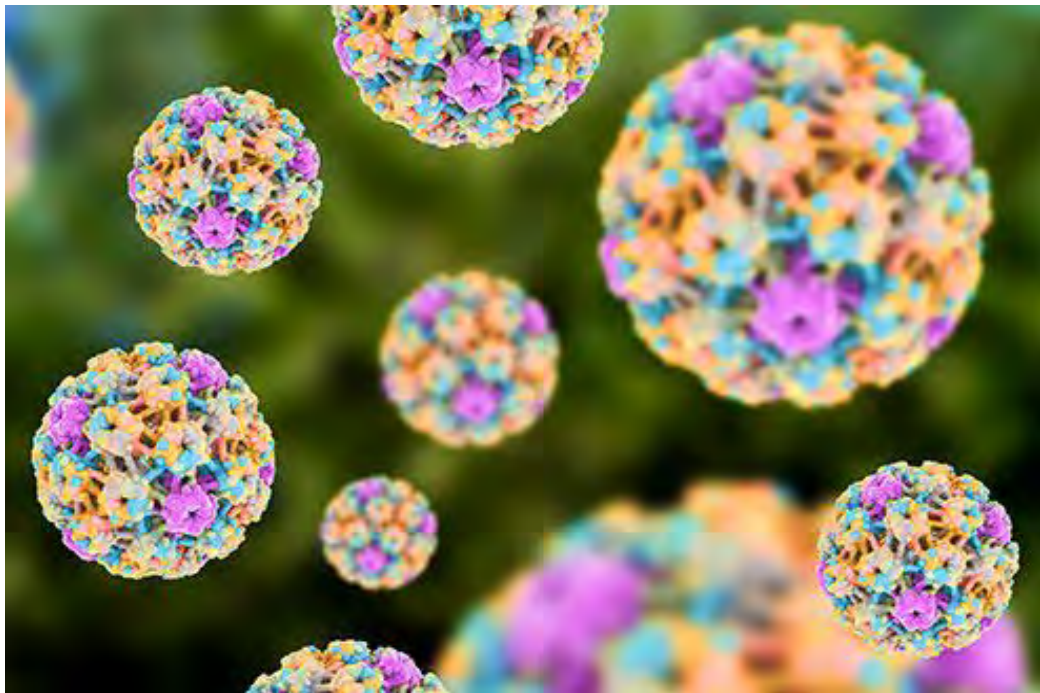


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ -
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

REAL TIME PCR ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ
ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΟ
ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ HPV 16 ΚΑΙ HPV 18



ΑΛΕΞΙΟΥ ΣΤΑΜΑΤΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2019

Real Time PCR και συσχέτιση του ιικού φορτίου με το βαθμό δυσπλασίας προκαλούμενο από τους ιούς

HPV 16 και HPV 18

Real Time PCR and correlation between viral load and grade of lesion caused by HPV 16 and HPV 18

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: 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

