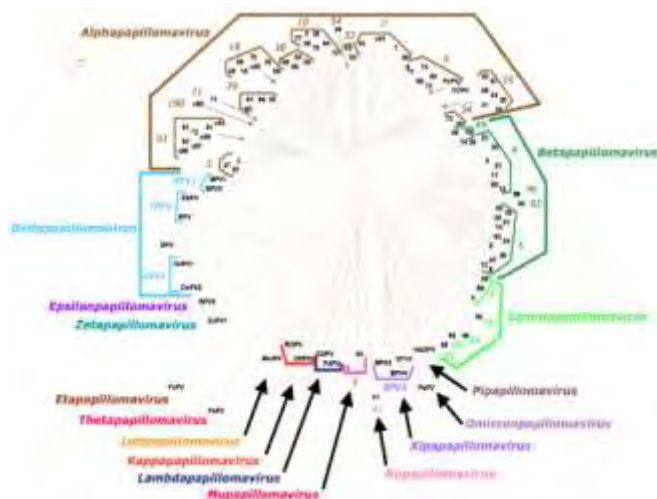
1.2. Ταξινόμηση των Human Papilloma Viruses (HPVs)

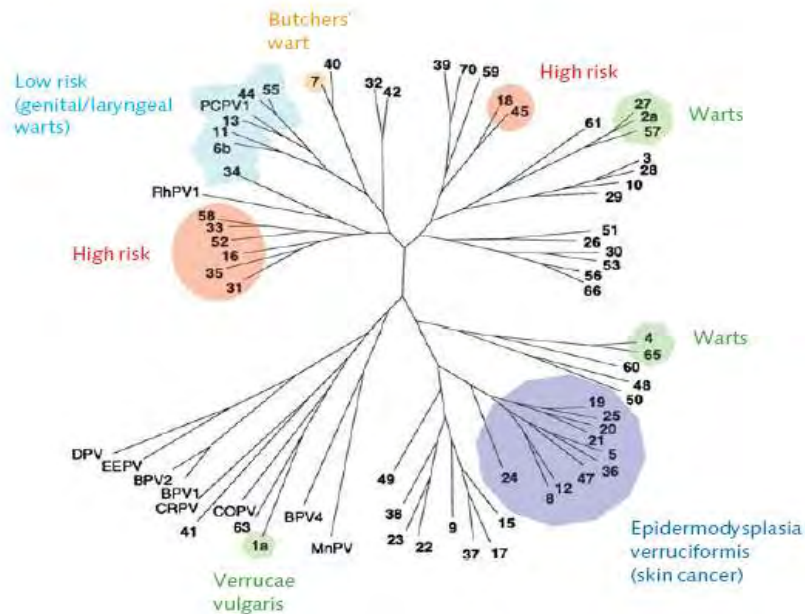
Οι Papillomaviruses ταξινομήθηκαν πρωτίστως μαζί με τους Polyomaviruses και τον SV 40 στην οικογένεια των Papovaviridae. Αυτή η ομαδοποίηση βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην ομοιότητα του καψιδίου τους, στην έλλειψη περιβλήματος καθώς και στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA (Danos et al., 1989). Μεταγενέστερα 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 γενομάτων (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, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus, Χipapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Ρipapillomavirus). 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, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus περιέχουν στελέχη των Papilloma ιών που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, ενώ τα γένη Deltapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Zetapapillomavirus, Etapapillomavirus, Thetapapillomavirus, Iotapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Χipapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Ρipapillomavirus 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, Muρapillomavirus και Nυρapillomavirus 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 HPVs. 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)

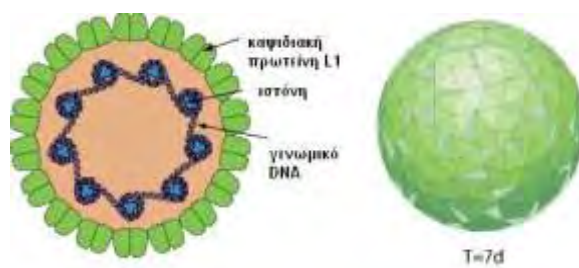
1.3.1. Δομή του καψιδίου

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 μίας 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 γένωμα 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).



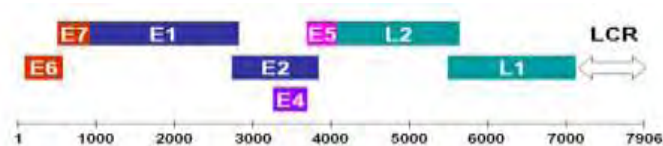
1.3.2. Οργάνωση του γενώματος

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).

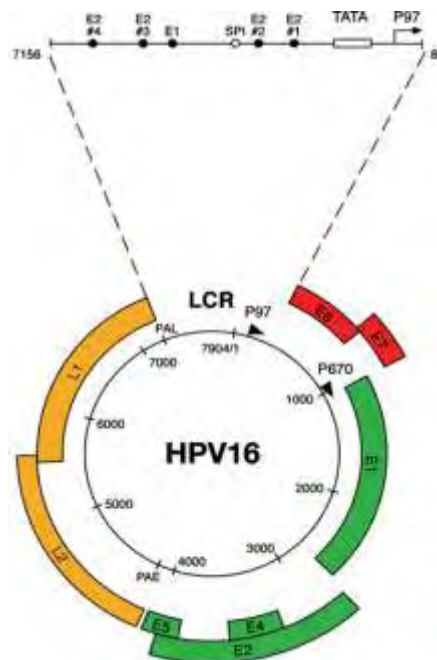
Το γένωμα των ιών Papilloma διαχωρίζεται βάσει των λειτουργικών του δραστηριοτήτων σε τρεις τομείς, την πρώιμη περιοχή (E, early region), την όψιμη περιοχή (L, late region) και τη ρυθμιστική περιοχή (LCR, long control region). Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, 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

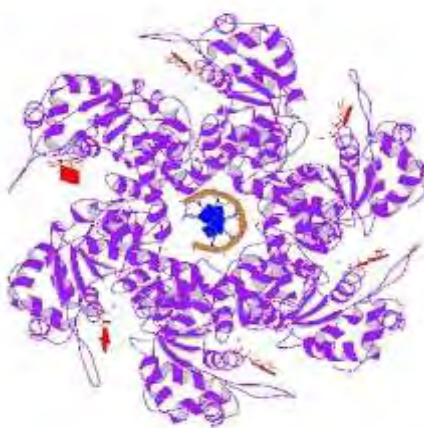
Η ιική πρωτεΐνη E1 αποτελεί μία πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης και μέγεθος 70-80 kDa. Η παρουσία της είναι απαραίτητη

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).

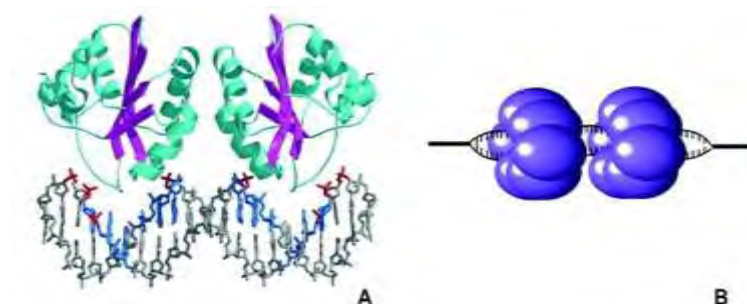
Η πρωτεΐνη E1 προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, ενώ διαθέτει δραστηριότητα ελικάσης και ΑΤΡάσης. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E2 και τη μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α . Η δραστηριότητα της ΑΤΡάσης τοποθετείται στη C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό 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 α 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 ξετυλίγει 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.



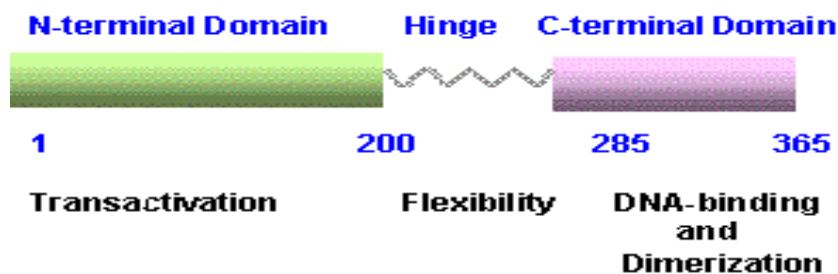
1.3.2.2. Ιική πρωτεΐνη E2

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**).

