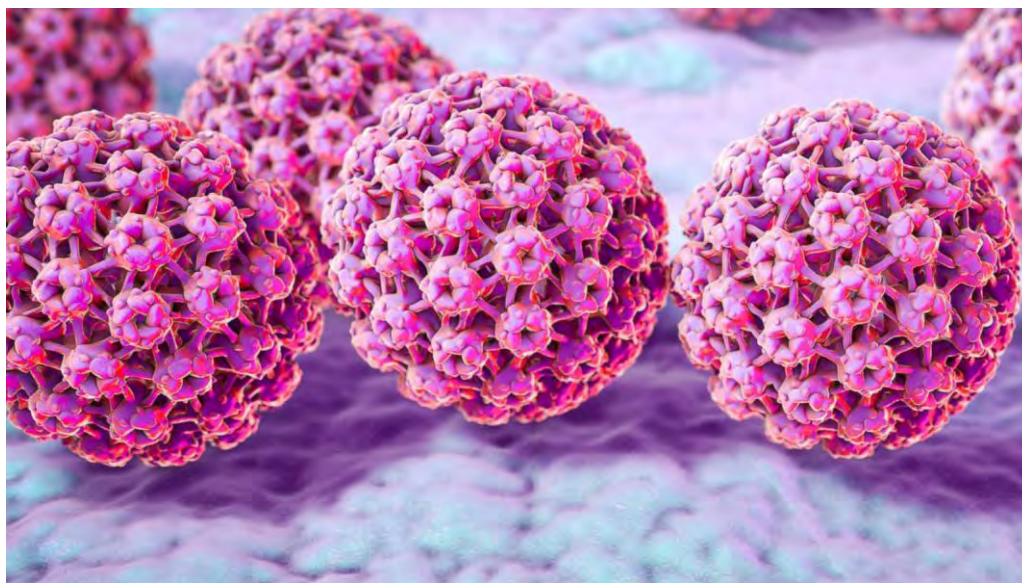


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
‘ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ’**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Πολυμορφισμός του γονιδίου RB1 στο εξόνιο 21 και
σύνδεση του πολυμορφισμού αυτού με υψηλού και
χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV 16
κλινικών δειγμάτων.**



**ANNA ΜΕΛΠΟΜΕΝΗ ΤΣΕΡΓΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2019**

Πολυμορφισμός του γονιδίου RB1 στο εξόνιο 21 και σύνδεση του πολυμορφισμού αυτού με υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV 16 κλινικών δειγμάτων.

RB1 gene polymorphism in exon 21 and association of this polymorphism to high and low grade dysplasia on HPV16 positive clinical samples.

Τριμελής Επιτροπή

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) :

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) είναι μικροί, δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί, οι οποίοι δε διαθέτουν εξωτερικό περίβλημα και προσβάλλουν είτε το επιθήλιο του δέρματος(θηλώματα) είτε το επιθήλιο του βλεννογόνου(κονδυλώματα). Οι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με την πρόκληση ‘επεκτατικού’ καρκίνου του ουρογενετικού συστήματος, σε ενδιάμεσου (Middle Risk) που μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και τέλος σε χαμηλού κινδύνου (Low Risk), που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε καλοήθεις βλάβες, οξυτενή κονδυλώματα και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα, ανάλογα με την ογκογονικότητά τους. Από τους τύπους υψηλού κινδύνου, οι HPV-16, HPV-18 και HPV-31 έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό που αγγίζει το 95%. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος του εξονίου 21 του γονιδίου RB1 και η εύρεση πολυμορφισμών που μπορεί να σχετίζονται με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 18 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας που απομονώθηκαν από τον Ελληνικό πληθυσμό, 10 με υψηλό βαθμό δυσπλασίας και 8 με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας.

Η νουκλεοτιδική και αμινοξική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός που να σχετίζεται με την ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού δυσπλασίας. Παρατηρήθηκε ότι τόσο τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας όσο και τα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας παρουσίασαν διάσπαρτες μεταλλάξεις σε όλο το μήκος του εξονίου 21.

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 21 πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS με την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας μέσω του προγράμματος SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-synonymous Analysis Program). Από τη μελέτη αυτή, διαπιστώθηκε ότι οι αλληλουχίες ήταν εξαιρετικά συντηρημένες, οπότε δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για την επιλεκτική πίεση που ασκείται σε κάθε ομάδα αλλοίωσης.

ABSTRACT

Human Papillomaviruses (HPV) are small, double-stranded circular DNA viruses that do not have an outer envelope and affect either the epithelium of the skin (papillomas) or the mucosal epithelium (warts). HPVs affecting the mucosal epithelium are distinguished, depending on their tumorigenicity, in High Risk types, which are associated with the induction of 'expansive' urogenital cancer, Middle Risk, which can be found in malformations and in Low Risk, predominantly in benign lesions, acute warts and almost never in carcinomas. Of the high risk types, HPV-16, HPV-18 and HPV-31 have been identified as the causative agent of 95% of cervical cancer cases. Cervical cancer is the second most common form of cancer among women worldwide.

The purpose of this study was to analyse exon 21 of the RB1 gene and to find polymorphisms that may be related to the degree of intraepithelial lesions. The study was conducted in 18 clinical cervical samples collected from the Greek population, 10 with a high degree of dysplasia and 8 with a low degree of dysplasia.

The nucleotide and amino acid analysis of the results showed that there is no specific polymorphism associated with the development of a higher degree of dysplasia. It was observed that both high-grade dysplasia samples and low-grade dysplasia samples showed scattered mutations throughout the length of exon 21.

Determination of the selective pressure of exon 21 was performed by calculating the dN / dS rate by the Maximum Probability method through SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-Synonymous Analysis Program). From this study, it was found that the sequences were extremely conserved, so we cannot draw any conclusion about the selective pressure exerted on each lesion group.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το χρονικό διάστημα 2018-2019, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος ‘Τοξικολογίας’ του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή Π. Μαρκουλάτο για την υπόδειξη του θέματος της παρούσης εργασίας, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ’ όλη την διάρκεια εκπόνησής της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Μεταδιδακτορικό ερευνητή Τηλέμαχο Δημητρίου, για την πολύτιμη βοήθειά του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο με σκοπό την επίτευξη της διεξαγωγής της παρούσης εργασίας, καθώς επίσης και στο Μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτρη Τσακογιάννη για τη βοήθειά του στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτωρ, Μαρία Δάσκου, για την άριστη συνεργασία, καθώς και την ηθική και έμπρακτη υποστήριξή της στο χώρο του εργαστηρίου.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°	9
1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά.....	9
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ών	9
1.3. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs).....	12
1.3.1 Δομή του καψιδίου	12
1.3.2 Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1	13
1.3.3 Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2	13
1.4 Οργάνωση του γονιδιώματος	13
1.4.1 Η ιική πρωτεΐνη E1.....	15
1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E2.....	15
1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E4.....	16
1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E5.....	17
1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E6.....	18
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7.....	20
1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος.....	22
1.6. Κύκλος ζωής των HPVς	23
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση	23
1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος	24
1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	25
1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση.....	26
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	26
1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb)	27
1.8.1 Χαρακτηριστικά των «pocket family proteins»: pRb, p107,p130.....	29
1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRb	31
1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°	35

3.1. Κλινικά δείγματα	35
3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep	36
3.3 Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων	37
3.4. Ανάλυση πολυμορφισμών του εξόνιου 21 του RB1	37
3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 21	37
3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων	38
3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης	39
3.4.4. Μοριακή κλωνοποίηση	39
3.4.5. Αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	41
3.4.6. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών	42
3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	44
4.1 Κλινικά δείγματα	44
4.2 Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων	44
4.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 21	45
4.4 Μοριακή κλωνοποίηση	45
4.5 Νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 21 του RB1	46
4.6 Αμινοξική ανάλυση στο εξόνιο 21 του RB1	49
4.7 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 21 του γονιδίου RB1	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	52
Βιβλιογραφικές αναφορές	54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Εισαγωγή

1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι ιοί των θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Οι *Papillomaviridae* είναι μικροί δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα, που προκαλούν όγκους των επιθηλίων. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV), εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV, Human Papillomavirus). Αν και, οι περισσότεροι τύποι HPV δημιουργούν καλοήθεις όγκους, όπως τα κονδυλώματα, ορισμένοι έχουν συσχετιστεί με κακοήθεις νεοπλασίες και συγκεκριμένα με καρκίνους του τραχήλου της μήτρας. (Van Doorslaer 2013) Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin, Bray, and Devesa 2001).

1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Αρχικά οι Papilloma ιοί, ταξινομήθηκαν μαζί με τους Polyoma ιούς, στην ίδια οικογένεια ιών, τους Papovaviridae. Η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε στην παρόμοια μορφή του γονιδιώματος των δύο ιών. Το γονιδίωμα τόσο των Papilloma ιών όσο και των Polyoma, αποτελείται από δίκλωνο κυκλικό DNA, το οποίο δεν περιβάλλεται από εξωτερικό περίβλημα. Αργότερα όμως αναγνωρίστηκε ότι το μέγεθος και η οργάνωση των γονιδιωμάτων των δύο ιών διέφερε, καθώς επίσης δεν υπήρχε καμία ομολογία τόσο σε νουκλεοτιδικό επίπεδο όσο και σε αμινοξικό. Για το λόγο αυτό, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV), δημιούργησε δύο ξεχωριστές οικογένειες: την οικογένεια των *Papillomaviridae* και την οικογένεια των *Polyomaviridae*.

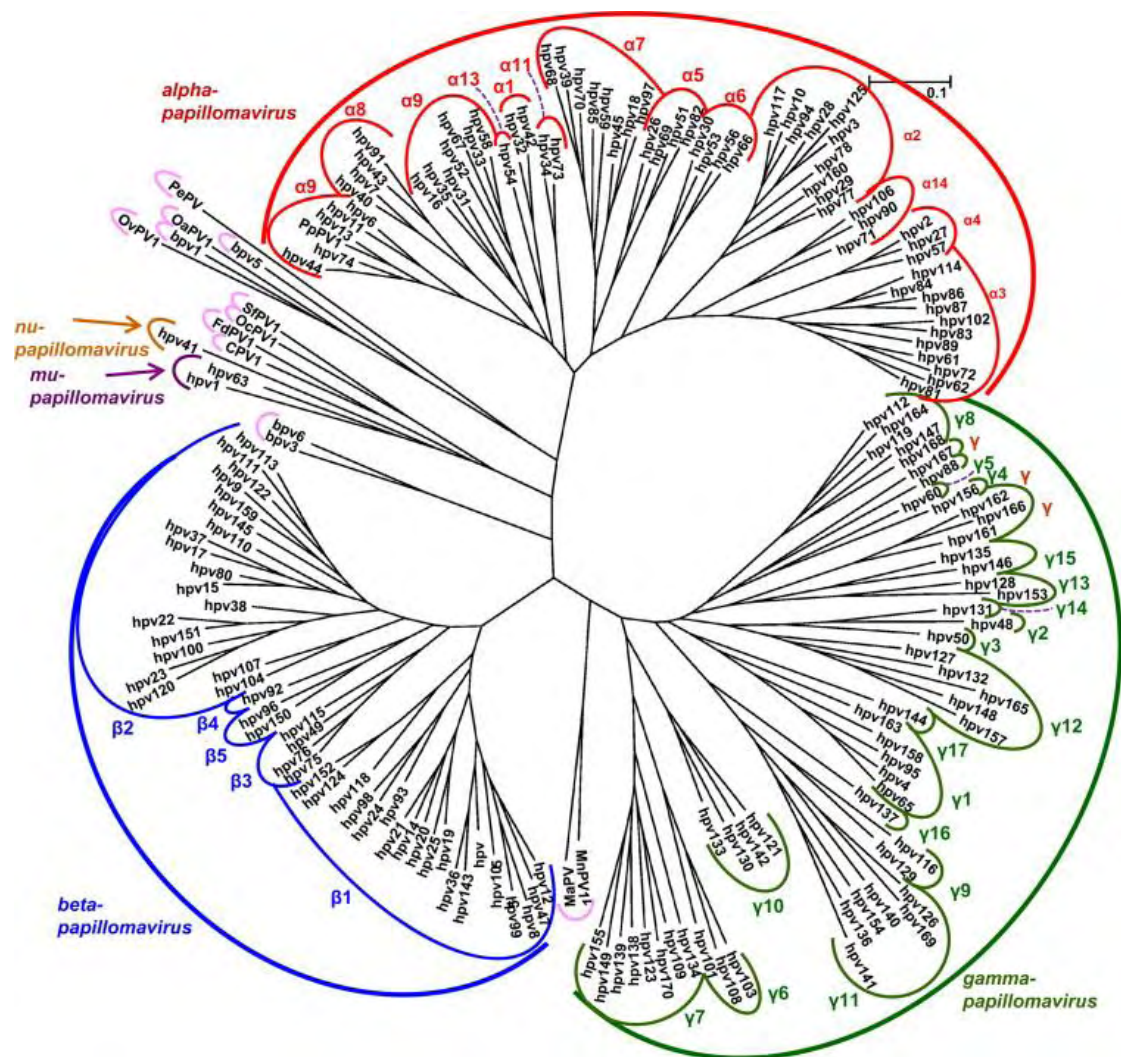
Οι Papilloma ιοί έχουν κυκλικό γονιδίωμα διπλού κλώνου DNA με μέγεθος κοντά στα 8kb. Παρά το μικρό τους μέγεθος, η μοριακή βιολογία τους είναι πολύ περίπλοκη. Εν ολίγοις, τρία ογκογονίδια, τα E5, E6 και E7 διαμορφώνουν το μετασχηματισμό, δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες, E1 και E2, συμμετέχουν στη μεταγραφή και στην αντιγραφή και δύο δομικές πρωτεΐνες, L1 και L2, συνθέτουν το ιικό καψίδιο.