Τ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): ΣΥΜΒΑΣΙΟΥΧΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας από τον Οκτώβριο του 2018 έως τον Ιούνιο του 2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για τη συνεχή ενθάρρυνση και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το συμβασιούχο διδάσκοντα κ. Δημητρίου Τηλέμαχο για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη του και την άψογη συνεργασία που αναπτύχθηκε μεταξύ μας καθώς και τον επίκουρο καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Δάσκου Μαρία για τη συνεχή στήριξη και βοήθειά της καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε μεταξύ μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο Εισαγωγή	7
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ιών HPV	7
1.2 Ταξινόμηση των ιών HPV.....	8
1.3 Δομή των ιικών σωματιδίων	10
1.4 Γενωμική οργάνωση των Human Papillomaviruses	11
1.4.1 Λειτουργικές πρωτεΐνες	12
1.4.1.i Η ιική πρωτεΐνη E1	12
1.4.1.ii Η ιική πρωτεΐνη E2	15
1.4.1.iii Η ιική πρωτεΐνη E4	17
1.4.1.iv Η ιική πρωτεΐνη E5	19
1.4.1.v Η ιική πρωτεΐνη E6	20
1.4.1.vi Η ιική πρωτεΐνη E7	23
1.4.2 Δομικές πρωτεΐνες.....	26
1.4.2.i Η ιική πρωτεΐνη L1.....	26
1.4.2.ii Η ιική πρωτεΐνη L2.....	27
1.4.3 Long control region (LCR)	28
1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος	29
1.6 Κύκλος ζωής των HPV.....	31
1.6.1 Είσοδος στο κύτταρο ξενιστή και απέκδυση	32
1.6.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος	33
1.6.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	34
1.6.4 Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση ιοσωματίων	34
1.7 Κλινικά συμπτώματα - Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο Σκοπός	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο Υλικά και μέθοδοι	39
3.1 Κλινικά δείγματα	39
3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep.....	42
3.3 Έλεγχος εκχύλισης.....	42
3.4 Μοριακή κλωνοποίηση για κατασκευή των πλασμιδίων HPV16, E6 και HPV18, E6	44
3.5 Real time PCR σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις των πλασμιδίων	47
3.6 Real time PCR στα κλινικά δείγματα	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο Αποτελέσματα.....	51
4.1 PCR για τον έλεγχο της εκχύλισης.....	51
4.2 Colony PCR	52
4.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	53
4.4 Real time PCR στα κλινικά δείγματα	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο Συζήτηση	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο Βιβλιογραφία.....	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι HPVs (Human Papillomaviruses) είναι ιοί μικρής διαμέτρου (55 nm) χωρίς λιπιδικό έλυτρο και ανήκουν στην οικογένεια των ιών papilloma. Στον άνθρωπο διακρίνονται πέντε γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu) και έως σήμερα έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 150 HPVs. Προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας τόσο του επιθηλίου του δέρματος όσο και του βλεννογόνου και για το λόγο αυτό, η είσοδος τους στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή απαιτεί κάποιο μικροτραυματισμό. Μετά τη μόλυνση, ο ιός ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή. Ορισμένοι τύποι του ιού προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις καθώς πολλαπλασιάζονται αργά και καταφέρνουν να διατηρούν ένα χαμηλό αριθμό αντιγράφων στα κύτταρα του ξενιστή. Ωστόσο κάποιες φορές, η εμμένουσα μόλυνση από HPV μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση κάποιων ασθενειών με πιο συχνές, στην περίπτωση μόλυνσης από ιούς χαμηλού κινδύνου, τα κονδυλώματα και τις μυρμηγκιές. Η μόλυνση από HPVs υψηλού κινδύνου και κυρίως από τους HPV 16 και HPV 18 μπορεί να οδηγήσει πιο σπάνια σε τραχηλικές δυσπλασίες ή ακόμα και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως.

Το γονιδίωμά τους είναι ένα κυκλικό δίκλωνο DNA που αποτελείται από 3 περιοχές: α) την περιοχή early που κωδικοποιεί για τα πρώιμα γονίδια, β) την περιοχή late στην οποία εντοπίζονται τα όψιμα γονίδια και γ) την περιοχή LCR (Long Control Region) της οποίας ο ρόλος είναι κυρίως ρυθμιστικός. Συνήθως στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή εντοπίζονται ως επίσωμα, ωστόσο σε περιπτώσεις καρκίνου το γονιδίωμα εντοπίζεται κυρίως ενσωματωμένο.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του αριθμού των ιικών αντιγράφων των HPV16 και 18 μέσω Real Time PCR και η συσχέτισή της με το βαθμό αλλοίωσης του επιθηλιακού ιστού του τραχήλου της μήτρας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 98 κλινικά δείγματα (56 θετικά ως προς τον HPV 16, 29 θετικά ως προς τον HPV 18 και 12 αρνητικά ως προς τα δύο είδη ιών) και πραγματοποιήθηκε συγκριτική Real Time PCR για τον προσδιορισμό του αριθμού των ιικών ογκογονιδίων E6 με βάση τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των ιικών αντιγράφων είναι αυξημένος σε δείγματα που προέρχονται από αλλοιωμένο ιστό του επιθηλίου στον τράχηλο της μήτρας, καθώς και ότι τα αντίγραφα αυτά αυξάνονται όσο αυξάνεται και ο βαθμός αλλοίωσης.