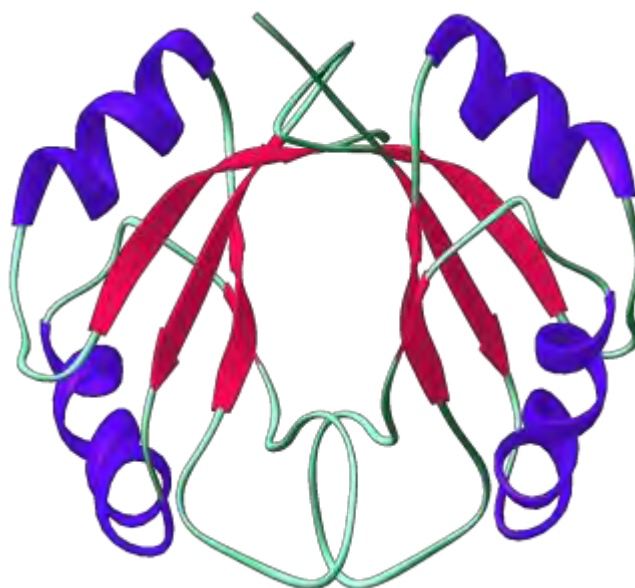
Η πρωτεΐνη E2 συνδέεται σε ειδικές θέσεις στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Επιπλέον, επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (**Cripe et al., 1987**). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (**Bouvard 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 ικής πρωτεΐνης E2 και παρουσίαση των τριών βασικών περιοχών και των λειτουργιών της.



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



II	#	$\Gamma_1 \wedge \Gamma_2$	$\text{LIPV}_1 \leq S$	13	λ	μ	ν	N
----	---	----------------------------	------------------------	----	-----------	-------	-------	---

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 (Nordine 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).

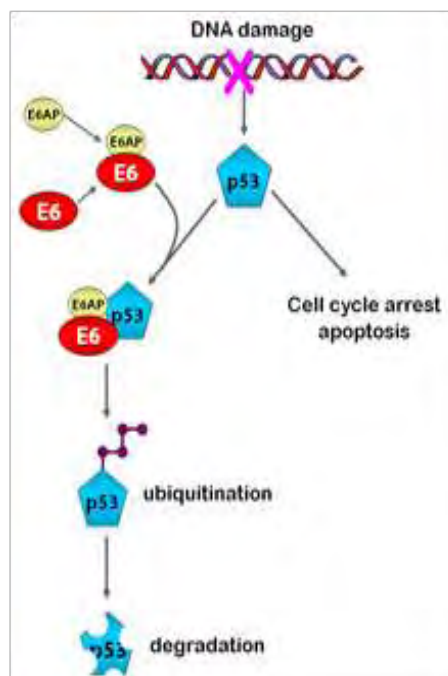
Ένας ακόμη ρόλος της πρωτεΐνης E6 αφορά την αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποδομούνται μέσω της σύνδεσής τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPVs υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας (Nguyen et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

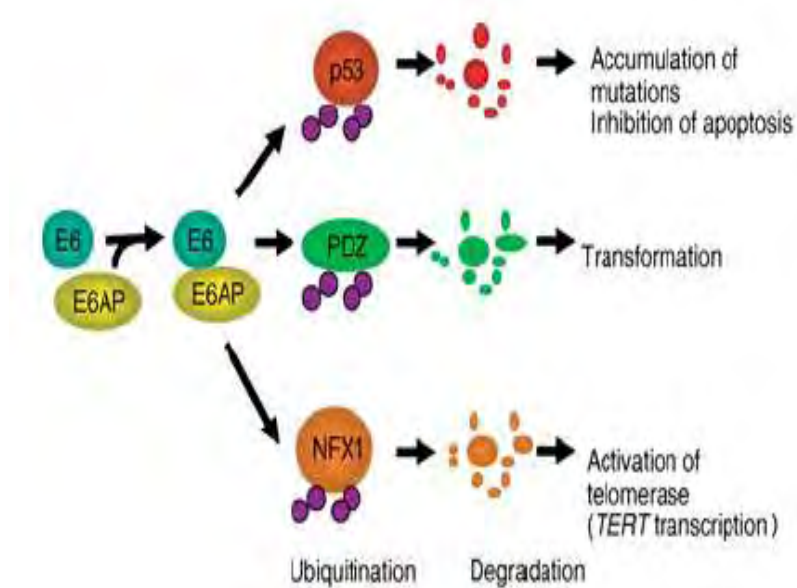
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6. Η αλληλουχία περιλαμβάνει δύο μοτίβα σύνδεσης ιόντων ψευδαργύρου, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα μοτίβο σύνδεσης πρωτεΐνης PDZ.



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**).

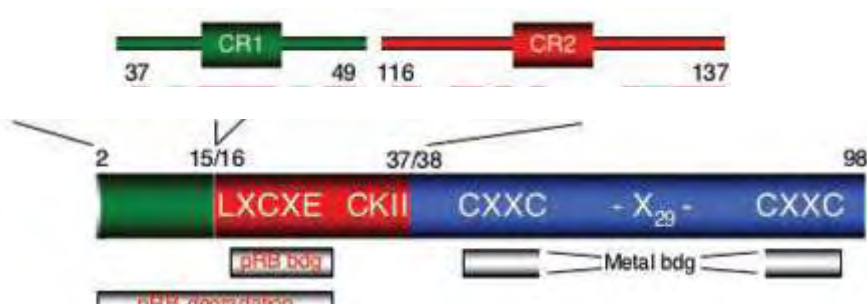
Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) (**Roman et al., 2006, Barrow et al., 2010**). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p107 και p130 (**Dyson et al., 1989**). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου 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**).

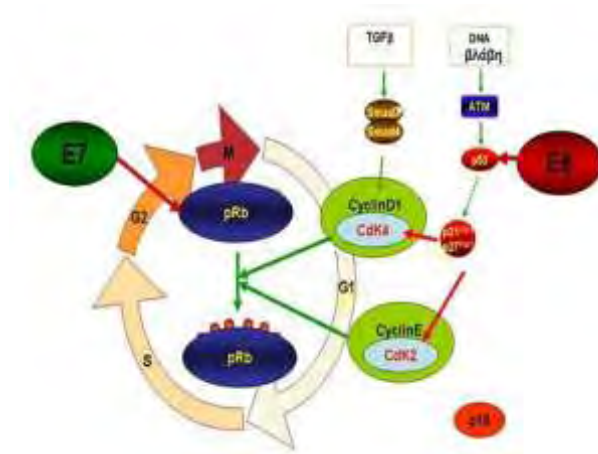
Η E7 αλληλεπιδρά με μία ακόμη ομάδα πρωτεϊνών, τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές E2F. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακετυλομάδων από τις ιστόνες, 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 ιικών 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 ιική 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 συνάνθροιση 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

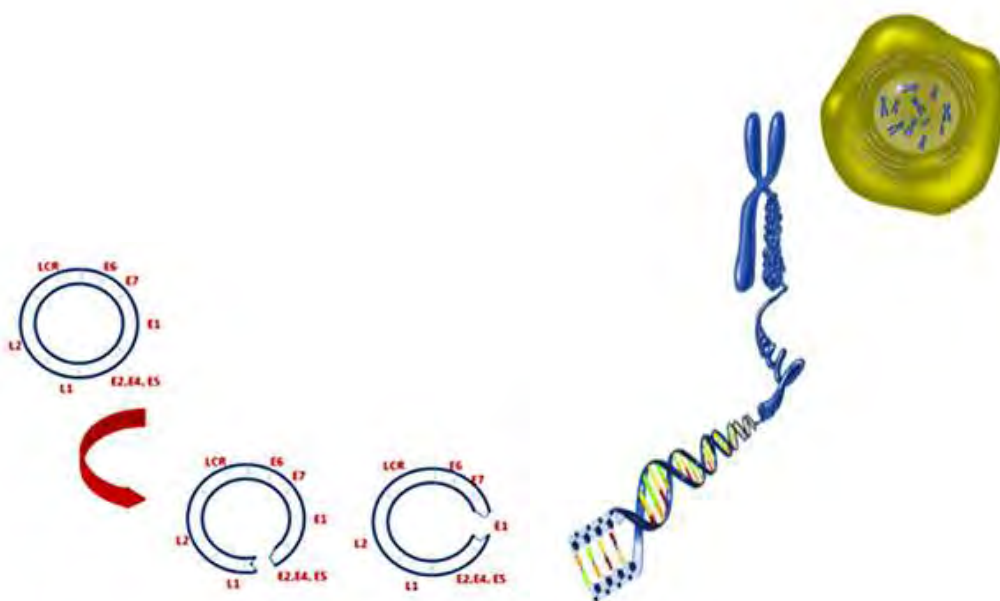
Το γένωμα του ιού εντοπίζεται υπό μορφή επισώματος, ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Σε μολυσμένα κύτταρα, στα οποία ο ιός έχει ήδη εγκατασταθεί, διατηρεί το γένωμα του υπό μορφή πλασμιδίου. Το γένωμα του ιού αντιγράφεται με συχνότητα μία φορά ανά κυτταρικό 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 HPVς 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 μεταγγραφα 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.