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L1, είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο μέσα στο γονιδίωμα και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση νέων τύπων των ιών των θηλωμάτων. Η ταξινόμηση λοιπόν, στους ιούς των θηλωμάτων γίνεται βάσει του γονιδιώματος και όχι βάσει οροτύπου καθώς δεν υπάρχει κάποια διαθέσιμη κυτταρική σειρά διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων έτσι ώστε να καλλιεργηθεί ο ιός. Μεταξύ των διαφόρων τύπων των Papilloma ιών η διαφορά στην αλληλουχία του L1 ORF είναι μεγαλύτερη από 10%, ενώ για τους υποτύπους και τις παραλλαγές η διαφορά είναι 2-10% και μικρότερη από 2% αντίστοιχα (de Villiers et al. 2004).

Οι Papilloma ιοί χωρίζονται σε 39 γένη, τα οποία έχουν ομολογία 60 % στην αλληλουχία του L1 ORF και κάθε γένος παίρνει το όνομά του από ένα γράμμα του ελληνικού αλφαβήτου (από Άλφα μέχρι Πι). Οι ιοί που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο (HPVs), κατηγοριοποιούνται σε μόνο πέντε από αυτά τα γένη και συγκεκριμένα στα Alpha- , Beta- , Gamma- , Mu- και Nu- Papillomavirus. Αναμφισβήτητα, οι HPV ιοί που ανήκουν στο γένος Alphapapillomaviruses, έχουν τη μεγαλύτερη ιατρική σημασία, δεδομένου ότι σχετίζονται με καρκίνους του στόματος και του βλεννογόνου, καθώς και καρκίνους της αγγειογενετικής οδού.(Harden and Munger 2017).

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων χωρίζονται βάση του τροπισμού τους, σε δερματικούς και στους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλενογόνου. Οι δερματικοί HPV τύποι προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλενογόνου διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους **υψηλού κινδύνου (High Risk)**, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με την πρόκληση 'επεκτατικού' καρκίνου του ουρογενετικού συστήματος, σε **ενδιάμεσου (Middle Risk)** που μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες και τέλος σε **χαμηλού κινδύνου**

(**Low Risk**), που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε καλοήθειες βλάβες, οξυτενή κονδυλώματα και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα, ανάλογα με την ογκογονικότητά τους (πίνακας 1.1). Από τους τύπους υψηλού κινδύνου, οι HPV-16, HPV-18 και HPV-31 έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό που αγγίζει το 95% (Bzhalava et al. 2013; Muñoz et al. 2003).



Εικόνα 1.1 : Φυλογενετικό δέντρο που φαίνονται τα διάφορα γένη των Papilloma ιών. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε βάσει των αλληλουχιών του L1 ORF με το πρόγραμμα MEGA5.1 (de Villiers 2013)

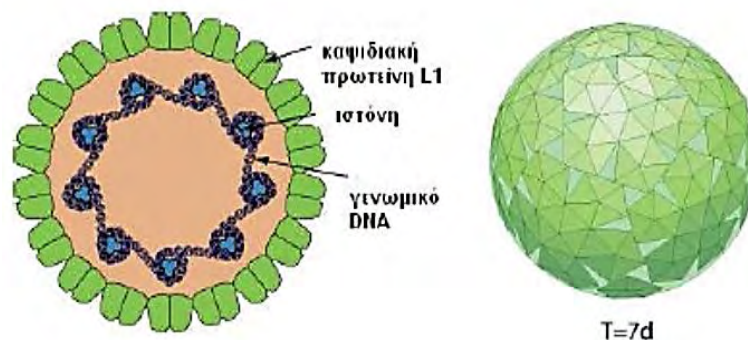
Ομάδα επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Πίνακας 1.1 : Ομάδες επικινδυνότητας των HPV

1.3. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs)

1.3.1 Δομή του καψιδίου

Οι papilloma ιοί είναι μια ομάδα μικρών δίκλωνων, κυκλικών DNA ιών, διαμέτρου της τάξεως των 50-60nm, οι οποίοι δεν διαθέτουν εξωτερικό περίβλημα. Το γονιδίωμα του ιού περιβάλλεται από ένα καψίδιο, το οποίο αποτελείται από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες εκφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. Η εξωτερική επιφάνεια των ιοσωματίων των HPV αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 και σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια.(El Mehdaoui et al. 2000).



Εικόνα 1.2 : Δομή του καψιδίου των HPV

1.3.2 Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1, βάρους 55 kDa, σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου. Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει τόσο στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή όσο και στην απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πρωτεΐνη συγκροτεί πενταμερή καψομερή όπου 72 πενταμερή συγκροτούν ένα ώριμο καψίδιο.(Stanley 2008).



Εικόνα 1.3 : Η δομή ενός πενταμερούς καψομερούς(Buck, Day, and Trus 2013).

1.3.3 Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2, βάρους 55kDa, αποτελεί μείζονα παράγοντα του καψιδίου, σε αντίθεση με τη καψιδιακή πρωτεΐνη L1. Η πρωτεΐνη L2, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη συναρμολόγηση των ιών των θηλωμάτων, όσο και στη μολυσματική διαδικασία (Wang and Roden 2013).

1.4 Οργάνωση του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα όλων των HPV, είναι ένα δίκλωνο κυκλικό DNA, μήκους περίπου 8kb, το οποίο μπορεί να χωριστεί σε τρεις μεγάλες περιοχές, βάση των λειτουργικών

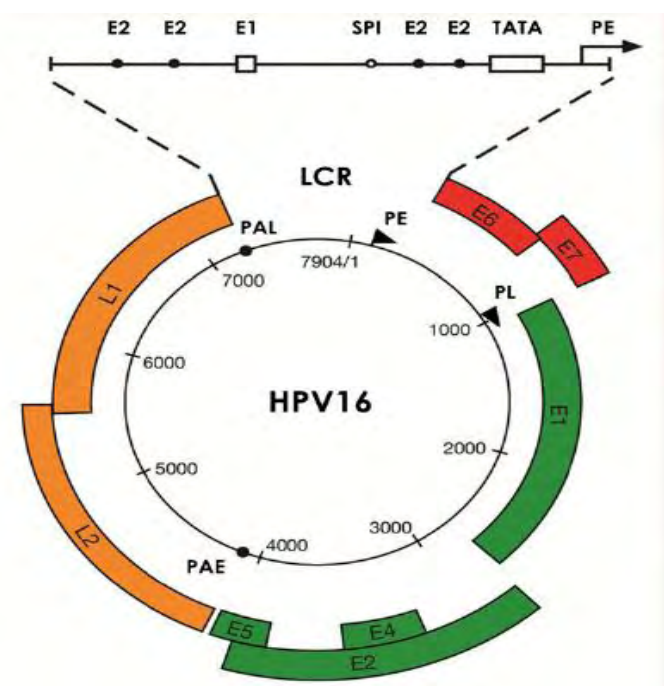
δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε πρόιμη περιοχή (E= Early region), την όψιμη περιοχή (L=late region) και την ρυθμιστική περιοχή LCR..

Η πρόιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρόιμες ικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 των μολυσμένων κυττάρων.

Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ικό καψίδιο, τις L1 και L2. (Zheng 2006)

Η έκφραση του γενόματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Τον p97 υποκινητή, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρόιμων γονιδίων (Smotkin and Wettstein 1986) και τον p670 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων. (Grassmann et al. 1996)

Τέλος, η ρυθμιστική περιοχή LCR, μήκους 850bp, δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη. Εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L1 και πριν την αρχή του γονιδίου E6. Περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής, καθώς και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ικού DNA (Doorbar et al. 2012).



Εικόνα 1.4 : Το γονιδίωμα του HPV-16 (Doorbar et al. 2012)

1.4.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

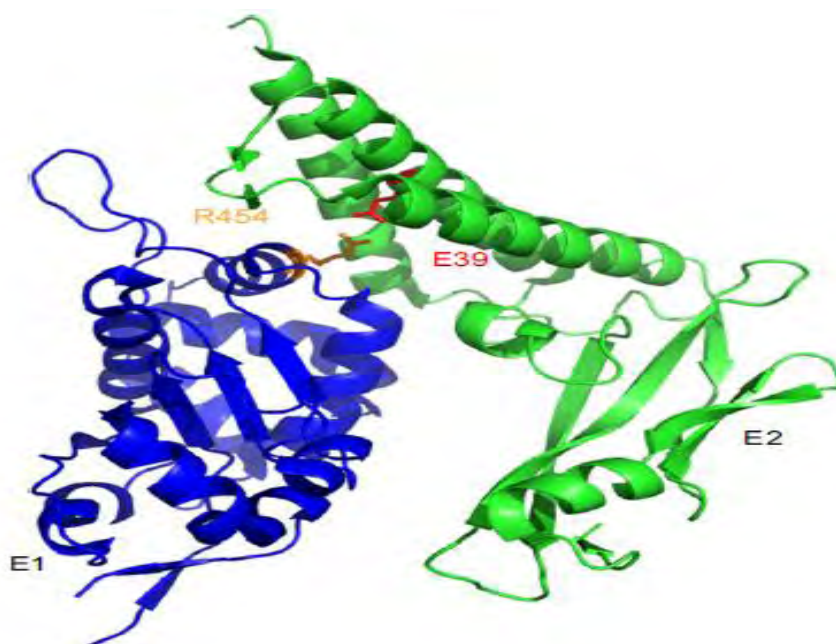
Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 αποτελεί μια πολύ συντηρημένη περιοχή του ιικού γονιδιώματος η οποία κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 67-76 kDa (ανάλογα με τον τύπο του ιού) που απαιτείται για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια DNA ελικάση/ ATPάση και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA του ιού προσδενόμενη σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων. Η πρωτεΐνη E1, μπορεί να χωριστεί σε τρία λειτουργικά τμήματα. Ένα αμινοτελικό άκρο, μήκους περίπου 200 αμινοξέων, το οποίο ενισχύει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ιικό DNA στην επισωμική του μορφή, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση αυτής μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Μια κεντρική περιοχή δέσμευσης (γνωστή ως DNA- binding domain), μέσω της οποίας η E1 συνδέεται σε μια αλληλουχία της ori. Και τέλος, ένα καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο έχει δράση ελικάσης και ATPάσης και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της E1 με την E2 (Bergvall, Melendy, and Archambault 2013).

1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa η οποία ρυθμίζει την μεταγραφή από τον πρώιμο υποκινητή, ενώ είναι απαραίτητη και για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Αποτελείται από τρεις περιοχές: C-τελική περιοχή, η οποία κωδικοποιεί και σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA. Μια περιοχή-αρμός (hinge region) και την N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μια α-έλικα. (McBride 2013; Leng, Ludes-Meyers, and Wilson 1997)

Η περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της E2 αλληλεπιδρά με την περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της E1 η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης στη θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και την δραστηριότητα ελικάσης. Συνεπώς δημιουργείται το σύμπλοκο E1/E2 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής το οποίο προκαλεί αναδιάταξη του DNA, διευκολύνοντας την προσέλκυση περισσότερων

μορίων E1 έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντιγραφή. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι απαραίτητος τόσο για την αντιγραφή όσο και για την μεταγραφή καθώς μετά την πρόσδεση του συμπλόκου στον πρώιμο υποκινητή προσελκύνονται μεταγραφικοί παράγοντες. (Leng, Ludes-Meyers, and Wilson 1997)



Εικόνα 1.5 : Δομή του συμπλόκου E1/E2 (McBride 2013)

1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

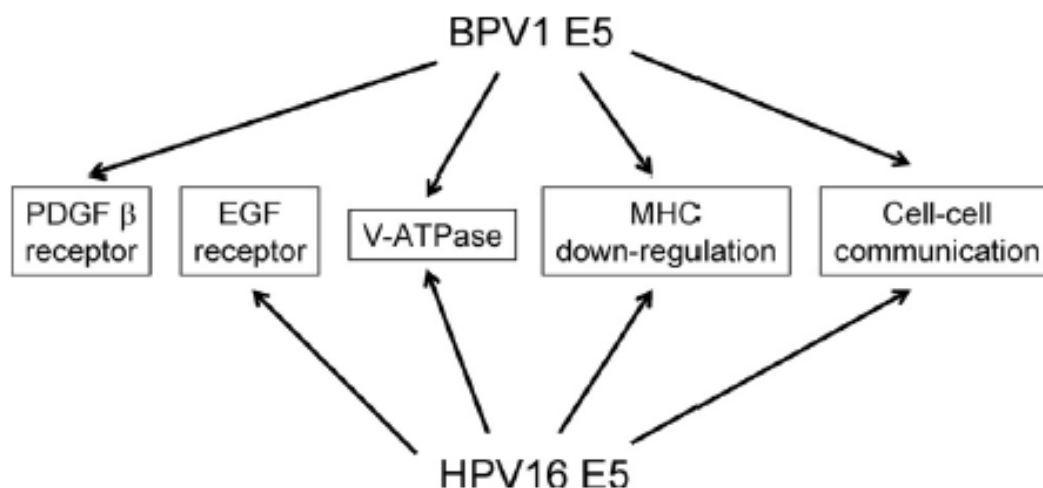
Το E4 ORF εντοπίζεται εξολοκλήρου εντός του E2 ORF και ποικίλλει σημαντικά σε μέγεθος μεταξύ των διάφορων τύπων των ιών των θηλωμάτων. Το ανοιχτό αυτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4, μεταφράζεται μαζί με τα πρώτα πέντε αμινοξέα του E1 γονιδίου, σχηματίζοντας την E1^{E4} πρωτεΐνη. Όλοι οι papilloma ιοί εκφράζουν την πρωτεΐνη E1^{E4} κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής τους (Doorbar 2013).