ABSTRACT

HPVs (Human Papillomaviruses) are small (55nm), non-enveloped viruses, belonging to Papillomaviridae family. Five genera (Alpha, Beta, Gamma, Mu and Nu) are distinguished in humans and today are identified more than 150 HPVs genotypes. They infect basal cells of mucosal and cutaneous epithelium and their entrance into host cells requires the presence of a microtrusion. After infection, virus follows the program of host cells differentiation. Some types of virus cause asymptomatic infections and they manage to maintain a low number of copies into host cells. However, persistent infection of Low risk HPVs causes diseases like common warts. Infection with high risk types, mainly HPV 16 and HPV 18, leads to cervical dysplasia and even to cervical cancer, the second most frequently appearing cancer type worldwide.

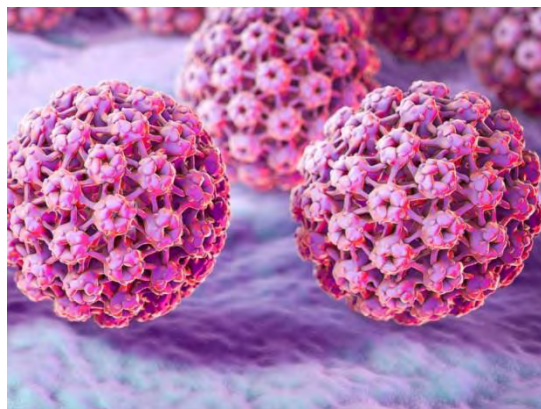
HPVs carries a double- stranded, circular DNA composed of three regions: a) early region where are located early genes, b) late region where are located late genes and c) LCR (Long Control Region) that regulates the expression of viral genes. Into host cells viral genome is usually found as episome but in cervical cancer is integrated and eventually is found under both forms.

The purpose of this study was the detection of viral copy number of E6 gene (for HPV 16 and HPV 18) with Real Time PCR method and its correlation with the grade of cervical lesions. For this reason, 98 clinical samples (56 positive for HPV 16, 29 positive for HPV 18 and 12 negative controls) were used. Viral oncogenes E6 copies number were normalized by comparison of GAPDH gene by comparative Real Time PCR.

The results of the present study revealed that viral copy number is increased in samples with increased cervical dysplasia lesions for both high risk viruses HPV16 and HPV18.

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ιών HPV

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) είναι μικροί ιοί, χωρίς φάκελο, με διάμετρο ~ 55 nm. Το καψίδιό τους είναι εικοσαεδρικής δομής και το γονιδίωμά τους είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους ~ 8.000 bp και μπορεί να διακριθεί σε 3 περιοχές: early, late και LCR [1].



Εικόνα 1 Απεικόνιση του ιού HPV σε ηλεκτρονικό υπολογιστή

Ανήκουν στην οικογένεια papillomaviridae και αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα καθώς ο ιός για να καταφέρει να αναπαραχθεί, θα πρέπει να χρησιμοποιήσει τους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς του ξενιστή του [2]. Περισσότεροι από 200 ιοί papilloma έχουν ταυτοποιηθεί και το γονιδίωμά τους έχει αλληλουχηθεί, εκ των οποίων οι 150 ανήκουν στους HPVs [3]. Αποτελούν μία απ' τις πιο κοινές αιτίες σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων παγκοσμίως τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες και μολύνουν συχνότερα νεαρούς ενήλικες στην αρχή της σεξουαλικής τους ζωής [4].

Οι HPVs προσβάλλουν τα βασικά κύτταρα της στοιβάδας του επιθηλίου τόσο του δέρματος όσο και του βλεννογόνου. Αυτοί οι οποίοι μολύνουν το επιθήλιο του δέρματος εντοπίζονται κυρίως στα χέρια και τα πόδια, ενώ αυτοί που μολύνουν το βλεννογόνο, στη στοματική κοιλότητα, το λάρυγγα καθώς και στο βλεννογόνο της αναπνευστικής οδού και των γεννητικών οργάνων [5].