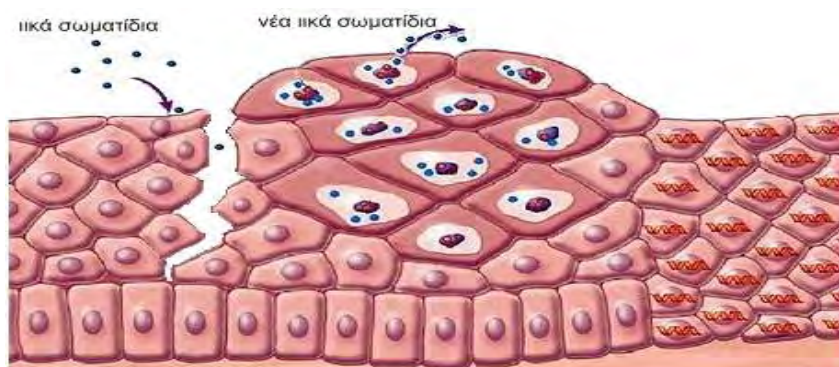
1.4. Κύκλος ζωής των Human Papilloma Viruses (HPVs)

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 (Shafiti 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 καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (Day et al., 2004, Schelhaas et al., 2012).

Εικόνα 17: Είσοδος του ιού στο κύτταρο.

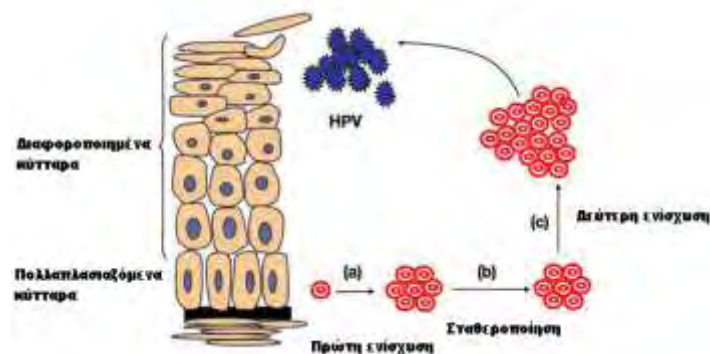


1.4.2. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

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.

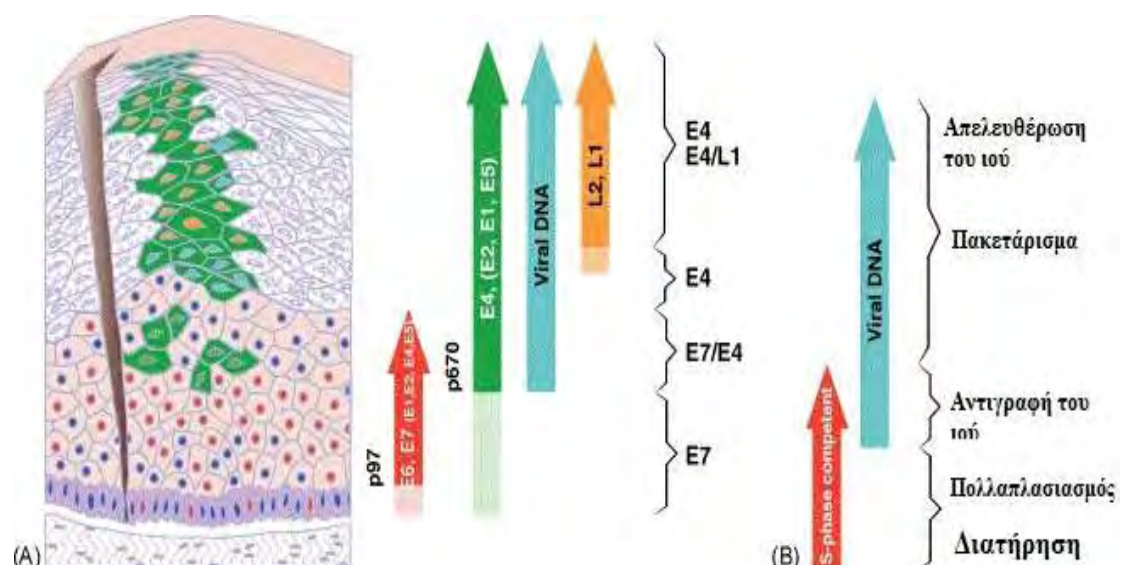


1.4.3. Μεταγραφή του ιικού γενώματος

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.



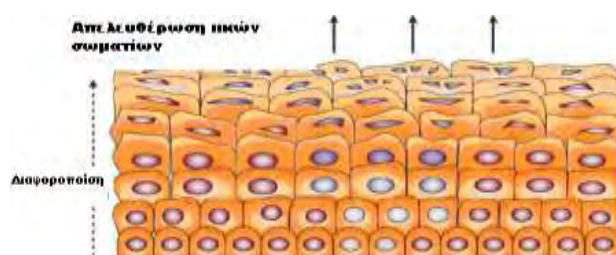
1.4.4. Σύνθεση του ιικού γενώματος

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⁺E4. Η πρωτεΐνη καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, αποδεσμεύοντας και απελευθερώνοντας έτσι τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια από το κύτταρο (Roberts et al., 1997).

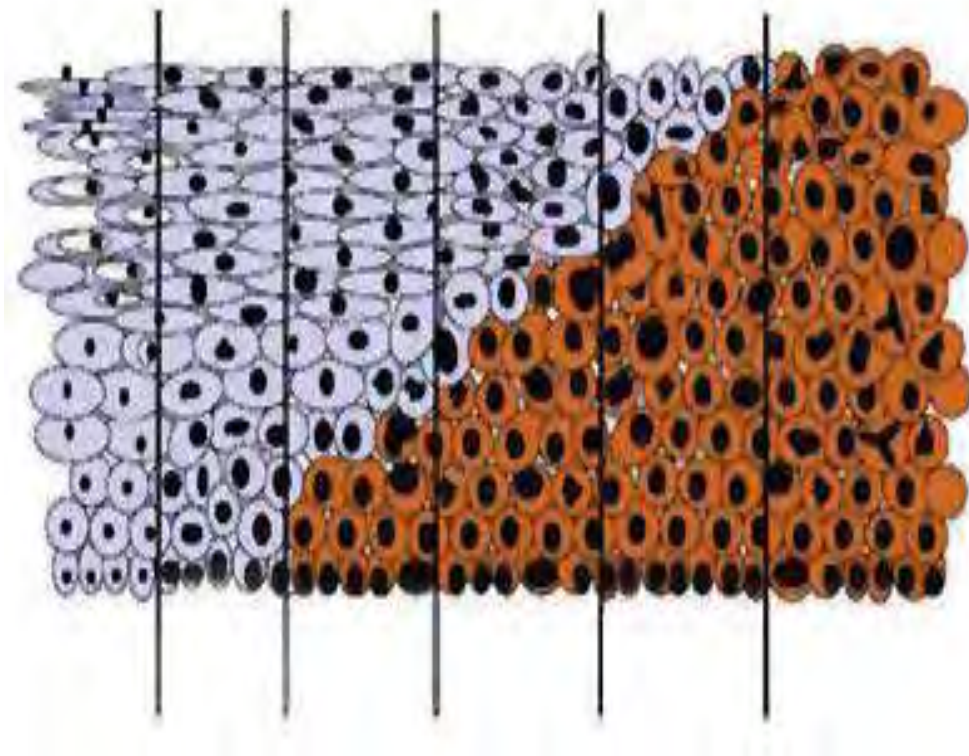
Εικόνα 20: Έξοδος του ιού από το κύτταρο.



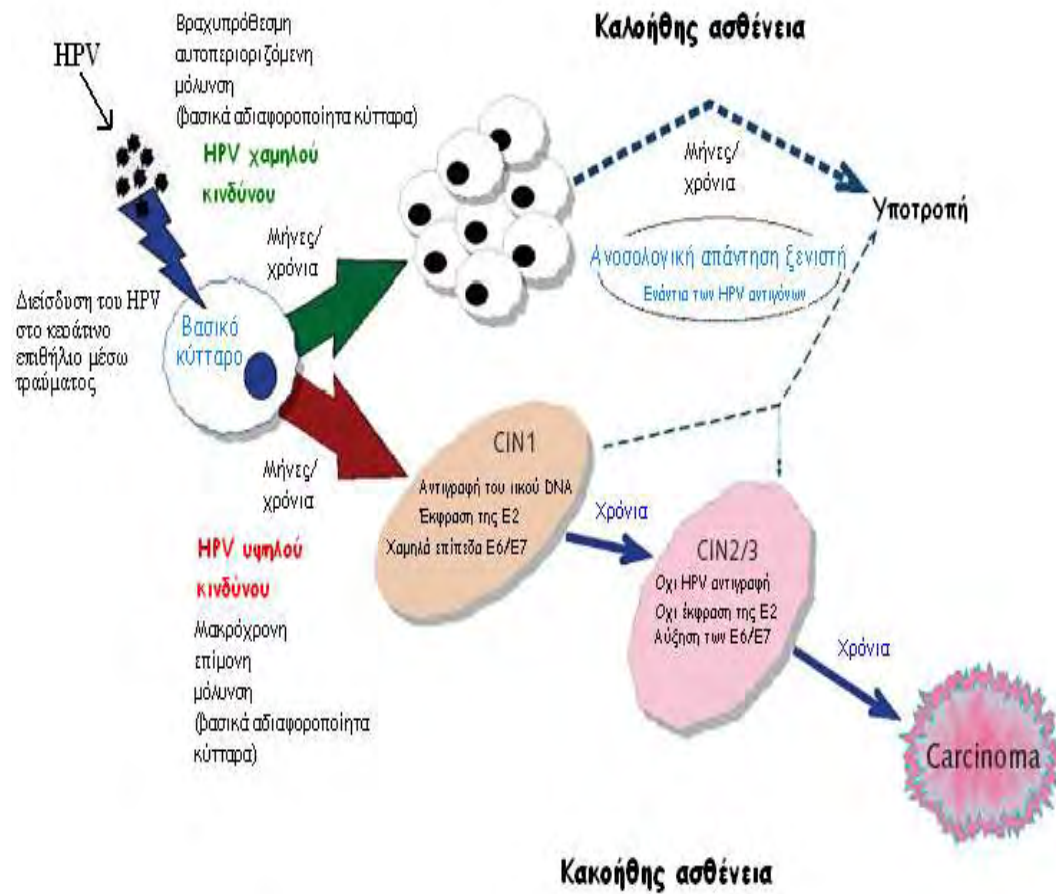
1.4.6. Ιστολογικές αλλοιώσεις

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 HPVs.