Η πρωτεΐνη E4 του HPV-16 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: α) Στο N-τελικό άκρο, όπου συναντάται το συντηρημένο

μοτίβο (LLKLL), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης. β) Σε μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. γ) Στην C-τελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης (Tsakogiannis et al. 2012; McIntosh et al. 2010).

1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυττάριας μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου και σπανιότερα μπορεί να εμφανιστεί στον πυρηνικό φάκελο. Αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται σε πολλά ζώα και στους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων. Στα βοειδή στελέχη των papilloma ιών, η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στο πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF. Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με την ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοειδών και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά. Συγκεκριμένα, στον ιό HPV-16 έχει βρεθεί ότι η E5 δρα συνεργατικά με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) επάγοντας την μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την ικανότητα διήθησής τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η E5 μερικών PVs μπορεί να αλληλεπιδράσει με την V-ATPάση των χυμοτοπίων οδηγώντας σε αλλαγές στην οξύνιση των ενδοσωμάτων και σε αποικοδόμηση του υποδοχέα του EGF. Τέλος, η πρωτεΐνη E5 ελαττώνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I) αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του MHC I έτσι ώστε ο ιός να αποκτά την ικανότητα να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση (DiMaio and Petti 2013, 5; DiMaio and Mattoon 2001; Ashrafi et al. 2006; Wetherill et al. 2012).

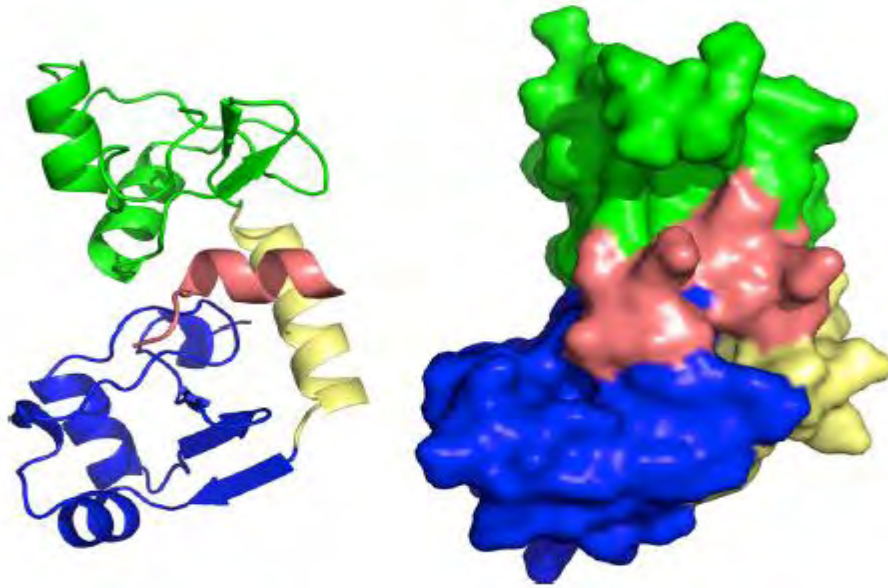


Εικόνα 1.6 :Σημαντικοί στόχοι των BPV1 και HPV16 E5 πρωτεϊνών. (DiMaio and Petti 2013)

1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 είναι μια πρόιμη ιική ογκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 150 αμινοξέα και συμβάλλει στην αθανатоποίηση και το μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από HPV ιό υψηλού κινδύνου. Είναι μια από τις πρώτες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της E6 ογκοπρωτεΐνης, που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της HPV λοίμωξης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, διότι εμπλέκεται σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου ξενιστή (Thomas and Banks 1999, 6; Hausen 2000).

Η E6 πρωτεΐνη περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου, ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυλικό άκρο, που φέρουν το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Οι περιοχές αυτές είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των διάφορων στελεχών, γεγονός που καταδεικνύει το πόσο σημαντικές είναι για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι δύο αυτές περιοχές ψευδαργύρου, μαζί με μια αλληλουχία με δομή α έλικας, που τις ενώνει, δημιουργούν μια κοιλότητα, στην οποία βρίσκεται το συντηρημένο πεπτίδιο LXXLL. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες και δημιουργεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η αναστολή της απόπτωσης (Vande Pol and Klingelutz 2013).



Εικόνα 1.7 : Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο φαίνεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία με κίτρινο και η συντηρημένη αλληλουχία LXXLL με ροζ χρώμα (Vande Pol and Klingelutz 2013).

Μια βασική λειτουργία της E6 πρωτεΐνης είναι η αλληλεπίδρασή της με την p53. Η p53 είναι πιο σημαντική ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η E6 λοιπόν, συνδέεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6AP. Ο σχηματισμός αυτός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουτινίωση της p53 και στην αποδόμησή της στο 26 S πρωτεόσωμα. Η απώλεια της λειτουργικής p53 έχει ως αποτέλεσμα να μην λειτουργούν οι διεργασίες της διόρθωσης των βλαβών του DNA και η παράκαμψη των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τελικώς οδηγούν σε γενωμική αστάθεια. Η αποικοδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 των υψηλού κινδύνου HPV's. Αντίθετα, η E6 των χαμηλού κινδύνου HPV's παρόλο που μπορεί να προσδένεται στην E6AP δεν μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της p53 (Vande Pol and Klingelutz 2013).

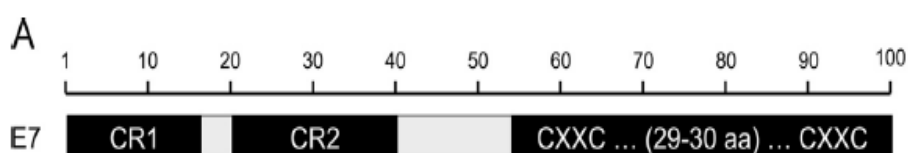
Μια ακόμα λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT, η οποία διατηρεί τις τελομερικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, η ογκοπρωτεΐνη E6 μέσω ουβικιτινίωσης και

αποικοδόμησης του παράγοντα NFX1-91, οποίος είναι αναστολέας της έκφρασης του γονιδίου hTERT, ενεργοποιεί το γονίδιο hTERT. Η ενεργοποίηση της hTERT, έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντας την κυτταρική γήρανση. Συνεπώς, τα κύτταρα γίνονται αθάνατα. (Yugawa and Kiyono 2009).

1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι η δεύτερη ιική ογκοπρωτεΐνη, μετά την E6, η οποία συμβάλλει στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από HPV υψηλού κινδύνου. Διαδραματίζει βασικό ρόλο στο κύκλο ζωής των ανθρώπινων ιών των θηλωμάτων, επαναπρογραμματίζοντας τις λειτουργίες του κυττάρου, ώστε να ευνοούν την αναπαραγωγή του ιού. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E6, επάγει την έναρξη της ογκογένεσης καθώς και την γενωμική αστάθεια (Roman and Munger 2013).

Η E7 είναι μια μικρή φωσφοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 98 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις συντηρημένες περιοχές (Conserved Regions, CR), την CR1, CR2 και την CR3. Το αμινοτελικό της άκρο περιλαμβάνει την CR1, η οποία είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, περιλαμβάνει την CR3 περιοχή, η οποία περιλαμβάνει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb. (Roman and Munger 2013)



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των συντηρημένων αλληλουχιών της E7 πρωτεΐνης. Οι CR περιοχές εμφανίζονται με μαύρα πλαίσια, ενώ οι μεταβλητές αλληλουχίες με γκρι χρώμα.

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος περιλαμβάνει επίσης την p107 και την p130. Η αποφοσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με το μεταγραφικό παράγοντα E2F, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Η φωσφορυλίωση της pRb από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση της Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με το μεταγραφικό παράγοντα E2F, με συνέπεια να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά τη δράση του ιού, η E7 προσδένεται στην αποφοσφορυλιωμένη pRb και δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F. Η πρόσδεση αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρόλο που οι πρωτεΐνες E7 όλων των στελεχών μπορούν να προσδένονται στα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος, οι E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου προσδένονται με πολύ υψηλότερη συγγένεια στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τις E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου (Roman and Munger 2013; Gage, Meyers, and Wettstein 1990, 7; Stevaux and Dyson 2002).

Η E7 πρωτεΐνη προσδένεται επίσης στις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs), οι οποίες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο ομάδων από τις ιστόνες. Μπορούν επιπρόσθετα να απεκετυλιώσουν τον παράγοντα E2F, αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Η pRb αλληλεπιδρά με την HDAC-1 και την κατευθύνει στους υποκινητές που προσδένουν τον E2F έτσι ώστε να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Η E7 προσδένεται στην HDAC-1 μέσω της CR3 περιοχής ανεξάρτητα από την πρόσδεσή της με την pRb παρεμποδίζοντας την λειτουργία της με αποτέλεσμα την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth, Wilson, and Laimins 2005).

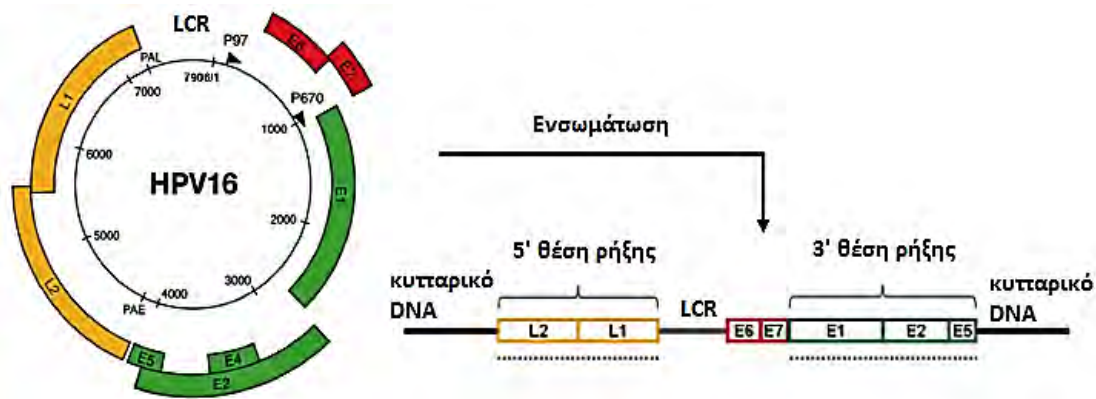
Τέλος, η E7 συνδέεται με μια ακόμη ομάδα πρωτεϊνών, τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases inhibitors, CKIs) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και

μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ'επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Zerfass et al. 1995).

1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία των δύο μορφών. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των μολύνσεων από υψηλού κινδύνου HPV ιό, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Ωστόσο, στο υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε γενωμική αστάθεια. (Schmitz et al. 2012).

Κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης του ιού, το κυκλικό HPV γονιδίωμα υφίσταται ρήξη και μετατρέπεται σε γραμμικό DNA. Στην ενσωμάτωση τα γονίδια E4 και E5 χάνονται, ενώ τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάρρηξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις του γονιδίου E1. Ρήξη έχει παρατηρηθεί ακόμη, στα γονίδια L1 και L2, με πολύ μικρότερη συχνότητα. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μέρους του ιικού γονιδίου E2, το προϊόν του οποίου λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων. Η υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, επάγει τον κυτταρικό μετασχηματισμό. (Xu et al. 2013)



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση της ευθυγράμμισης του γονιδιώματος του HPV-16. Οι θέσεις ρήξης του ενσωματωμένου HPV-16 DNA μπορεί να εντοπίζονται οπουδήποτε στα γονίδια L2, L1 (5' θέση ρήξης) και στα γονίδια E1, E2, E5 (3' θέση ρήξης), (Xu et al. 2013).