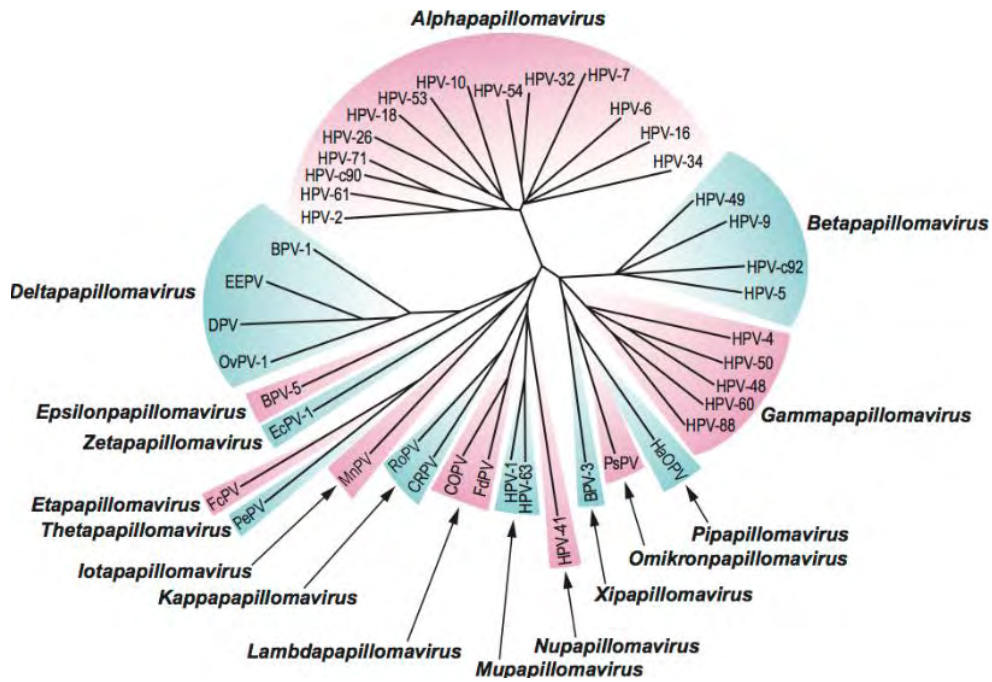
Προκαλούν αλλοιώσεις του επιθηλίου οι οποίες ποικίλουν από τα κοινά κονδυλώματα και μυρμηγκιές έως και τραχηλικές δυσπλασίες και καρκίνο [6]. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) ο καρκίνος του τραχήλου της

μήτρας, είναι ο τέταρτος πιο συχνός τύπος καρκίνου που εμφανίζεται στις γυναίκες και εκτιμάται ότι το 2018 υπήρξαν 570.000 νέες περιπτώσεις που αποτελούν το 6,6 % των θανάτων που οφειλόταν σε καρκίνο. Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο περίπου 311.000 γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας εκ' των οποίων το 85% αφορά γυναίκες που ζουν σε υπανάπτυκτες περιοχές όπου είναι δύσκολος ο εμβολιασμός των κοριτσιών και ο έλεγχος των γυναικών για μόλυνση από HPV [65].

1.2 Ταξινόμηση των ιών HPV

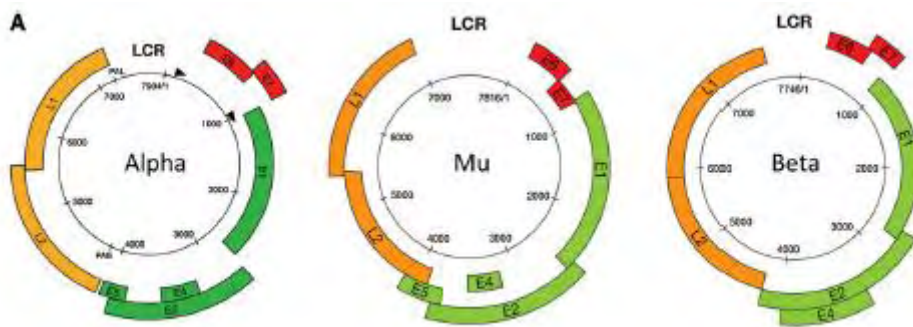
Μέχρι σήμερα έχουν αλληλουχηθεί πλήρως τα γονιδιώματα περισσότερων από 150 HPVs μαζί με περίπου 60 PVs (papillomaviruses). Η παρουσία ιών papilloma στα θηλαστικά καθώς και σε άλλους ξενιστές συμπεριλαμβανομένων πουλιά, χελώνες και φίδια υποδεικνύει ότι ίσως να υπάρχουν σε όλα τα σημερινά αμνιοτά. Θεωρείται ότι έχουν εμφανιστεί πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη και αρχικά διαχωρίστηκαν με βάση νουκλεοτιδικές διαφορές που παρουσίασαν τα γονιδιώματά τους σε σχέση με άλλα ιικά γονιδιώματα [9].