1.4.7. Ποσοτική ή Πραγματικού Χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η τεχνική Real Time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του και αναφέρεται στην ενίσχυση του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η οποία ελέγχεται ενώ εξελίσσεται. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να καθορίζει το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση με PCR. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της γίνεται ολοένα και πιο ευρεία, εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού θερμοκυκλοποιητών Real Time PCR στην αγορά και της επακόλουθης πτώσης του κόστους τους όπως επίσης και των τιμών των αντιδραστηρίων.

Η Real Time PCR ή PCR σε πραγματικό χρόνο αποτελεί λοιπόν μία ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, καθώς το προϊόν που παράγεται συνδέεται με μία φθορίζουσα χρωστική ουσία, η οποία ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή της Real Time PCR. Μέσω του συγκεκριμένου οργάνου, καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού, που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι, καθίσταται δυνατή η επακριβής μέτρησή του. Η Real Time PCR μετρά τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετρά σε πραγματικό χρόνο το ποσό των προϊόντων PCR σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει το σημείο στο οποίο μπορούν να συγκριθούν όλα τα δείγματα συνολικά. Το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υποβάθρου της φθορίζουσας χρωστικής. Τελικά, ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται ώστε να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής ικανό να φθάσει σε αυτό το κατώφλι, χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές του Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και αποτελούν τη βάση για τον υπολογισμό των αντιγράφων DNA ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού αποτελεί στην ουσία τη συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως γραμμή βάσης ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος. Το συγκεκριμένο σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλίου. Το κατώφλι υπολογίζεται πολλαπλασιαζόμενο 10 φορές σε σχέση με την κανονική παρέκκλιση από το μέσο σήμα της χρωστικής της βασικής γραμμής. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κατωφλίου κύκλου (Ct) για

ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των κύκλων PCR, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια, οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος. Ο δεδομένος υπολογισμός χρησιμοποιείται κατά τη σχετική ποσοτική αναλυτική μέθοδο (**Ginzinger DG., Gene quantify cation using real-time quantification PCR: An emerging technology hits the mainstream, Experimental Hematology, 2002**).

Με τη Real Time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, διεξάγεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι ενισχυμένες αλληλουχίες χαρακτηρίζονται με βάση το σημείο τήξης τους (T_m). Το σημείο τήξης αποτελεί συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος, είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό γι' αυτή (**Wilhelm J., Pingoud A., Real-Time Polymerase Chain Reaction, ChemBioChem, 2003**).

Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη μεθοδολογία της Real Time PCR, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων. Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων. Καθένας διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά, με τη βασική στρατηγική να παραμένει κοινή και απλή για όλους και να αφορά στην ουσία την πρόκληση μιας ανιχνεύσιμης αλλαγής κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα, οι πιο κοινές χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη Real Time PCR αφορούν: α) τη SYBR green I χρωστική, β) τους ανιχνευτές υδρόλυσης και γ) τους ανιχνευτές υβριδοποίησης (**van der Velden VH. et al., Leukemia, 2003**).

Η τεχνική, στην οποία το προϊόν PCR ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που συνδέονται στο δίκλωνο DNA, αποτελεί την απλούστερη μέθοδο. Η SYBR green I είναι μία τέτοιου είδους χρωστική παραγωγής σήματος φθορισμού. Η ένταση είναι ανάλογη του ποσού του DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Επομένως, η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR μεγαλώνει καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό, παρέχει μία απλή και αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της Real Time PCR. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χρήση μη τροποποιημένων εκκινητών, η οποία διευκολύνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση εκκινητών με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους Real Time PCR. Ακόμη, η SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του κατέχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) δύναται επομένως να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό στοιχείο. Επιβάλλεται ωστόσο η αναπαραγωγή του πειράματος να πραγματοποιηθεί υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες, καθώς οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης (T_m) επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου, του DMSO, του δείγματος DNA και της SYBR green I, μα και από το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης. Κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I

αποτελεί η σύνδεσή της και στα μη ειδικά προϊόντα, καθιστώντας αναγκαία τη σαφή διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

Η χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών στη Real Time PCR οδηγεί στην επίτευξη μεγαλύτερης ειδικότητας. Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο αποσβέστη, ενώ υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Οι μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι: οι taqman probes, molecular beacons και scorpion primers. Συνηθέστερη τεχνική χρήσης αποτελούν οι ανιχνευτές taqman. Η δεδομένη μεθοδολογία χρησιμοποιεί την 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία προσκολλάται στο διπλά μαρκαρισμένο ανιχνευτή αποσπώντας το 5' άκρο του. Ο ανιχνευτής taqman σχεδιάζεται ώστε να υβριδίζεται στο πρότυπο DNA μεταξύ των εκκινήτων. Όταν είναι υβριδισμένος δε φθορίζει, διότι τα δύο μόρια στα άκρα του, δότης στο 5' άκρο και αποσβέστης στο 3' άκρο, βρίσκονται κοντά. Αντίθετα, όταν το μόριο δότης απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR από το μόριο αποσβέστης, φθορίζει έντονα. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος της PCR.

Η εφαρμογή της Real Time PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στην ποιότητα του δείγματος, στο χειρισμό του οργάνου, στην επιλογή της χημικής μεθόδου, στα αντιδραστήρια (Taq πολυμεράση) και στην αντικειμενικότητα ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Τα προτερήματα της Real Time PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι πολυπληθή. Το πλέον σημαντικό ίσως αναφέρεται στη δυνατότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτα δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση λιγότερων από πέντε αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Πλεονεκτήματα αποτελούν επίσης ο μικρός απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα λόγω αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Στις ιδιαίτερα θετικές προεκτάσεις συγκαταλέγεται και η αποφυγή ή ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων, με δεδομένη την εκτέλεση της αντίδρασης σε ένα υψηλής τεχνολογίας κλειστό σύστημα, χωρίς την απαίτηση εξωτερικών χειρισμών ανάλυσης του προϊόντος.

Η Real Time PCR εφαρμόζεται τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές με σημαντική αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA δημιούργησε νέες προοπτικές για ποικίλες εφαρμογές, όπως ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών, μέτρηση της έκφρασης γονιδίων, επαλήθευση του πολλαπλασιασμού γονιδίων, εκτίμηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικής αγωγής, ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA, ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και προσδιορισμό γονότυπου.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Κλινικά δείγματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 57 υγιείς άνδρες αναπαραγωγικής ηλικίας, 18 έως 40 ετών, κάτοικοι της περιοχής της Αθήνας. Χαρακτηρίστηκαν ασυμπτωματικοί λόγω της απουσίας οποιασδήποτε συμπτωματολογίας προερχόμενης από το ουροποιογεννητικό σύστημα. Οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν λεπτομερώς για το πρωτόκολλο της έρευνας, έδωσαν γραπτώς τη συγκατάθεσή τους και κατόπιν συμπλήρωσαν συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο, το οποίο περιλάμβανε δημογραφικά στοιχεία, καθώς και πληροφορίες σχετικές με την οικογενειακή κατάσταση, το επίπεδο εκπαίδευσης, τον αριθμό σεξουαλικών συντρόφων, το αλκοόλ, το κάπνισμα.

Τα κλινικά δείγματα αφορούσαν ουρηθρικά επιχρίσματα, τα οποία ελήφθησαν μέσω στυλεού, με ήπιες συστροφικές κινήσεις σε βάθος ενός εκατοστού από το στόμιο της ουρήθρας, ενώ ακολούθως τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο με μέσο μεταφοράς (Deltalab). Συλλέχθηκαν στη διάρκεια της χρονικής περιόδου 2015-2016 και συγκεκριμένα 30 από αυτά το έτος 2015 και 27 το έτος 2016.