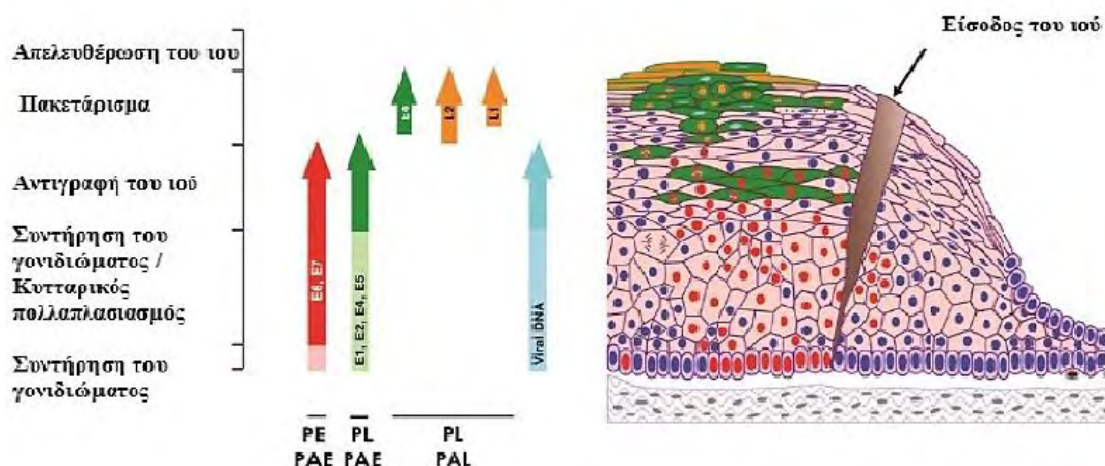
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs

1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Η μόλυνση από τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων, συμβαίνει μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου, εκθέτοντας τα κύτταρα της βασικής στιβάδας στον ιό. Ο κύκλος ζωής των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Μετά την είσοδο του ιού στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί ο κύκλος ζωής του, εκφράζοντας διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται. (Doorbar et al. 2012; Schiller, Day, and Kines 2010).

Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσής του με τη θεϊκή ηπαρίνη (HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών που

αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη. Ο ιός HPV, απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα, για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Το σύμπλοκο L2 πρωτεΐνης-DNA ελέγχει την σωστή είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα. (Kines et al. 2009)



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων του HPV-16. Τα πρώτα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου υποκινητή PE ή p97 (κόκκινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και την ενίσχυση του ιικού DNA, καθώς και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα όψιμα ιικά γονίδια L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του όψιμου υποκινητή PL ή p670 (πράσινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη δημιουργία του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιού (Doorbar et al. 2012).

1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, οι HPV περνούν από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματος τους. Μία αρχική φάση της αντιγραφής του γονιδιώματος, πραγματοποιείται αμέσως μετά τη μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας από τον ιό. Σε αυτό το σημείο, το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα, ως επίσωμα. Η δεύτερη φάση της αντιγραφής συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στη φάση S. Στη φάση αυτή, το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού

γονιδιώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων, όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια. (McBride 2008)

Σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, διαδραματίζουν οι ιικές πρωτεΐνες E1 και E2. Η E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας τη δράση των γονιδίων E6 και E7. Μεταλλάξεις στο γονίδιο E2, οδηγούν σε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου (McBride 2008; Doorbar 2006).

1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τόσο η αντιγραφή όσο και η έκφραση των γονιδίων του ιού ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα εκφράζονται οι έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, E1,E2,E4,E5,E6 και E7. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1,E2,E4,E5,E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή, ο οποίος για τον HPV-16 είναι ο p97. Ο υποκινητής p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Υπάρχει ένας δεύτερος υποκινητής, ο p670, ο οποίος είναι τοποθετημένος εντός του E7 ORF 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 ιοσωματίων (Zheng 2006; Doorbar et al. 2012).

1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση

Το τελικό στάδιο στον κύκλο ζωής των papilloma ιών, περιλαμβάνει τη συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και τη σύνθεση των ιικών σωματιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα και απαιτεί τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2. 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. Από την άλλη πλευρά, η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι βασική μονάδα του καψιδίου των HPV. Εκτός των L1 και L2, απαιτείται η παρουσία της E2 πρωτεΐνης. Η E2 συμβάλλει στη τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων.

Η ωρίμανση των ιικών σωματίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέρθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια. (Buck et al. 2004).

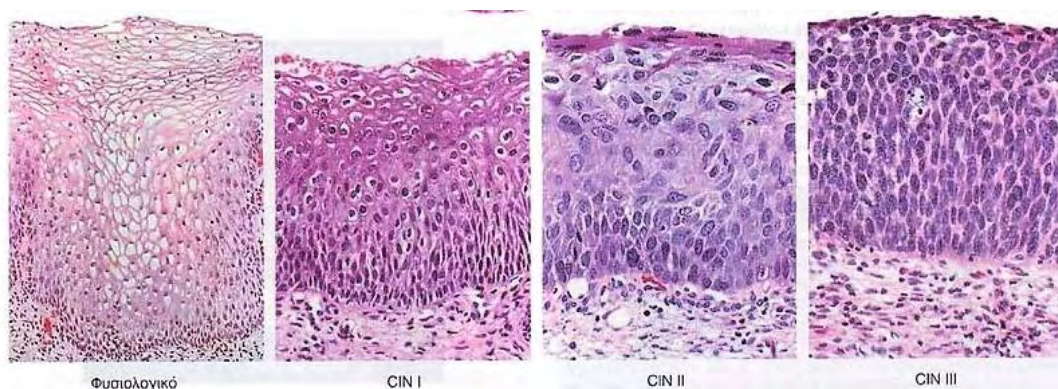
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις

Η μόλυνση από τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι μια σεξουαλικά μεταδιδόμενη διαδικασία. Προκαλούν ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο ,μέχρι νεοπλασίες καλοήθους και κακοήθους φύσεως του τραχήλου της μήτρας. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου προκαλούν λοιμώξεις χαμηλού κινδύνου στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθη θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλειφτούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου, σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι όπως προαναφέρθηκε ο HPV-16 , αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου,

συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου (Doorbar et al. 2012).

Σε μοριακό επίπεδο, οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείδυση του ιού. Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. (Doorbar 2006)

Οι τραχηλικές αλλοιώσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες μετά το Test pap σύμφωνα με το σύστημα Bethesda, την πιο σύγχρονη ταξινόμηση που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ιστοπαθολόγοι σήμερα: χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) (Solomon et al. 2002).



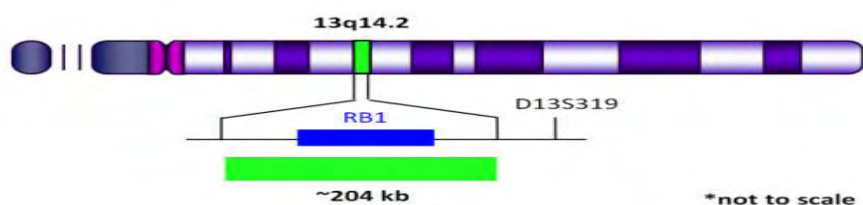
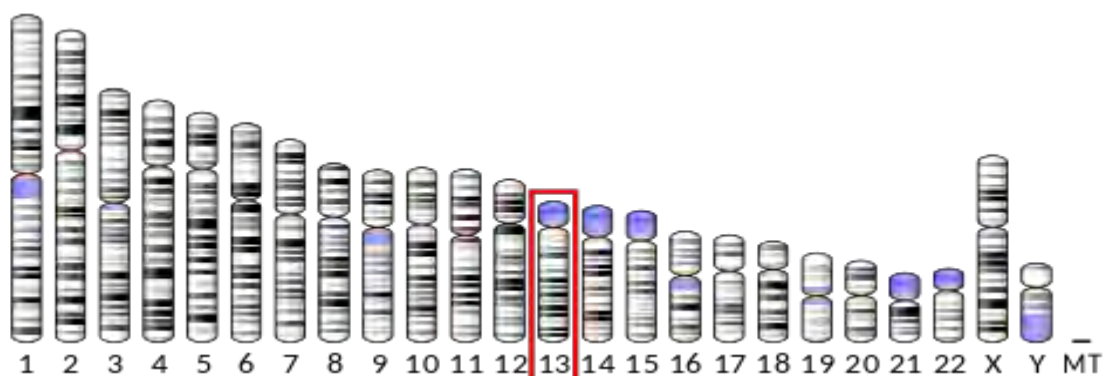
Εικόνα 1.10: Το φάσμα των αλλοιώσεων στη τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN).

1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb)

Το ρετινοβλάστωμα είναι ένας καρκίνος του αναπτυσσόμενου αμφιβληστροειδούς που εμφανίζεται με συχνότητα 1:20.000. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13, στο γενετικό τόπο 13q14.2 και πιο συγκεκριμένα στη

θέση 13q14.1-q14.2. Το γονίδιο RB1 εκτείνεται σε μήκος 180kbp περίπου, στη ζώνη q 14 του χρωμοσώματος 13 και αποτελείται από ένα μεγάλο και 27 μικρά εξόνια, κωδικοποιώντας μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 105kDa, η οποία αποτελείται από 928 αμινοξέα. (Lohmann et al. 1997).

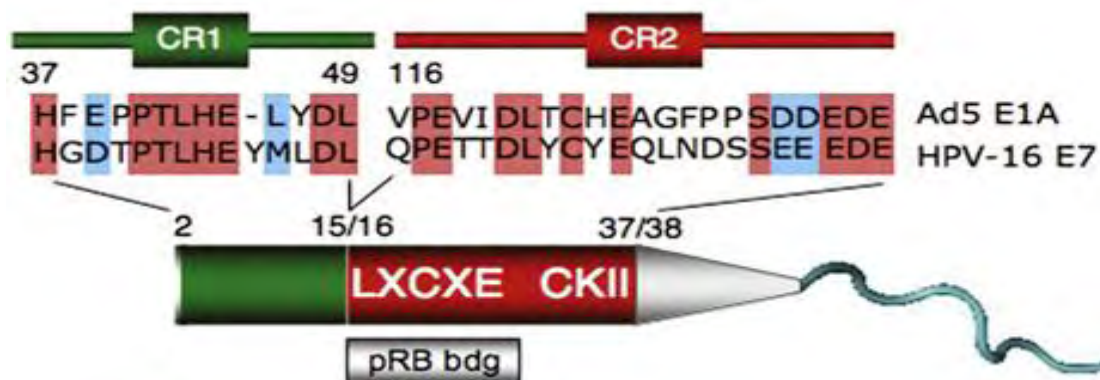
Η πρωτεΐνη αυτή, ανήκει στην οικογένεια των 'rocket' πρωτεϊνών, στην οποία περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες p107 και p130. Η πιο γνωστή λειτουργία της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος είναι η ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, μετά το G1-S σημείο ελέγχου, μέσω αλληλεπιδράσεων με τον παράγοντα μεταγραφής E2F. Εμπλέκεται επίσης και σε άλλες οδούς που σχετίζονται με την καρκινογονικότητα όπως η γονιδιωματική συντήρηση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση (Price et al. 2014).



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της θέσης του γονιδίου RB1.

1.8.1 Χαρακτηριστικά των «rocket family proteins»: pRb, p107,p130

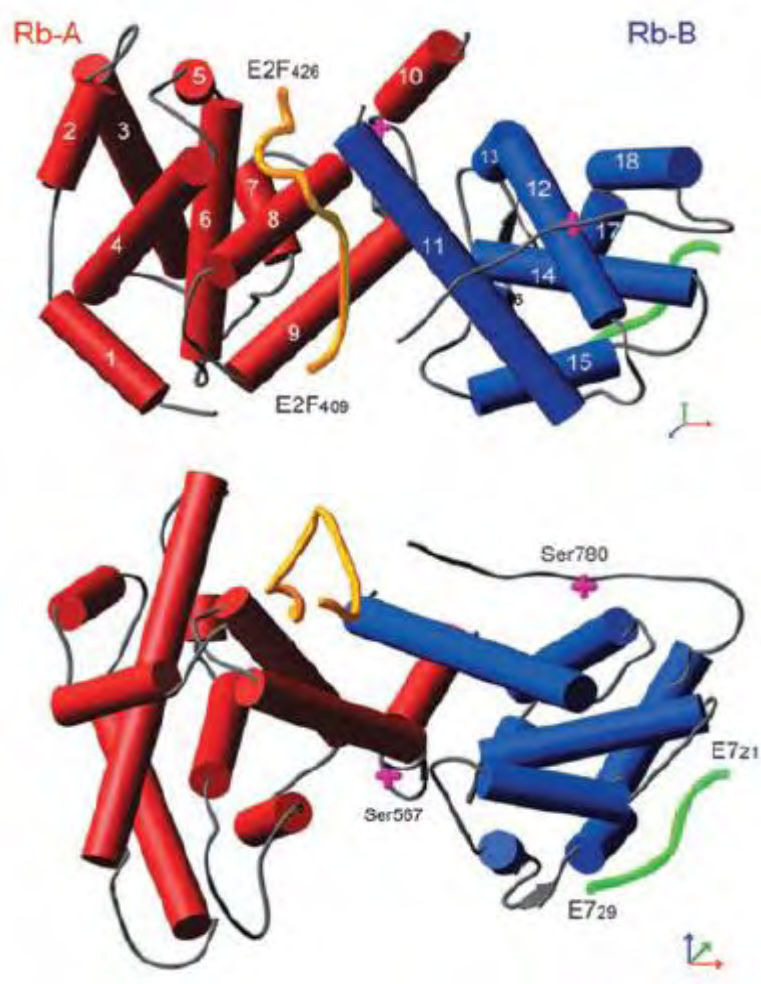
Τα μέλη της οικογένειας RB μοιράζονται πολλές δομικές ιδιότητες. Η πιο συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των πρωτεϊνών pRB , p107 και p130 είναι η περιοχή που ονομάζεται “small pocket” και αποτελείται από τις περιοχές A και B που χωρίζονται από μία εύκαμπτη περιοχή που ονομάζεται “spacer”. Οι περιοχές A και B, αντιπροσωπεύουν η καθεμιά μια περιοχή κυκλικής αναδίπλωσης και αλληλεπιδρούν έτσι ώστε η περιοχή “small pocket” να μπορεί να σχηματίσει έναν καταστολέα μεταγραφής. Η περιοχή “small pocket” έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με διάφορες ογκοπρωτεΐνες, όπως είναι η πρωτεΐνη του αδενοϊού E1A και η E7 πρωτεΐνη του HPV. Αυτές οι ιικές πρωτεΐνες έχουν ένα κοινό πεπτιδικό μοτίβο, το LXCXE, που είναι απαραίτητο για μια σταθερή αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες της οικογένειας RB (Henley and Dick 2012).



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση της ομοιότητας των αμινοξέων της E7 του HPV-16 και της E1A του αδενοϊού , καθώς και η θέση της περιοχής LXCXE που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των πρωτεϊνών αυτών με τη pRB (McLaughlin-Drubin and Münger 2009).

Ο συνδυασμός της περιοχής “small pocket” με το C- τελικό άκρο συγκροτεί τη περιοχή που ονομάζεται “large pocket” , η οποία συμβάλλει στην ογκοκαταστολή των πρωτεϊνών. Η περιοχή “large pocket” αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F. Η αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, είναι ένα

κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας RB, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας RB και στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, διαφέρουν από εκείνες που συμβαίνουν με την περιοχή του μοτίβου LXCXE. Παρόλα αυτά, η δέσμευση ικών ογκοπρωτεϊνών μέσω του μοτίβου LXCXE τις φέρνει κοντά στο συνδεδεμένο E2F και έτσι μια διαφορετική περιοχή της ικής πρωτεΐνης μπορεί να διαταράξει τη δέσμευση μεταξύ του E2F και των πρωτεϊνών της οικογένειας RB. Αυτό υπογραμμίζει περαιτέρω τη σημασία της αλληλεπίδρασης RB-E2F διότι η διακοπή της είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό των κυττάρων μέσω της δράσης ικών ογκοπρωτεϊνών (Henley and Dick 2012).



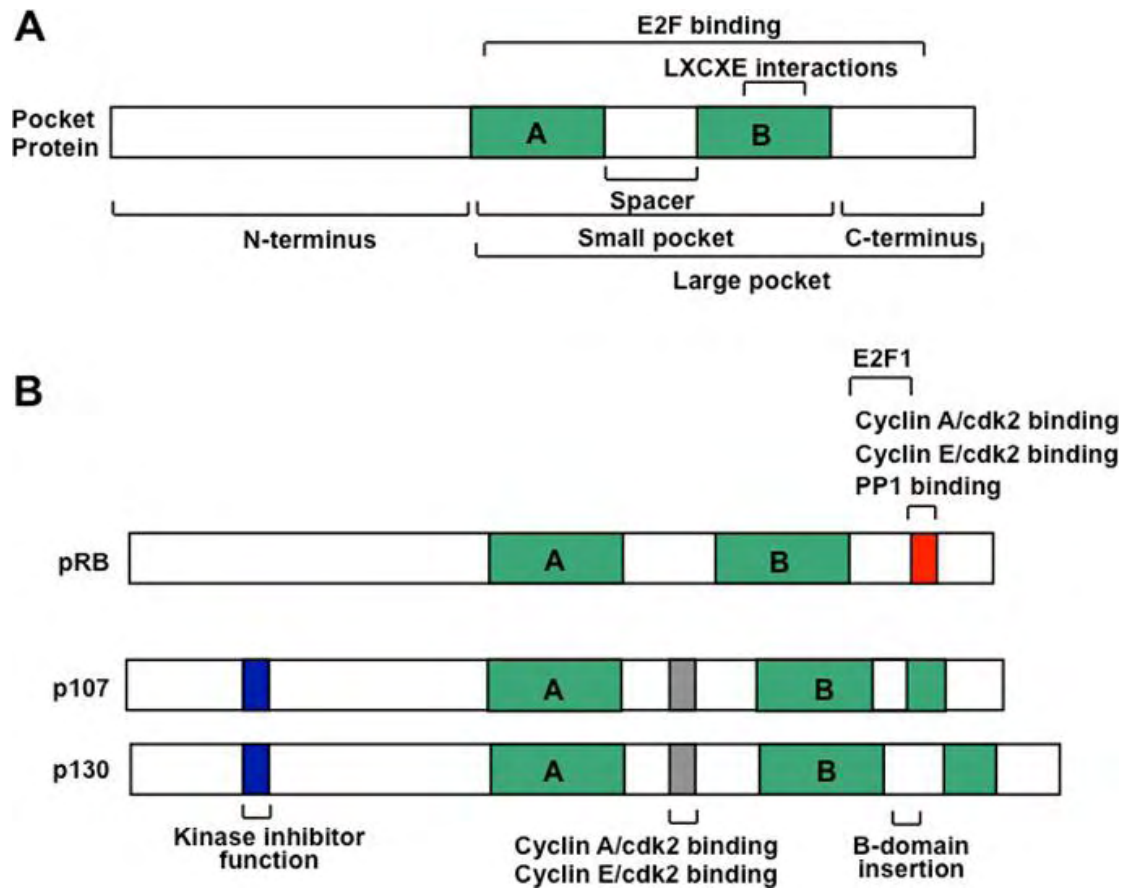
Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της pRB , όπου οι έλικες της περιοχής A απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, οι έλικες της περιοχής B απεικονίζονται με μπλε χρώμα και ο E2F και η E7 απεικονίζονται με κίτρινο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα (Xiao et al. 2003).

Παρόλο που η δομή της περιοχής “large pocket” είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των τριών πρωτεϊνών της οικογένειας RB, οι p107 και p130 έχουν περισσότερες ομοιότητες στην αλληλουχία τους από ότι με τη pRb. Παρά το γεγονός ότι η pRb θεωρείται η σημαντικότερη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, περιέχει λίγα προφανή δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία απουσιάζουν από τις πρωτεΐνες p107 και p130. Δύο από αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά της pRb, είναι πρώτον μια θέση δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F και δεύτερον μια πεπτιδική περιοχή στο C-τελικό άκρο που λειτουργεί ως θέση σύνδεσης κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) ή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1). Υπάρχουν όμως και βασικά δομικά χαρακτηριστικά που περιέχονται στις πρωτεΐνες p107 και p130 και λείπουν από τη pRb. Οι πρωτεΐνες p107 και p130 λοιπόν, περιέχουν παρεμβολές στην περιοχή B της “small pocket”. Στην p130 αυτή η επιπρόσθετη περιοχή υπόκειται σε ρυθμιστική φωσφορυλίωση που συμβάλει στη διατήρηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν μεγαλύτερες διαχωριστικές περιοχές από τη pRb, που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν σταθερά με συμπλέγματα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Τέλος, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν μια N-τελική περιοχή που χρησιμεύει στην αναστολή της δράσης των CDKs (Henley and Dick 2012).

1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRb

Η πρωτεΐνη Rb είναι ένας καταστολέας όγκων, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αρνητικό έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην ανάπτυξη του όγκου. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη Rb, είναι υπεύθυνη για ένα σημαντικό σημείο ελέγχου G1, μπλοκάροντας την εισαγωγή της S φάσης και την κυτταρική ανάπτυξη.

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας pRb και των παραγόντων μεταγραφής της οικογένειας E2F, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και την αντιγραφή του DNA, ελέγχοντας την έκφραση των γονιδίων (Giacinti and Giordano 2006).



Εικόνα 1.16 Σχηματική αναπαράσταση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης των pRB, p107 και p130. (A) Το κεντρικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας RB είναι το “pocket domain”. Αρχικά ορίστηκε ως η ελάχιστη περιοχή που είναι απαραίτητη για δέσμευση σε ικές ογκοπρωτεΐνες μέσω του μοτίβου LXCXE και χαρακτηρίζεται ως “small pocket” σε αυτό το διάγραμμα. Η περιοχή «large pocket» είναι η περιοχή καταστολής ανάπτυξης των πρωτεϊνών της οικογένειας RB αφού είναι ικανή να δεσμεύει τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F καθώς επίσης και τις ικές πρωτεΐνες. (B) Σύγκριση των δομών του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης για κάθε πρωτεΐνη της οικογένειας RB. Πρόσθετα χαρακτηριστικά που υπάρχουν στις p107 και p130 πρωτεΐνες είναι, η θέση αναστολής κινάσης, η θέση δέσμευσης κυκλίνης και μία εισαγωγή στην περιοχή B pocket. (Henley and Dick 2012)

1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1

Το ρετινοβλάστωμα, είναι ένας κακοήθης παιδικός καρκίνος του αμφιβληστροειδούς που εμφανίζεται με συχνότητα 1 στις 20.000. Η αναγνώριση των ογκογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο RB1, συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του καρκίνου σε άτομα με προδιάθεση εμφάνισης του ρετινοβλαστώματος.(Price et al. 2014)

Η ανάλυση του φάσματος των μεταλλάξεων του γονιδίου RB1, οδήγησε στα ακόλουθα αποτελέσματα:

1) Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος συχνά απενεργοποιείται από ελλείψεις και από nonsense μεταλλάξεις. Η κύρια αιτία, όμως, αδρανοποίησης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος είναι οι missense μεταλλάξεις.

2) Περίπου το 40% των γονιδιακών μεταλλάξεων του RB1 είναι επαναλαμβανόμενες και συγκεντρώνονται σε δεκαέξι “hotspots”, συμπεριλαμβανομένων δώδεκα nonsense μεταλλάξεων, δύο missense μεταλλάξεων και τριών μεταλλάξεων ματίσματος. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις είναι διάσπαρτες κατά μήκος του RB1, και εντοπίζονται συχνότερα στα εξόνια 9, 10, 14, 17, 18, 20 και 23.

3) Η ανάλυση των μεταλλάξεων του RB1 ανά χώρα προέλευσης των ασθενών ταυτοποιεί δύο ομάδες στις οποίες ο αριθμός των μεταλλάξεων missense, nonsense, ματίσματος και μεταλλάξεων που επηρεάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης διαφέρουν. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την εμπλοκή προδιάθεσης εθνικής προέλευσης.

4) Οι περισσότερες από τις αναφερόμενες μεταλλάξεις χωρίζονται σε τρεις ομάδες :

α) Μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές αλληλουχίες στον προαγωγό με αποτέλεσμα τη χαμηλή έκφραση της φυσιολογικής pRB.

β) Missense μεταλλάξεις που επηρεάζουν μοτίβα μη βασικών αλληλουχιών, που έχουν σαν αποτέλεσμα μερική απενεργοποίηση των λειτουργιών της Rb και τέλος

γ) Μεταλλάξεις ματίσματος που οδηγούν στη μείωση του κανονικού ματίσματος mRNA ή σε εναλλακτικό μάτισμα που οδηγεί σε “ελαττωματικά” αλληλόμορφα. (Valverde et al. 2005)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών του εξονίου 21 του γονιδίου RB1 σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό με στόχο την εύρεση πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Υλικά και μέθοδοι

3.1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 18 κλινικά δείγματα (θετικά για HPV-16) τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2010-2015 από το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αθηνών «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ», το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας και από ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep ή σε μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη.

Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο διαφορετικές ομάδες:

- 7 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 3.1)
- 11 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 3.2)

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
AG 3670	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
LG 212-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ATT 45	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
ATT 14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 1759-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LG 2085-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.1 Επτά κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
HG 1411-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
HG 626-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 2541-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 162-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 158-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
PNL 15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
HG 889-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
HG 1083	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.2 Έντεκα κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN).

Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 mL, προστέθηκαν 10 μl γλυκογόνου (-20° C), 300μl Lysis Buffer (GuSCN) και 100 μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20° C), οι πλαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν ισχυρά και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000 rcf στους 4 ° C. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε με 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις

14.000 rcf στους 4 ° C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού, ελεύθερου DNAσών και RNAσών.

Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20 ° C για μελλοντική χρήση.

3.3 Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων

Ο έλεγχος της εκχύλισης του DNA, έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Το PrimerMix που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε 25 pmol του κάθε εκκινητή για τη β-ακτίνη (b-actin F, b-actin R). Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl, που περιείχε τους εκκινητές, 1X Dream Taq buffer, 1mM dNTPs και 1,25 U Dream Taq.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 λεπτά. Για 40 κύκλους, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 55 °C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 72 °C για 1 λεπτό. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 λεπτά.