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

Κλινικό δείγμα	Έτος συλλογής	Υλικό μέσο συλλογής	Κλινική εικόνα
1	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
2	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
3	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
4	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
5	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
6	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
7	2015	Στυλεός	Φυσιολογική

8	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
9	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
10	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
11	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
12	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
13	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
14	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
15	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
16	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
17	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
18	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
19	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
20	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
21	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
22	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
23	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
24	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
25	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
26	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
27	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
28	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
29	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
30	2015	Στυλεός	Φυσιολογική
31	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
32	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
33	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
34	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
35	2016	Στυλεός	Φυσιολογική

36	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
37	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
38	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
39	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
40	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
41	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
42	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
43	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
44	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
45	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
46	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
47	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
48	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
49	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
50	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
51	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
52	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
53	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
54	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
55	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
56	2016	Στυλεός	Φυσιολογική
57	2016	Στυλεός	Φυσιολογική

Εξαγωγή γενετικού υλικού

Στη διαδικασία εξαγωγής του γενετικού υλικού από τα κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η εμπορική συσκευασία Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research).

Συγκεκριμένα, ο στυλεός τοποθετήθηκε σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης. Στο σωληνάριο προστέθηκαν 500 μl γενωμικού ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, αναδεύτηκε για 4-6 δευτερόλεπτα και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε μια στήλη φυγοκέντρωσης σε ένα σωληνάριο συλλογής. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε 11,900 rpm για 1 λεπτό και το σωληνάριο απορρίφθηκε.

Η στήλη φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής. Στη στήλη προστέθηκαν 200 μl DNA ρυθμιστικού διαλύματος πρόπλυσης και φυγοκεντρήθηκε σε 11,900 rpm για 1 λεπτό. Ακόμη, στη στήλη προστέθηκαν 500 μl g-DNA ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και φυγοκεντρήθηκε σε 11,900 rpm για 1 λεπτό.

Η στήλη φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης. Στη στήλη προστέθηκαν ≥ 50 μl DNA ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης, επώασθηκε για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα.

Το εκλουθέν DNA χρησιμοποιήθηκε αμέσως ή αποθηκεύθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Ανίχνευση και τυποποίηση ιού

Για την ανίχνευση και τυποποίηση των ιών χαμηλού κινδύνου 6 και 11 και των ιών υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 και 59 των ανθρώπινων θηλωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές συσκευασίες HPV 6/11 Real-TM (Sacace Biotechnologies) και HPV High Risk Typing Real-TM (Sacace Biotechnologies) αντίστοιχα.

Οι υπότυποι HPV προσδιορίστηκαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο της Real Time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου).

Χαμηλού κινδύνου υπότυποι HPV 6,11

Η περιοχή στόχος της ανάλυσης είναι το γονίδιο L1 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Αρχή δοκιμής

Η εμπορική συσκευασία HPV 6/11 Real-TM βασίζεται σε δύο σημαντικές διαδικασίες: την απομόνωση του DNA από δείγματα και την ενίσχυση πραγματικού χρόνου.

Το σωληνάριο PCR-mix-1 περιέχει εκκινητές κατευθυνόμενους απέναντι σε περιοχές των υπότυπων HPV 6,11 και του γονιδίου β-σφαιρίνης που χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Αν το επίχρισμα δεν είναι σωστά προετοιμασμένο (υψηλή ποσότητα βλέννας ή ανεπαρκής ποσότητα επιθηλιακών κυττάρων) ο εσωτερικός μάρτυρας δεν ανιχνεύεται ή είναι χαμηλός (η ποσότητα των επιθηλιακών κυττάρων χαμηλότερη από 10^3 κύτταρα/αντίδραση).

Υλικά

PCR-mix-1-FRT, 0,6 ml

PCR-Buffer-FRT, 0,3 ml

TaqF Polymerase, 0,03 ml

Pos Control Complex C⁺ (HPV 6, 11 και ανθρώπινο DNA), 0,2 ml

Negative Control C⁻, 1,2 ml

Πρωτόκολλο

Προετοιμάζεται η απαιτούμενη ποσότητα σωληναρίων αντίδρασης για τα δείγματα (N) και τους μάρτυρες (N+2).

Προετοιμάζεται το μείγμα για 60 δείγματα: στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT προστίθενται 30 μl από την πολυμεράση TaqF DNA Polymerase. Το σωληνάριο ανακινείται προσεκτικά.

Προετοιμάζεται το μείγμα αντίδρασης για κάθε δείγμα: στο νέο στείρο σωληνάριο προστίθενται 10 μl από το μείγμα PCR-mix-1-FRT και 5 μl από το μείγμα PCR-buffer-FRT/TaqF DNA Polymerase.

Σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης προστίθενται 15 μl από το μείγμα αντίδρασης και 10 μl από το εκχυλισμένο DNA.

Στο επισημασμένο σωληνάριο amplification positive control προστίθενται 10 μl από το θετικό μάρτυρα Positive Control Complex C⁺.

Τα σωληνάρια εισάγονται στο θερμοκυκλοποιητή 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Ενίσχυση

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Επαναλήψεις
1	95	15 λεπτά	1
2	95	5 δευτερόλεπτα	5
	60	20 δευτερόλεπτα	
	72	15 δευτερόλεπτα	
3	95	5 δευτερόλεπτα	40
	60	30 δευτερόλεπτα ανίχνευση σημάτων φθορισμού	
	72	15 δευτερόλεπτα	

Ρυθμίσεις οργάνου

Η γραμμή ορίου πρέπει να διασχίζει μόνο σιγμοειδείς καμπύλες συσσώρευσης σήματος θετικών δειγμάτων και δεν πρέπει να διασχίζει τη γραμμή βάσης, διαφορετικά το επίπεδο ορίου πρέπει να αυξηθεί. Το όριο ρυθμίζεται σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού είναι γραμμικές και δε διασχίζουν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Ανάλυση δεδομένων

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με το λογισμικό του οργάνου Real Time PCR μέσω της παρουσίας της καμπύλης φθορισμού και της γραμμής ορίου. Ο HPV 6 εντοπίζεται στο FAM/πράσινο κανάλι, ο HPV 11 στο JOE/κίτρινο/HEX και το DNA IC στο Rox/πορτοκαλί κανάλι.

Το αποτέλεσμα θεωρείται έγκυρο, αν το σήμα είναι απών σε όλα τα κανάλια (FAM/πράσινο, JOE/κίτρινο, ROX/πορτοκαλί) για τους αρνητικούς μάρτυρες και

τα σήματα είναι παρόντα σε όλα τα κανάλια (FAM/πράσινο, JOE/κίτρινο, ROX/πορτοκαλί) για το θετικό μάρτυρα.

Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης DNA HPV θεωρείται αρνητικό, αν το σήμα φθορισμού είναι καταχωρημένο μόνο στο ROX/πορτοκαλί κανάλι και η τιμή του κύκλου ορίου δεν υπερβαίνει το 30 και θετικό, αν το σήμα είναι καταχωρημένο στο FAM/πράσινο κανάλι (θετικό για τον υπότυπο HPV 6) ή το σήμα είναι καταχωρημένο στο JOE/HEX/κίτρινο κανάλι (θετικό για τον υπότυπο HPV 11).

Το αποτέλεσμα θεωρείται μη έγκυρο, αν τα θετικά σήματα δεν είναι καταχωρημένα στα FAM/πράσινα και JOE/HEX/κίτρινα κανάλια (υπότυποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/πορτοκαλί) δεν είναι καταχωρημένο ή η τιμή του κύκλου ορίου υπερβαίνει το 30 και επισημασμένο, αν το σήμα είναι καταχωρημένο στα FAM/πράσινα και JOE/HEX/κίτρινα κανάλια (υπότυποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/πορτοκαλί) δεν είναι καταχωρημένο ή η τιμή του κύκλου ορίου υπερβαίνει το 30.

Αναλυτική ειδικότητα και αναλυτική ευαισθησία

Η ειδικότητα και η ευαισθησία της εμπορικής συσκευασίας HPV 6/11 Real-TM είναι 100%, με βάση τις μετρήσεις του κατασκευαστή. Αντίστοιχα, η εμπορική συσκευασία HPV 6/11 Real-TM επιτρέπει την ανίχνευση DNA του HPV 6 και 11 στο 100% των δειγμάτων με όριο τα 500 αντίγραφα/ml.

Υψηλού κινδύνου υπότυποι HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

Η περιοχή στόχος της ανάλυσης είναι το γονίδιο E7 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Αρχή δοκιμής

Η εμπορική συσκευασία HPV High Risk Typing Real-TM βασίζεται σε δύο σημαντικές διαδικασίες: την απομόνωση του DNA από δείγματα και την πολλαπλή ενίσχυση πραγματικού χρόνου 4 σωληναρίων για κάθε δείγμα.

Κάθε σωληνάριο περιέχει εκκινητές κατευθυνόμενους απέναντι σε περιοχές 3 υπότυπων HPV και του γονιδίου β-σφαιρίνης που χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Αν το επίχρισμα δεν είναι σωστά προετοιμασμένο (υψηλή ποσότητα βλέννας ή ανεπαρκής ποσότητα επιθηλιακών κυττάρων) ο εσωτερικός μάρτυρας δεν ανιχνεύεται.

Υλικά

PCR-mix-1 "16-18-31", 0,08 ml

PCR-mix-1 "39-45-59", 0,08 ml

PCR-mix-1 "33-35-56", 0,08 ml

PCR-mix-1 "51-52-58", 0,08 ml

PCR-buffer-FRT, 1,1 ml

Hot Start DNA Polymerase, 0,06 ml

Negative Control, 1,2 ml

HPV C⁺ "16-18-31", 0,06 ml (HPV DNA C⁺ 16, 18, 31 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ "39-45-59", 0,06 ml (HPV DNA C⁺ 39, 45, 59 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ "33-35-56", 0,06 ml (HPV DNA C⁺ 33, 35, 56 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ "51-52-58", 0,06 ml (HPV DNA C⁺ 51, 52, 58 και ανθρώπινο DNA)

Πρωτόκολλο

Προετοιμάζεται η απαιτούμενη ποσότητα σωληναρίων (0,1 ml).

Προετοιμάζεται το μείγμα για 54 δείγματα: στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT προστίθενται 60 μl από την πολυμεράση Hot Start DNA Polymerase. Το σωληνάριο ανακινείται προσεκτικά.

Σε καθένα από τα τέσσερα σωληνάρια μείγματος PCR-mix-1 προστίθενται 90 μl από το μείγμα.

Προετοιμάζεται για κάθε μείγμα PCR-mix-1 ένα νέο σωληνάριο και προστίθενται για κάθε δείγμα $3,5 * (N + 2)$ μl από το μείγμα PCR-mix-1 και $4,5 * (N + 2)$ από το μείγμα (ρυθμιστικό διάλυμα PCR-mix-2 buffer με πολυμεράση Hot Start DNA Polymerase).

Σε κάθε σωληνάριο (0,1 ml) προστίθενται 8 μl από το μείγμα αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια και τα δείγματα μοιράζονται: στην πρώτη γραμμή των σωληναρίων προστίθενται 8 μl από το μείγμα "16,18,31", στη δεύτερη γραμμή 8 μl από το μείγμα "39,45,59", στην τρίτη 8 μl από το μείγμα "33,35,56", στην τέταρτη 8 μl από το μείγμα "51,52,58".

Στο κατάλληλο σωληνάριο προστίθενται 5 μl από το δείγμα εκχυλισμένου DNA.

Στα σωληνάρια προστίθενται 5 μl από τους θετικούς μάρτυρες Positive Controls C⁺.

Τα σωληνάρια εισάγονται στο θερμοκυκλοποιητή 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Ενίσχυση

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Επαναλήψεις
1	95	15 λεπτά	1
2	95	5 δευτερόλεπτα	5
	60	20 δευτερόλεπτα	
	72	15 δευτερόλεπτα	
3	95	5 δευτερόλεπτα	40
	60	30 δευτερόλεπτα ανίχνευση σημάτων φθορισμού*	
	72	15 δευτερόλεπτα	

*ανίχνευση σε Fam (πράσινο), Joe (κίτρινο)/Hex, Rox (πορτοκαλί) και Cy5 (κόκκινο)

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Ανίχνευση Φθορισμού	Επαναλήψεις
Τμήμα 1	95	15 λεπτά	-	1
Τμήμα 2	95	20 δευτερόλεπτα	-	45
	60	60 δευτερόλεπτα*	Cy5, FAM, HEX, ROX	

*ανίχνευση σε Fam, Joe/Hex, Rox και Cy5

Ρυθμίσεις οργάνου

Η γραμμή ορίου πρέπει να διασχίζει μόνο σιγμοειδείς καμπύλες συσσώρευσης σήματος θετικών δειγμάτων και δεν πρέπει να διασχίζει τη γραμμή βάσης, διαφορετικά το επίπεδο ορίου πρέπει να αυξηθεί. Το όριο ρυθμίζεται σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού είναι γραμμικές και δε διασχίζουν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Ανάλυση δεδομένων

Το πείραμα θεωρείται έγκυρο, εάν οι αρνητικοί μάρτυρες ενίσχυσης δεν έχουν κανένα θετικό σήμα φθορισμού και σε κάθε έναν από τους θετικούς μάρτυρες προσδιορίζονται 3 υπότυποι HPV.

Το αποτέλεσμα του δείγματος θεωρείται μη έγκυρο, σε περίπτωση απουσίας οποιουδήποτε σήματος φθορισμού (θετικού ή εσωτερικού). Το δείγμα είναι επίσης μη έγκυρο αν το IC είναι θετικό με Ct>30.

Το δείγμα είναι αρνητικό, αν όλα τα σωληνάρια περιέχουν μόνο το θετικό σήμα στο Cy5 (κόκκινο) κανάλι και θετικό, αν περιέχει το θετικό σήμα στο Fam (πράσινο) ή Joe (κίτρινο) ή Rox (πορτοκαλί) κανάλι ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα του καναλιού Cy5 (κόκκινο).

Αναλυτική ειδικότητα και αναλυτική ευαισθησία

Η ειδικότητα και η ευαισθησία της εμπορικής συσκευασίας HPV High Risk Typing Real-TM είναι 100%, με βάση τις μετρήσεις του κατασκευαστή. Αντίστοιχα, η εμπορική συσκευασία HPV High Risk Typing Real-TM επιτρέπει την ανίχνευση DNA του Human Papillomavirus στο 100% των δειγμάτων με όριο τα 1000 αντίγραφα/ml.

3. Αποτελέσματα

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 11 από τους 57 υγιείς άνδρες σε ποσοστό 19,3%.

Το ποσοστό για τους υπότυπους χαμηλού κινδύνου ήταν 7% και συγκεκριμένα για τον HPV 6 3,5% και για τον HPV 11 3,5%.

Το ποσοστό για τους υπότυπους υψηλού κινδύνου ήταν 12,3% και συγκεκριμένα για τον HPV 16 0%, για τον HPV 18 0%, για τον HPV 31 5,3%, για τον HPV 39 0%, για τον HPV 45 0%, για τον HPV 59 0%, για τον HPV 33 5,3%, για τον HPV 35 0%, για τον HPV 56 0%, για τον HPV 51 0%, για τον HPV 52 1,7% και για τον HPV 58 0%.

Σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη παρουσία περισσότερου του ενός υπότυπου.

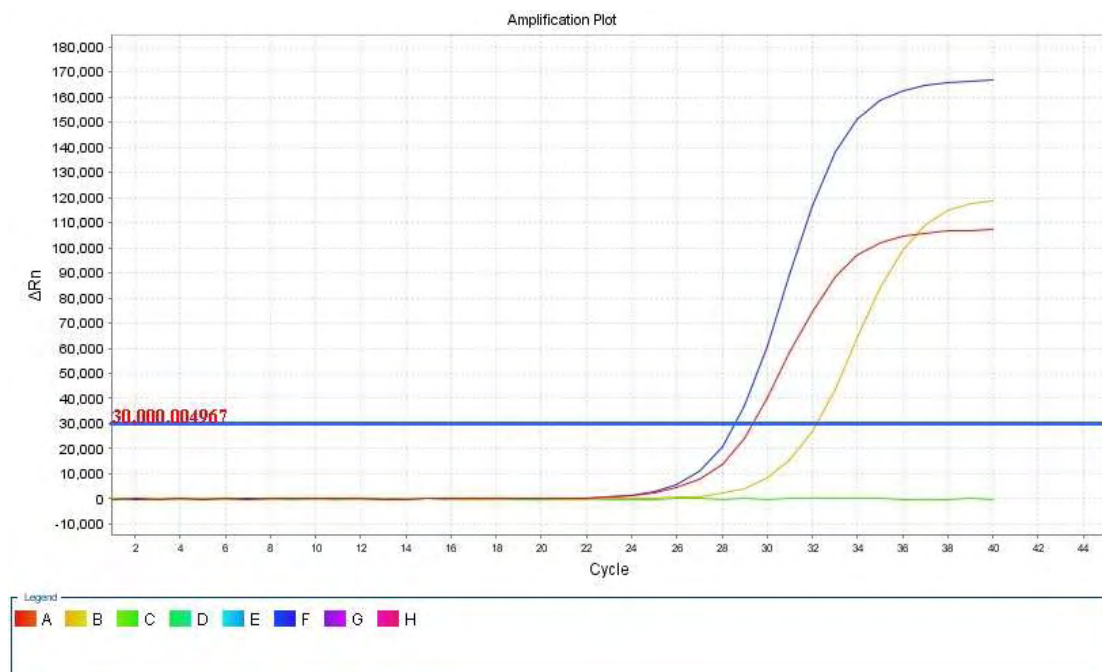
Πίνακας 2: Η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων, τα θετικά δείγματα χαμηλού και υψηλού κινδύνου και τα αρνητικά δείγματα.