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')
β-actin F	AGCCATGTACGTTGCTATCC
β-actin R	TTGGCGTACAGGTCTTTGC

3.4. Ανάλυση πολυμορφισμών του εξονίου 21 του RB1

3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 21

Με τη μέθοδο της PCR, ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου RB1 μήκους 309 bp, το οποίο περιέχει το εξόνιο 21. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl τα οποία περιείχαν το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 25 pmol, 1mM dNTPs, 1.5

U Dream Taq DNA πολυμεράσης και 1X Dream Taq Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl₂.

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')
RBLB	GCCTTGGTGATTTGCATTTT
RBRB	CTCCTGAACAGCATGAGGAAG

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 λεπτά. Για 40 κύκλους, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 50 °C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 72 °C για 1 λεπτό. Τέλος ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 λεπτά.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (InvitrogenUltra-PureGelAgarose) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμίχθηκαν, σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης που περιέχει 50% σουκρόζη και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp

DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

Αφού εκτεθεί το πήκτωμα αγαρόζης σε ακτινοβολία UV, ακολουθεί η απομόνωση των προϊόντων της PCR. 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 Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα προϊόντα του καθαρισμού υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση.

3.4.4. Μοριακή κλωνοποίηση

Πριν την αλληλούχηση τμημάτων DNA είναι απαραίτητο να μην υπάρχουν μείγματα, τα οποία δυσχεραίνουν τη διαδικασία της αλληλούχησης και την επεξεργασία των χρωματογραφήματων. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: α) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, β) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων γ) Colony PCR (προαιρετικό στάδιο) δ) δημιουργία υγρών καλλιιεργειών ε) η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων στ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

α) Αντίδραση τοποϊσομεράσης: Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl pCR 2.1-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl

του καθαρισμένου προϊόντος της PCR . Η αντίδραση πραγματοποιείται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων : Η διαδικασία του μετασηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε ολόκληρη την ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η προσθήκη 800μl LB Broth και επώαζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1 h. Έπειτα επιστρώνουμε 100μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 1μl/ml αμπικιλίνη. Αφού προστεθούν 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA), ακολουθεί ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37 °C.

γ) Colony PCR : Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα επιπλέον βήμα ελέγχου του ανασυνδυασμού των πλασμιδιακών φορέων. Με την Colony PCR μπορούμε γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια να επιβεβαιώσουμε την ένθεση. Συγκεκριμένα, επιλέγουμε 2-3 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και δημιουργούμε εναιώρημα σε 15 μl ddH₂O για την κάθε αποικία. Έπειτα μεταφέρουμε 3 μl του εναιωρήματος σε πλαστικούς σωλήνες και πραγματοποιείται λύση των βακτηρίων με θέρμανση στους 95 °C για 10 min. Στη συνέχεια κάνουμε spin down τους πλαστικούς σωλήνες και τους τοποθετούμε στον πάγο για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθεται το MasterMix και πραγματοποιείται PCR. Το MasterMix περιέχει το ζεύγος εκκινητών RBLB-RBRB σε συγκέντρωση 25pmol, 1 mM dNTPs, 1,25U Dream Taq DNA πολυμεράσης και 1X Dream Taq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl₂.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες :

Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 λεπτά. Για 25 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 50 °C για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 °C για 1 λεπτό.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε το μοναδικό προϊόν στο μέγεθος του ενθέματος (309 bp).

δ) Δημιουργία υγρών καλλιεργειών: Αφού επιβεβαιωθεί ο ανασυνδυασμός των πλασμιδιακών φορέων μεταφέρουμε 3 μl από το κάθε εναιώρημα σε 2ml LB Broth με 1μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται ολονύχτια στους 37 °C στις 210 στροφές/min.

ε) Απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων : Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

στ) Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI : Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3-5μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε την ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος.

3.4.5. Αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρεία MacroGen (Amsterdam, the Netherlands).

3.4.6. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος κάθε χρωματογραφήματος για την ποιότητά του και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως προς την ειδικότητά τους αρχικά μέσω επεξεργασίας τους με το πρόγραμμα GeneRunner και έπειτα μέσω ομοπαράθεσης με το πρόγραμμα MEGA με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του RB1, η οποία είναι διαθέσιμη στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων NCBI. Με το πρόγραμμα MEGA ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των ιντρονίων πριν και μετά του εξονίου 21 και η πρωτεϊνική αλληλουχία του εξονίου 21.

3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS. Ο ρυθμός dN/dS είναι μία διαδεδομένη στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω της απλότητας και της αξιοπιστίας της. Ο λόγος dN/dS είναι ο ρυθμός που προσδιορίζει τον αριθμό των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά μη-συνώνυμη θέση (dN) προς τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά συνώνυμη θέση (dS) (Kryazhimskiy and Plotkin 2008).

Οι υποκαταστάσεις σε συνώνυμες (σιωπηλές) και μη συνώνυμες (μη σιωπηλές) θέσεις διαφοροποιούνται μεταξύ ουδέτερων και ενεργών εξελικτικών δυνάμεων που ασκούνται σε γονίδια. Ο ρυθμός dN/dS δίνει ένδειξη για τον τρόπο και την δύναμη της εξέλιξης. Πιο συγκεκριμένα, περίσσεια μη συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS > 1$) αποτελεί ένδειξη θετικής επιλεκτικής πίεσης (δρά η φυσική επιλογή), ενώ περίσσεια συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS < 1$) δείχνει αρνητική επιλεκτική πίεση (αναστολή της φυσικής επιλογής). Επιπλέον, καμία διαφορά μεταξύ συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS = 1$) αποτελεί ένδειξη ουδετερότητας (τυχαία σταθεροποίηση ουδέτερων μεταλλάξεων) (Nielsen 2005).

Για την αξιολόγηση της επιλεκτικής πίεσης που επιδρά στο εξόνιο 21 του γονιδίου RB1, χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος Μέγιστης Πιθανοφάνειας και η μέθοδος Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (empirical Bayesian). Η ανάλυση Μέγιστης

Πιθανοφάνειας εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο πιθανών επιπτώσεων (FEL) που ενσωματώνεται στην ηλεκτρονική πλατφόρμα λογισμικού Datamonkey για τον υπολογισμό του λόγου dN/dS. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και με τον υπολογισμό του λόγου dN/dS με τη μέθοδο Μέγιστης Πιθανοφάνειας μέσω του προγράμματος SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-synonymous Analysis Program) (Tsakogiannis et al. 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

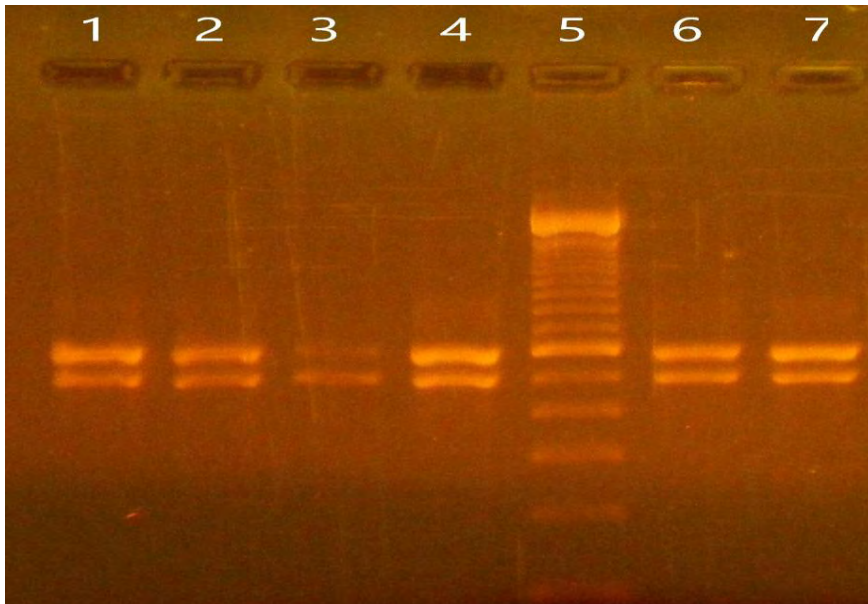
Αποτελέσματα

4.1 Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 18 κλινικά δείγματα (θετικά για HPV-16) τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep ή σε μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη.

4.2 Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων

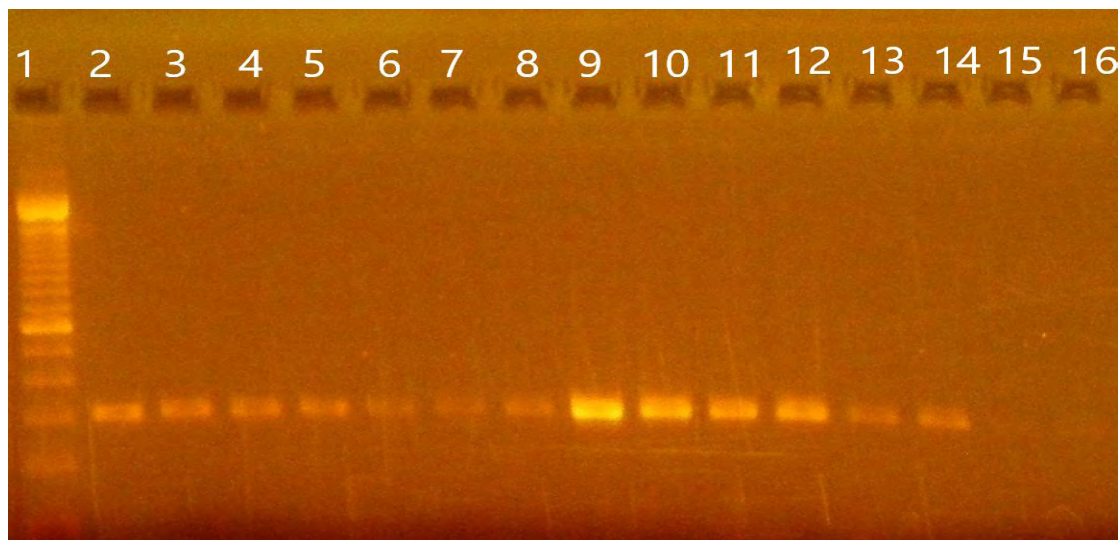
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA των ανωτέρων δειγμάτων με τη μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN). Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με εκκινητές τους b-actin F και b-actin R, διαπιστώθηκε πως η εκχύλιση του DNA των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.



Εικόνα 4.1 : Ενδεικτική φωτογραφία από την β-ακτίνη. Στη θέση **1**:AG 3500, **2**: ATT 14, **3**: HG 889-14, **4**: AG 3578, **6**: LG 1759-14, **7**: LG 2085-14 και στη θέση **5**: 100 bp DNA ladder.

4.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 21

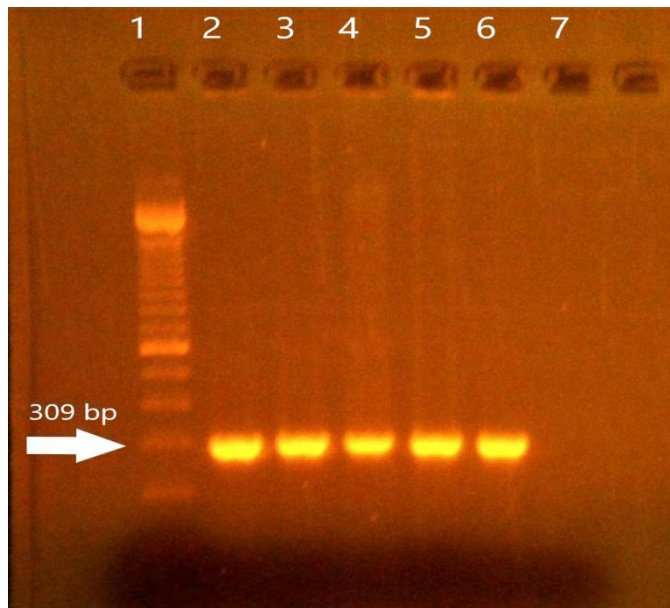
Με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους RBLB και RBRB, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 21 και στα 18 δείγματα.



Εικόνα 4.2 : Ενδεικτική φωτογραφία του αποτελέσματος PCR. Στη θέση **2**: AG 3629, **3**: AG 3591, **4**:HG 1411-14, **5**: HG 626-14, **6**: HG 2541-14, **7**: HG 162-15, **8**:HG 158-15, **9**: PNL 15, **10**: AG 3670, **11**: LG 212-15, **12**: ATT 45, **13**: AG 3500, **14**: ATT 14 και στη θέση **1**: 100 bp DNA ladder. Το προϊόν της PCR εμφανίζεται στα 309 bp.

4.4 Μοριακή κλωνοποίηση

Έχοντας προηγηθεί η αντίδραση τοποισομεράσης και ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, επιβεβαιώσαμε την ένθεση με τη μέθοδο της Colony PCR.