Κλινικό δείγμα	Θετικό					Αρνητικό
	Χαμηλού κινδύνου	Υψηλού κινδύνου				
	6-11	16-18-31	39-45-59	33-35-56	51-52-58	
1	-	-	-	-	+ (52)	-
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+

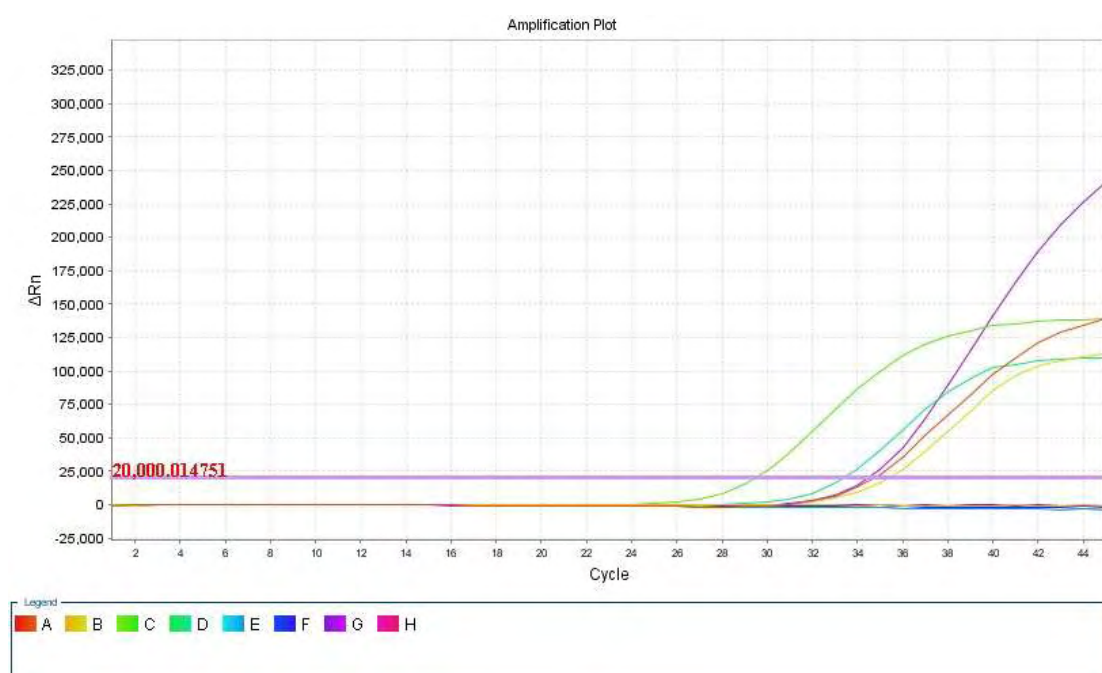
11	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	+ (33)	-	-
14	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	+
19	-	-	-	+ (33)	-	-
20	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	-	+
28	-	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	+
32	+ (11)	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	+
35	+ (6)	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	+
37	-	+ (31)	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	+

39	-	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	+
42	-	-	-	-	-	+
43	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	+
45	+ (11)	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	+
47	-	-	-	-	-	+
48	-	-	-	-	-	+
49	-	-	-	-	-	+
50	-	-	-	-	-	+
51	-	-	-	-	-	+
52	-	-	-	-	-	+
53	-	+ (31)	-	-	-	-
54	-	+ (31)	-	-	-	-
55	-	-	-	+ (33)	-	-
56	+ (6)	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	+

Εικόνα 1: Η απεικόνιση των προϊόντων της Real Time PCR ενίσχυσης των υπότυπων HPV χαμηλού κινδύνου.



Εικόνα 2: Η απεικόνιση των προϊόντων της Real Time PCR ενίσχυσης των υπότυπων HPV υψηλού κινδύνου.



4. Συζήτηση

Η συχνότητα του ιού HPV είναι πλέον παραπλήσια ανάμεσα στον ανδρικό και στο γυναικείο πληθυσμό. Βέβαια, η πλειονότητα της πληροφόρησης για τον ιό προκύπτει από έρευνες σε γυναίκες, κυρίως λόγω της συσχέτισής του με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, ο HPV προσβάλλει και τους άνδρες και συνδέεται μάλιστα με τον καρκίνο του στοματοφάρυγγα. Συχνά, ένα σημαντικό ποσοστό του ανδρικού πληθυσμού αγνοεί τους τρόπους πρόληψης της μετάδοσής του. Η προσβολή από τον ιό προκαλεί στους άνδρες διάφορες μορφές καρκίνου των γεννητικών οργάνων, μα και κονδυλώματα, όπως ακριβώς και στις γυναίκες (Hoover et al., 2009, Psyrri et al., 2014).

Ο HPV εμφανίζεται περίπου στο 50% του σεξουαλικά ενεργού ανδρικού πληθυσμού και σε αρκετές περιπτώσεις παραμένει σε ανενεργή λανθάνουσα φάση. Οι υπότυποι υψηλού κινδύνου συνδέονται με καρκίνους γεννητικών οργάνων, ενώ κάποιои προκαλούν και καρκίνους του πρωκτού. Δυστυχώς, οι ογκογόνοι υπότυποι του HPV σπάνια προκαλούν συμπτώματα στους άνδρες. Τα κονδυλώματα είναι συνήθως το μοναδικό σύμπτωμα του ιού, αν και σχετίζονται με υπότυπους χαμηλού κινδύνου.

Στην παρούσα μελέτη, ο ιός HPV εντοπίστηκε σε 11 από τους 57 υγιείς άνδρες. Η συχνότητα ανίχνευσης του ιού σε ποσοστό 19,3% και μάλιστα σε δείγμα ασυμπτωματικών φορέων είναι ανησυχητική. Το ποσοστό ανίχνευσης των ιών χαμηλού κινδύνου ήταν συνολικά 7%. Συγκεκριμένα, τόσο ο υπότυπος HPV 6 όσο και ο υπότυπος HPV 11 εντοπίστηκαν σε ποσοστό 3,5%. Το ποσοστό ανίχνευσης των ιών υψηλού κινδύνου ήταν συνολικά 12,3%. Οι υπότυποι HPV 16, HPV 18, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 56, HPV 58 και HPV 59 δεν εντοπίστηκαν σε κανένα δείγμα. Τόσο ο υπότυπος HPV 31 όσο και ο υπότυπος HPV 33 εντοπίστηκαν σε ποσοστό 5,3%, ενώ το υπότυπος HPV 52 εντοπίστηκε σε ποσοστό μόλις 1,7%.

Με δεδομένο το ότι ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι η πιο συχνή σεξουαλικά μεταδιδόμενη μόλυνση παγκοσμίως και στα δύο φύλα, τα παραπάνω ερευνητικά αποτελέσματα ήταν θεωρητικά αναμενόμενα. Οι περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες προσφέρουν εμβολιασμό έναντι του HPV για τα κορίτσια, ωστόσο, όπως αποδεικνύεται από τη συχνότητα ανίχνευσης του ιού, οι συστάσεις του εμβολίου και για τα αγόρια είναι σίγουρα δικαιολογημένες (Agorastos et al., 2015).

Γι' αυτό ακριβώς, οι ερευνητές εξετάζοντας την επικράτηση του ιού των γεννητικών ανθρώπινων θηλωμάτων μεταξύ των ανδρών προχώρησαν στη διεξαγωγή εθνικών μελετών, μα και συστηματικών ανασκοπήσεων ή μετα-ανάλυσεων σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, με στόχο τη διερεύνηση της συχνότητας των γεννητικών HPVs και τον προσδιορισμό των παραμέτρων που επηρεάζουν την εξάπλωση του ιού. Η δημοσιευμένη βιβλιογραφία παρέχει πληροφορίες για τον επιπολασμό του ιού και

των παραγόντων που συμβάλουν στην επικράτησή του, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε υψηλού κινδύνου αρσενικούς πληθυσμούς στην Ευρώπη. Σημαντικός θεωρείται φυσικά ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων στελεχών, τα οποία και επικρατούν μεταξύ των Ευρωπαίων ανδρών (**Hadjivassiliou et al, 2007, Hebnes et al., 2014**).

Η ύπαρξη του γενετικού υλικού των γεννητικών HPVs μεταξύ των ανδρών αξιολογήθηκε σε χώρες της βόρειας, νότιας και δυτικής Ευρώπης, καθώς δεν εντοπίστηκε αντίστοιχη μελέτη στην ανατολική Ευρώπη. Η συγκεντρωτική επικράτηση του HPV μεταξύ ανδρών που αντιπροσωπεύουν το γενικό πληθυσμό ήταν 12,4%, έναντι 19,2% της παρούσας μελέτης, ενώ μεταξύ ανδρών στον υψηλού κινδύνου πληθυσμό ήταν 30,9%. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Ωστόσο, η σταδιακή επικράτηση της τάσης ανίχνευσης του HPV στο γενικό πληθυσμό και μάλιστα σε σημαντικό βαθμό, είναι δεδομένη σε όλες τις μελέτες που δημοσιεύονται μετά το 2000. Το ποσοστό μεταβλήθηκε από 8,8% σε 28,5% και τείνει δυστυχώς να τροποποιείται (**Gomousa-Michael et al., 1997, Hebnes et al., 2014**).

Σε ό, τι αφορά τον εντοπισμό συγκεκριμένων στελεχών, ο HPV 16 ήταν ο πλέον διαδεδομένος υπότυπος υψηλού κινδύνου, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και στον πληθυσμό υψηλού κινδύνου. Ο HPV 18 αποτέλεσε τον αμέσως επόμενο πιο κοινό υπότυπο και στις δύο πληθυσμιακές ομάδες. Στη δική μας μελέτη, οι υπότυποι HPV 16 και HPV 18 κατείχαν μηδενικό ποσοστό. Ωστόσο, οι υπότυποι HPV 31 και HPV 33, οι οποίοι συμπεριλαμβάνονται στους πιο επικίνδυνους εκ των υπότυπων, ανευρέθηκαν σε ποσοστό 5,3% σε ασυμπτωματικούς άνδρες.

Η παρούσα μελέτη διέπεται από δύο περιοριστικούς παράγοντες. Η λήψη κολπικών ή τραχηλικών επιχρισμάτων, προερχόμενων από τις σεξουαλικές συντρόφους των μελετηθέντων ανδρών, κατέστη αδύνατη. Ακόμη, δεν υλοποιήθηκε διεύρυνση της μελέτης και στην περιοχή του στοματοφάρυγγα, λόγω της άρνησης των συμμετεχόντων να λάβουν μέρος στη διαδικασία λήψης φάρυγγικού επιχρίσματος. Τα εν λόγω δεδομένα ωστόσο, θα παρουσίαζαν ενδιαφέρον, καθώς πρόσφατη προσπάθεια προσδιορισμού της παρουσίας του ιού HPV στο φάρυγγα υγιούς πληθυσμού της Θεσσαλίας, υπέδειξε την ύπαρξη πιθανής συσχέτισής του με την ογκογένεση στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Συγκεκριμένα, ο ιός ανευρέθηκε σε 7 από τους 73 συνολικά άνδρες, σε ποσοστό 9,6%. Ο υπότυπος HPV 51 εντοπίστηκε σε 4 άνδρες, ο υπότυπος HPV 18 σε 2 άνδρες, ενώ οι υπότυποι HPV 16 και HPV 56 σε 1 άνδρα αντίστοιχα. Μάλιστα, σε ένα εκ των δειγμάτων εντοπίστηκαν παραπάνω του ενός υπότυποι (**Florou et al., 2011**).

Τα ευρήματά της συγκεκριμένης πειραματικής ερευνητικής εργασίας, συμβάλλουν σημαντικά στην απόκτηση ουσιαστικής γνώσης, σχετιζόμενης με την εισαγωγή του HPV εμβολιασμού και στα αγόρια, ενώ αποτελούν χρήσιμα στοιχεία ως βασικές προηγηθείσες του εμβολιασμού μετρήσεις. Φυσικά, τα ερευνητικά αποτελέσματα και

συμπεράσματα λειτουργούν προσθετικά και στη γενικότερη κατανόηση της επιδημιολογίας του HPV στον ασυμπτωματικό ανδρικό πληθυσμό.

5. Αναφορές

Agorastos T, Chatzistamatiou K, Zafrakas M, Siamanta V, Katsamagkas T, Constantinidis T, Lampropoulos A, Lysistrata Study Group, Distinct demographic factors influence the acceptance of vaccination against HPV, 2015.

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, Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability, *Genome*, 2014.

Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B, Type distribution, viral load and integration state of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN), *Br J Cancer*, 2005.

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

Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML, HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness, *J Med Virol*, 2002.

Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST, Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications, *Int J Cancer*, 2006.

Bergvall M, Melendy T, Archambault J, The E1 proteins, *Virology*, 2013.

Blachon S, Demeret C, The regulatory E2 proteins of human genital Papillomaviruses are pro-apoptotic, *Biochimie*, 2003.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al, Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia, *Vaccine*, 2008.

Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J, Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes, *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.

Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M, The clinical importance of understanding the evolution of Papillomaviruses, *Trends in microbiology*, 2010.

Briolat J, Dalstein V, Saunier M, et al, HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN, *Int J Cancer*, 2007.

- Cubie HA, Diseases associated with human papillomavirus infection, *Virology*, 2013.
- DeFilippis VR, Ayala FJ, Villarreal LP, Evidence of diversifying selection in human papillomavirus type 16 E6 but not E7 oncogenes, *J Mol Evol*, 2002.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hauzen H, Classification of Papillomaviruses, *Virology*, 2004.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, et al, Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective crosssectional worldwide study, *Lancet Oncol*, 2010.
- DiMaio D, Petti LM, The E5 proteins, *Virology*, 2013.
- Doorbar J, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin Sci (Lond)*, 2006.
- Doorbar J, The E4 protein; structure, function and patterns of expression, *Virology*, 2013.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA, The biology and life-cycle of human Papillomaviruses, *Vaccine*, 2012.
- Duensing S, Münger K, Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins, *Int J Cancer*, 2004.
- Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, Zheng L, Parry J, Cuevas R, et al, Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins, *Environ Mol Mutagen*, 2009.
- Einstein MH, et al, Comparative immunogenicity and safety of human Papillomavirus HPV-16/18 vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine follow-up from months 12-24 in a Phase III randomized study of healthy women aged 18-45 years, 2011.
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, Interactions between Papillomavirus L1 and L2 capsid proteins, *J Virol*, 2003.
- Garcia-Vallve S, Alonso A, Bravo IG, Papillomaviruses: different genes have different histories, *Trends Microbiol*, 2005.
- Ghittoni R., Accardi R., Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M, The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses, *Virus Genes*, 2010.
- Gissmann L, Boshart M, Dürst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H, Presence of human papillomavirus in genital tumors, *J Invest Dermatol*, 1984.

Gomousa-Michael M, Deligeorgi-Politi H, Condi-Paphiti A, Rammou-Kinia R, Ghionis J, Belca-Hari K, Human papillomavirus identification and typing of both sexual partners, 1997.

Hadjivassiliou M, Stefanaki C, Nicolaidou E, Bethimoutis G, Anyfantakis V, Caroni C, Katsambas A, Human papillomavirus assay in genital warts-correlation with symptoms, 2007.

Hebner CM, Laimins LA, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, *Rev Med Virol*, 2006.

Hebnes JB, Olesen TB, Duun-Henriksen AK, Munk C, Norrild B, Kjaer SK, Prevalence of genital human papillomavirus among men in Europe: systematic review and meta-analysis, *J Sex Med*, 2014.

Hoover K, Friedman A, Montañó D, Kasprzyk D, Greek A, Hogben M, What about the partners of women with abnormal Pap or positive HPV tests?, 2009.

Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP, Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview, *Virol*, 2010.

Hsueh PR, Human papillomavirus, genital warts, and vaccines, *J Microbiol Immunol Infect*, 2009.

Johannsen E, Lambert PF, Epigenetics of human Papillomaviruses, *Virology*, 2013.

Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M, Papillomavirus DNA replication – from initiation to genomic instability, *Virology*, 2009.

Kraus I, et al, Presence of E6 and E7 mRNA from Human Papillomavirus Types 16,18,31,33, and 45 in the Majority of Cervical Carcinomas, 2006.

Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J, Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression, *Virology*, 2011.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers, *J Virol*, 2003.

Moberg M, et al, Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human Papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer, 2003.

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al, Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J Virol*, 2004.

Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al, Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective, *Int J Cancer*, 2004.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al, Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N Engl J Med*, 2003.

Munoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L, Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer, *Vaccine*, 2006.

Narechania A, Chen Z, DeSalle R, Burk RD, Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human Papillomaviruses, *J Virol*, 2005.

Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, et al, Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis, *Mol Cell*, 2006.

Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S, Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative realtime PCR technique, *J Clin Microbiol*, 2002.

Pim D, Banks L, Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human Papillomaviruses, *APMIS*, 2010.

Psyrri A, Rampias T, Vermorken JB, The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck, 2014.

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF, Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression, *PLoS Pathog*, 2009.

Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM, Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline, *Infect Agents Cancer*, 2009.

Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al, The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution, *Virology*, 2005.

Schmitz M, Driesch C, Beer-Grondke K, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M, Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration, *Int J Cancer*, 2012.

Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M, Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer, *PLoS One*, 2012.

Sedman J, Stenlund A, The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities, *J Virol*, 1998.

Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, Desalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD, Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies, *PLoS One*, 2011.

Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, et al, Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 2004.

Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER, Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants, *Gynecol Oncol*, 2005.

Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J, Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin, *J Virol*, 2000.

Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie A, Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions, *J Clin Virol*, 2001.

Varsani A, van der Walt E, Heath L, Rybicki EP, Williamson AL, Martin DP, Evidence of ancient papillomavirus recombination, *J Gen Virol*, 2006.

Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H, Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region, *J Gen Virol*, 1999.

Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA, Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization, *J Clin Microbiol*, 1997.

White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J, Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain, *J Biol Chem*, 2001.

Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D, Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features, *Virus Genes*, 2002.

Woodman CB, Collins SI, Young LS, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues, *Nat Rev Cancer*, 2007.

Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, The role of viral integration in the development of cervical cancer, *Cancer Genet Cytogenet*, 2005.

zur Hausen H, Papillomavirus infections – a major cause of human cancers, *Biochim Biophys Acta*, 1996.

zur Hausen H, Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, *Virology*, 2009.