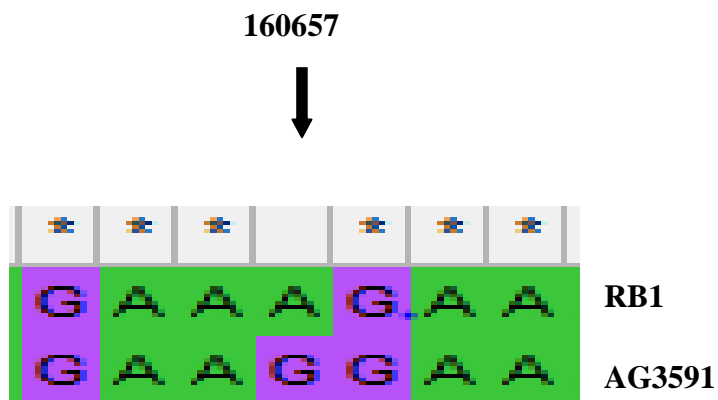


Εικόνα 4.3: Ενδεικτική φωτογραφία του αποτελέσματος της Colony PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 309 bp . Στη θέση **1:** 100 bp DNA ladder, **2:** AG 3629, **3:** AG 3591, **4:** ATT 45, **5:** ATT 14, **6:** AG 3500.

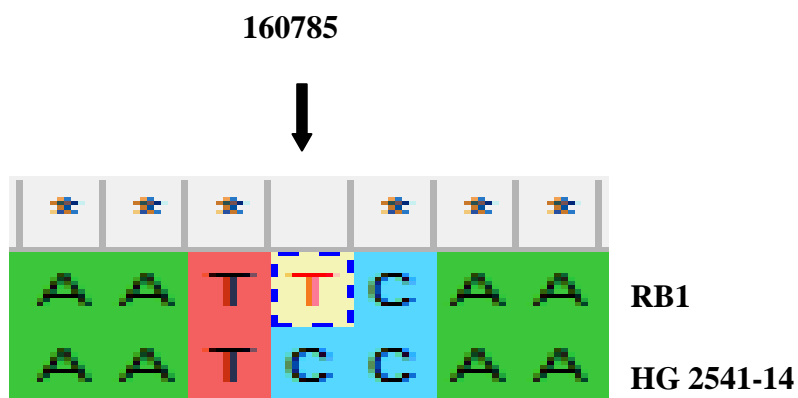
4.5 Νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 21 του RB1

Τα προϊόντα PCR αλληλουχήθηκαν και έπειτα μέσω πολλαπλής ομοπαράθεσης ,με το πρόγραμμα MEGA, με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος RB1, ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξονίου 21 και στο ιντρόνιο 20 πριν το εξόνιο 21.

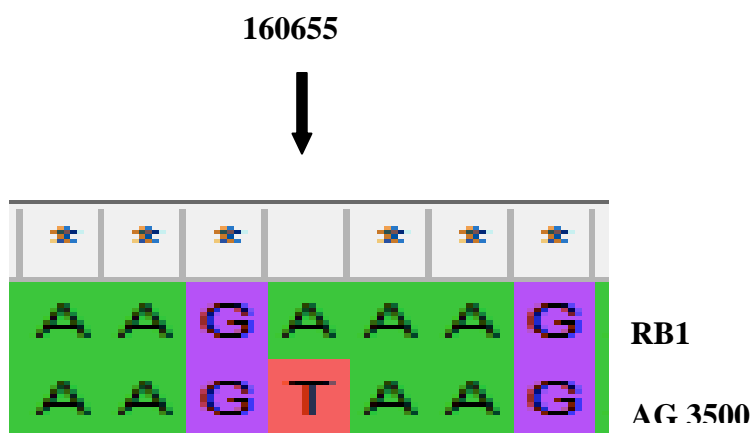
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται παρακάτω :



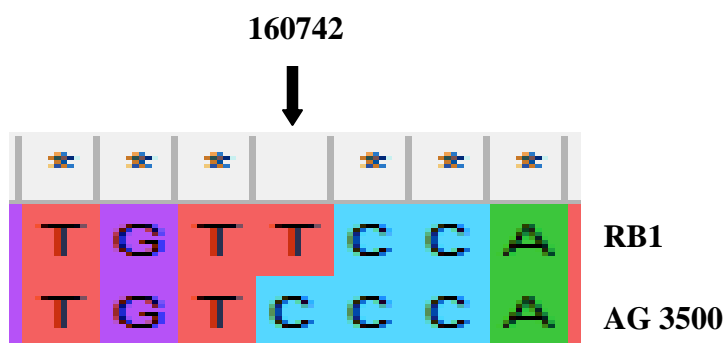
Εικόνα 4.4: Μετάλλαξη στο δείγμα AG 3591. Μετατροπή A σε G στη θέση 3762.



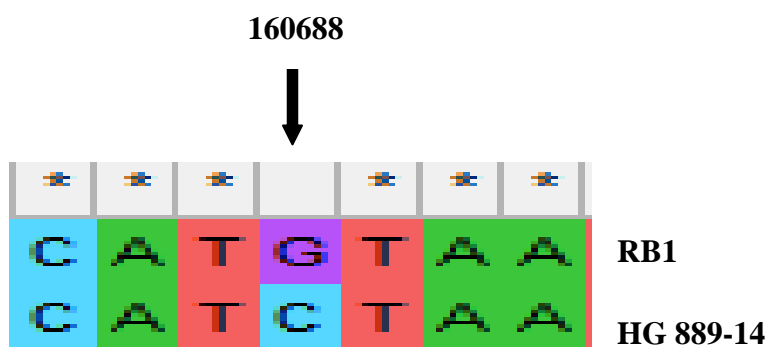
Εικόνα 4.5: Μετάλλαξη στο δείγμα HG 2541-14. Μετατροπή T σε C στη θέση 3890.



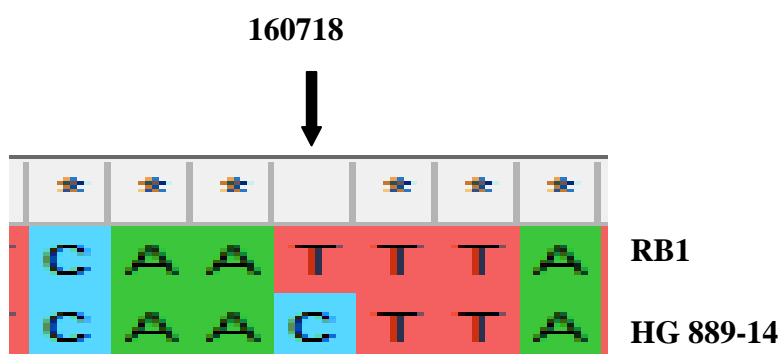
Εικόνα 4.6: Μετάλλαξη στο δείγμα AG 3500. Μετατροπή A σε T στη θέση 3760.



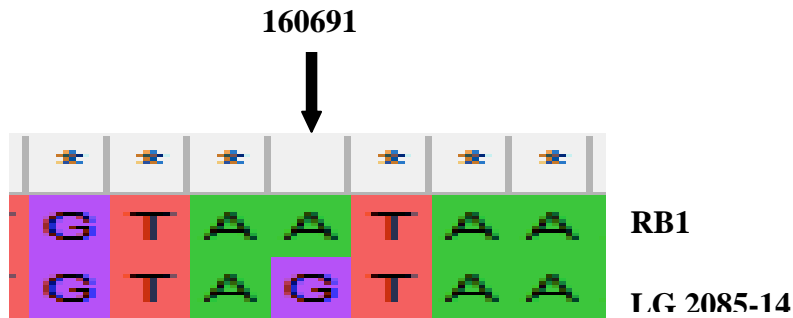
Εικόνα 4.7: Μετάλλαξη στο δείγμα AG 3500. Μετατροπή T σε C στη θέση 3847.



Εικόνα 4.8: Μετάλλαξη στο δείγμα HG 889-14. Μετατροπή G σε C στη θέση 3793.



Εικόνα 4.9: Μετάλλαξη στο δείγμα HG 889-14. Μετατροπή T σε C στη θέση 3823.

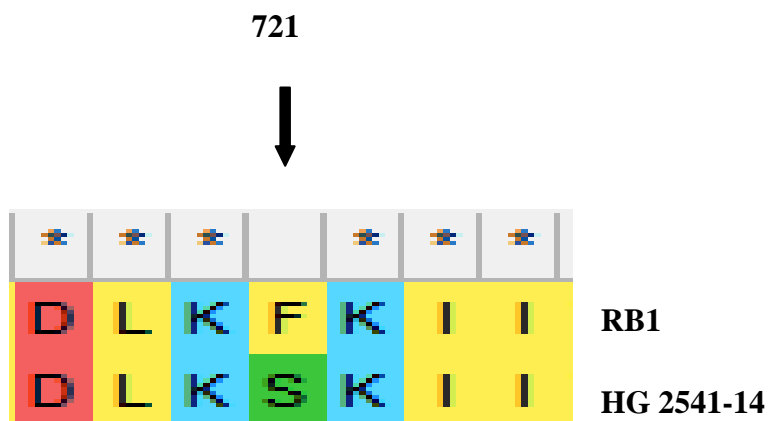


Εικόνα 4.10: Μετάλλαξη στο δείγμα LG 2085-14. Μετατροπή A σε G στη θέση 3796.

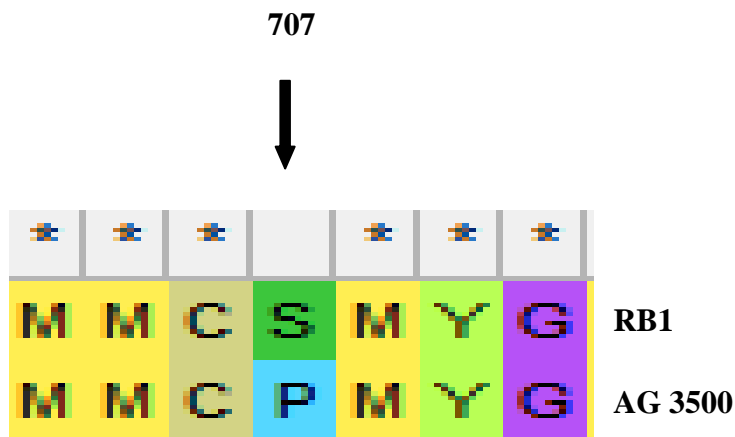
4.6 Αμινοξική ανάλυση στο εξόνιο 21 του RB1

Με το πρόγραμμα MEGA και την πρότυπη αλληλουχία ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στην αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 21 και στα 18 δείγματα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω :



Εικόνα 4.11: Μετάλλαξη στο δείγμα HG 2541-14. Μετατροπή F σε S.



Εικόνα 4.10: Μετάλλαξη στο δείγμα AG 3500. Μετατροπή S σε P

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Intron 20 (160526-160729)	Exon 21 (160730-160834)
AG 3591	A160657G	-
HG 2541-14	-	T160785C (F721S)
AG 3500	A160655T	T160742C (S707P)
HG 889-14	G160688C, T160718C	-
LG 2085-14	A160691G	-

Πίνακας 4.1: Οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο ιντρόνιο 20 (160526-160729) και στο εξόνιο 21(160730-160834) του γονιδίου RB1 μεταξύ των χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασιών. Αναφέρονται επίσης, στο εξόνιο 21, οι μεταλλάξεις αμινοξέων που επάγονται από τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις.

4.7 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 21 του γονιδίου RB1

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 21 πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS με την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας μέσω του προγράμματος SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-synonymous Analysis Program).

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της έρευνας, προέκυψε ότι οι αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες, επομένως δεν μπορέσαμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για την επιλεκτική πίεση που ασκείται σε κάθε ομάδα αλλοίωσης (HSIL, LSIL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη RB είναι μέλος της οικογένειας των ‘pocket’ πρωτεϊνών, στην οποία συμπεριλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες p107 και p130. Η πρωτεΐνη pRb διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αρνητικό έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, δεδομένου ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου G1, αναστέλλοντας τη μετάβαση από G1 σε S και στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη όγκου. Αρκετές έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι η πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων σχετίζονται είτε με μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο RB1, είτε με μεταλλάξεις σε γονίδια που συνδέονται με την RB. Δεδομένων των μεταλλάξεων στο RB1, έχει προταθεί ότι οι σημειακές μεταλλάξεις κατανέμονται σε όλο το γονίδιο, ενώ τα ‘hotspots’ των μεταλλάξεων είναι στις περιοχές κωδικοποίησης των εξονίων 12-23. Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο RB1, εμπλέκονται στην αγγειογένεση και στη μετάσταση. Επιπλέον, οι ιογενείς ογκοπρωτεΐνες εμπλέκονται στη δυσλειτουργία της οδού RB-E2F, οδηγώντας σε μια ποικιλία δυσπλασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του μεσοθηλιώματος και του λεμφώματος Burkitt, που σχετίζεται με το AIDS. (Giacinti and Giordano 2006)

Παρόλο που ο πολυμορφισμός στο γονίδιο RB1 έχει εξεταστεί σε σημαντικό βαθμό σε διάφορους τύπους καρκίνου, ο επιπολασμός των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στο γονίδιο RB1, καθώς και η σύνδεσή του με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, παραμένει μάλλον ασαφής. Αξιοσημείωτη είναι μια προηγούμενη μελέτη του Thakur (Thakur et al. 2012), που πρότεινε ότι ο νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός A153104G, ο οποίος βρίσκεται στο εξόνιο 18 του γονιδίου RB1, εμπλέκεται σε σημαντικό βαθμό στην αύξηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στον Ινδικό πληθυσμό.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση του νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του γονιδίου RB1 στον Ελληνικό πληθυσμό, προκειμένου να διασαφηνιστεί αν αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει την ευαισθησία ασθενών στην ανάπτυξη χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασιών που σχετίζονται με τον HPV 16.

Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 21 του γονιδίου του RB1 και των πλευρικών ιντρονικών αλληλουχιών του, προκειμένου να εξεταστεί η μεταβλητότητα αυτή στο γονίδιο του RB1 και πώς συνδέεται με το καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στον Ελληνικό πληθυσμό. Η παρούσα ανάλυση αποκάλυψε ότι ο νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός A153104G δεν επικρατεί στον Ελληνικό πληθυσμό, δεδομένου ότι δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πολυμορφισμός A153104G παρατηρήθηκε μόνο στους ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, που είναι θετικοί για διαφορετικά είδη καρκίνου. Λαμβάνοντας υπόψιν όλα αυτά τα στοιχεία, προβλέψαμε ότι οι διαφορετικοί πολυμορφισμοί που επικρατούν σε διάφορους γεωγραφικούς τόπους και έθνη, έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη όγκου σε πληθυσμούς με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στο γονίδιο RB1, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την έκβαση της μόλυνσης από HPV 16 και την πρόοδο της ασθένειας του τραχήλου της μήτρας σε συγκεκριμένους γεωγραφικούς πληθυσμούς.

Από τη νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 21 προέκυψαν 4 μεταλλάξεις σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (A160657G, T160785C, G160688C, T160718C) και 3 μεταλλάξεις σε δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (A160655T, T160742C, A160691G). Από την αμινοξική ανάλυση στο εξόνιο 21 του γονιδίου RB1, προέκυψαν 2 μεταλλάξεις, 1 σε δείγμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (F721S) και 1 σε δείγμα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (S707P).

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της έρευνας, προέκυψε ότι οι αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες, επομένως δεν μπορέσαμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για την επιλεκτική πίεση που ασκείται σε κάθε ομάδα αλλοίωσης (HSIL, LSIL). Πρέπει επομένως, να πραγματοποιηθούν περαιτέρω αναλύσεις για να αξιολογηθεί η κλινική σημασία της πολυμορφικής μεταβλητότητας του γονιδίου RB1, στην ανάπτυξη της δυσπλασίας του τραχήλου.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Bergvall, Monika, Thomas Melendy, and Jacques Archambault. 2013. "The E1 Proteins." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>.
- Buck, Christopher B., Diana V. Pastrana, Douglas R. Lowy, and John T. Schiller. 2004. "Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors." *Journal of Virology* 78 (2): 751–57. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.751-757.2004>.
- Bzhalava, Davit, Peng Guan, Silvia Franceschi, Joakim Dillner, and Gary Clifford. 2013. "A Systematic Review of the Prevalence of Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Types." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 224–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.015>.
- DiMaio, Daniel, and Lisa M. Petti. 2013. "The E5 Proteins." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006>.
- Doorbar, John. 2006. "Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer." *Clinical Science* 110 (5): 525–41. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>.
- Doorbar, John. 2013. "The E4 Protein; Structure, Function and Patterns of Expression." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 80–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>.
- Doorbar, John, Wim Quint, Lawrence Banks, Ignacio G. Bravo, Mark Stoler, Tom R. Broker, and Margaret A. Stanley. 2012. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30 (November): F55–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.
- El Mehdaoui, S., A. Touze, S. Laurent, P.-Y. Sizaret, D. Rasschaert, and P. Coursaget. 2000. "Gene Transfer Using Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsids with Genetically Modified DNA Encapsidation Capacity by Addition of Packaging Sequences from the L1 or L2 Protein of Human Papillomavirus Type 16." *Journal of Virology* 74 (22): 10332–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10332-10340.2000>.
- Giacinti, C., and A. Giordano. 2006. "RB and Cell Cycle Progression." *Oncogene* 25 (38): 5220–27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>.
- Grassmann, K., B. Rapp, H. Maschek, K. U. Petry, and T. Iftner. 1996. "Identification of a Differentiation-Inducible Promoter in the E7 Open Reading Frame of Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) in Raft Cultures of a New Cell Line Containing High Copy Numbers of Episomal HPV-16 DNA." *Journal of Virology* 70 (4): 2339–49.
- Harden, Mallory E., and Karl Munger. 2017. "Human Papillomavirus Molecular Biology." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 772 (April): 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>.
- Henley, Shauna A, and Frederick A Dick. 2012. "The Retinoblastoma Family of Proteins and Their Regulatory Functions in the Mammalian Cell Division Cycle." *Cell Division* 7 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-10>.
- Kines, R. C., C. D. Thompson, D. R. Lowy, J. T. Schiller, and P. M. Day. 2009. "The Initial Steps Leading to Papillomavirus Infection Occur on the Basement Membrane Prior to Cell Surface Binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (48): 20458–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908502106>.

- Kryazhimskiy, Sergey, and Joshua B. Plotkin. 2008. "The Population Genetics of DN/DS." *PLOS Genetics* 4 (12): e1000304. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000304>.
- Leng, X., J. H. Ludes-Meyers, and V. G. Wilson. 1997. "Isolation of an Amino-Terminal Region of Bovine Papillomavirus Type 1 E1 Protein That Retains Origin Binding and E2 Interaction Capacity." *Journal of Virology* 71 (1): 848–52.
- Lohmann, Dietmar R., Martin Gerick, Birgit Brandt, Ulrich Oelschläger, Birgit Lorenz, Eberhard Passarge, and Bernhard Horsthemke. 1997. "Constitutional RB1-Gene Mutations in Patients with Isolated Unilateral Retinoblastoma." *The American Journal of Human Genetics* 61 (2): 282–94. <https://doi.org/10.1086/514845>.
- Longworth, Michelle S, Regina Wilson, and Laimonis A Laimins. 2005. "HPV31 E7 Facilitates Replication by Activating E2F2 Transcription through Its Interaction with HDACs." *The EMBO Journal* 24 (10): 1821–30. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600651>.
- McBride, Alison A. 2008. "Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes." In *Advances in Virus Research*, 72:155–205. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00404-1).
- McBride, Alison A. 2013. "The Papillomavirus E2 Proteins." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>.
- McIntosh, P. B., P. Laskey, K. Sullivan, C. Davy, Q. Wang, D. J. Jackson, H. M. Griffin, and J. Doorbar. 2010. "E1^{E4}-Mediated Keratin Phosphorylation and Ubiquitylation: A Mechanism for Keratin Depletion in HPV16-Infected Epithelium." *Journal of Cell Science* 123 (16): 2810–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.061978>.
- McLaughlin-Drubin, Margaret E., and Karl Münger. 2009. "The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein." *Virology*, Small Viruses, Big Discoveries: The Interwoven Story of the Small DNA Tumor Viruses, 384 (2): 335–44. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>.
- Muñoz, Nubia, F. Xavier Bosch, Silvia de Sanjosé, Rolando Herrero, Xavier Castellsagué, Keerti V. Shah, Peter J.F. Snijders, and Chris J.L.M. Meijer. 2003. "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer." *New England Journal of Medicine* 348 (6): 518–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.
- Nielsen, Rasmus. 2005. "Molecular Signatures of Natural Selection." *Annual Review of Genetics* 39 (1): 197–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.112420>.
- Parkin, D.M, F.I Bray, and S.S Devesa. 2001. "Cancer Burden in the Year 2000. The Global Picture." *European Journal of Cancer* 37 (September): 4–66. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00267-2).
- Price, Elizabeth A, Kelly Price, Kelly Kolkiewicz, Simon Hack, M Ashwin Reddy, John L Hungerford, Judith E Kingston, and Zerrin Onadim. 2014. "Spectrum of RB1 Mutations Identified in 403 Retinoblastoma Patients." *Journal of Medical Genetics* 51 (3): 208–14. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101821>.
- Roman, Ann, and Karl Munger. 2013. "The Papillomavirus E7 Proteins." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 138–68. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>.

- Schiller, John T., Patricia M. Day, and Rhonda C. Kines. 2010. "Current Understanding of the Mechanism of HPV Infection." *Gynecologic Oncology* 118 (1): S12–17. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.004>.
- Schmitz, Martina, Corina Driesch, Lars Jansen, Ingo B. Runnebaum, and Matthias Dürst. 2012. "Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer." Edited by Alejandro H. Corvalan. *PLoS ONE* 7 (6): e39632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039632>.
- Smotkin, D., and F. O. Wettstein. 1986. "Transcription of Human Papillomavirus Type 16 Early Genes in a Cervical Cancer and a Cancer-Derived Cell Line and Identification of the E7 Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (13): 4680–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4680>.
- Solomon, Diane, Diane Davey, Robert Kurman, Ann Moriarty, Dennis O'Connor, Marianne Prey, Stephen Raab, et al. 2002. "The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology." *JAMA* 287 (16): 2114–19. <https://doi.org/10.1001/jama.287.16.2114>.
- Stanley, Margaret. 2008. "The Epidemiology and Burden of HPV Disease." *Nursing Times*. 2008. <https://www.nursingtimes.net/the-epidemiology-and-burden-of-hpv-disease/1839049.article>.
- Thakur, Nisha, Showket Hussain, Vilas Nasare, Bhudev C. Das, Seemi Farhat Basir, and Mausumi Bharadwaj. 2012. "Association Analysis of P16 (CDKN2A) and RB1 Polymorphisms with Susceptibility to Cervical Cancer in Indian Population | SpringerLink." 2012. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-011-0752-z>.
- Tsakogiannis, D., G. D. Moschonas, M. Daskou, Z. Stylianidou, Z. Kyriakopoulou, C. Kottaridi, T. G. Dimitriou, C. Gartzonika, and P. Markoulatos. 2018. "Polymorphic Variability in the Exon 19 of the RB1 Gene and Its Flanking Intronic Sequences in HPV16-Associated Precancerous Lesions in the Greek Population." *Journal of Medical Microbiology* 67 (11): 1638–44. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000843>.
- Tsakogiannis, D., I. G. A. Ruether, Z. Kyriakopoulou, V. Pliaka, V. Skordas, C. Gartzonika, S. Levidiotou-Stefanou, and P. Markoulatos. 2012. "Molecular and Phylogenetic Analysis of the HPV 16 E4 Gene in Cervical Lesions from Women in Greece." *Archives of Virology* 157 (9): 1729–39. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1356-1>.
- Valverde, José R., Javier Alonso, Itziar Palacios, and Ángel Pestaña. 2005. "RB1 Gene Mutation Up-Date, a Meta-Analysis Based on 932 Reported Mutations Available in a Searchable Database." *BMC Genetics* 6 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-53>.
- Van Doorslaer, Koenraad. 2013. "Evolution of the Papillomaviridae." *Virology* 445 (1–2): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>.
- Vande Pol, Scott B., and Aloysius J. Klingelutz. 2013. "Papillomavirus E6 Oncoproteins." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 115–37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>.
- Villiers, Ethel-Michele de. 2013. "Cross-Roads in the Classification of Papillomaviruses." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.023>.
- Villiers, Ethel-Michele de, Claude Fauquet, Thomas R Broker, Hans-Ulrich Bernard, and Harald zur Hausen. 2004. "Classification of Papillomaviruses." *Virology* 324 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.

- Wang, Joshua W., and Richard B. S. Roden. 2013. "L2, the Minor Capsid Protein of Papillomavirus." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 175–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.017>.
- Xiao, Bing, James Spencer, Adrienne Clements, Nadeem Ali-Khan, Sibylle Mitnacht, Cristina Broceño, Manfred Burghammer, Anastassis Perrakis, Ronen Marmorstein, and Steven J. Gamblin. 2003. "Crystal Structure of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein Bound to E2F and the Molecular Basis of Its Regulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5): 2363–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436813100>.
- Xu, Bo, Sasithorn Chotewutmontri, Stephan Wolf, Ursula Klos, Martina Schmitz, Matthias Dürst, and Elisabeth Schwarz. 2013. "Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas." Edited by Torbjörn Ramqvist. *PLoS ONE* 8 (6): e66693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066693>.
- Yugawa, Takashi, and Tohru Kiyono. 2009. "Molecular Mechanisms of Cervical Carcinogenesis by High-Risk Human Papillomaviruses: Novel Functions of E6 and E7 Oncoproteins." *Reviews in Medical Virology* 19 (2): 97–113. <https://doi.org/10.1002/rmv.605>.
- Zerfass, K., A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein, and P. Jansen-Dürr. 1995. "Sequential Activation of Cyclin E and Cyclin A Gene Expression by Human Papillomavirus Type 16 E7 through Sequences Necessary for Transformation." *Journal of Virology* 69 (10): 6389–99.
- Zheng, Zhi-Ming. 2006. "Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation." *Frontiers in Bioscience* 11 (1): 2286. <https://doi.org/10.2741/1971>.