Όταν οι ιοί αυτοί ήταν δυνατόν να παρατηρηθούν μόνο σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς και με βασικές τεχνικές μοριακής ανάλυσης, είχαν ταξινομηθεί στην ίδια οικογένεια με τους ιούς papov. Η παρατήρηση αυτή έγινε καθώς και οι δύο αυτές οικογένειες ιών ήταν οι μόνες των οποίων το γονιδίωμα ήταν δίκλωνο κυκλικό DNA και αποτελούνταν από καψίδια εικοσαεδρικής συμμετρίας χωρίς επιπλέον έλυτρο. Στη συνέχεια (1980) όταν αναπτύχθηκαν τεχνικές αλληλούχησης και άλλες προηγμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας, παρατηρήθηκε ότι α) το γονιδίωμα των polyomaviruses είχε μέγεθος 5 kb, ενώ αυτό των papillomaviruses 8 kb και β) οι ιοί αυτοί δεν παρουσιάζουν στο γονιδίωμά τους κάποιο σημαντικό ποσοστό ομοιότητας νουκλεοτιδικής ή αμινοξικής αλληλουχίας εκτός από κάποιες μικρές ομόλογες περιοχές που κωδικοποιούν για T-αντιγόνα και γονίδια E1. Έτσι, οι papillomaviruses αναγνωρίστηκαν επίσημα σαν ξεχωριστή οικογένεια από το ICTV (International Council on Taxonomy of Viruses)[10]. Έχουν ταξινομηθεί σε 16 γένη με βάση την αλληλουχία του DNA τους, παρουσιάζουν διαφορές στον κύκλο ζωής τους και προκαλούν διαφορετικές ασθένειες [7].



Εικόνα 2 Φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει τα 16 γένη των ιών papilloma (ICTV 9th C Report,2011)

Η ταξινόμησή τους βασίζεται στην αλληλουχία του γονιδίου L1 το οποίο κωδικοποιεί για την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού και αποτελεί το πιο καλά συντηρημένο γονιδιό του. Για να ανήκουν δύο ιοί στο ίδιο γένος, θα πρέπει να παρουσιάζουν περισσότερο από 60% ομολογία στην αλληλουχία του γονιδίου L1 [18]. Με βάση το διαχωρισμό αυτό, διακρίνονται πέντε γένη στον άνθρωπο: Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu [11].

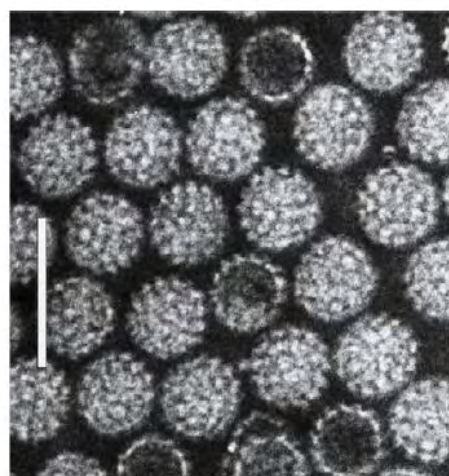


Εικόνα 3 Τυπική οργάνωση του γονιδιώματος των High-risk HPV. Παρ'όλο που έχουν μία κοινή οργάνωση, το μέγεθος και η θέση των ORFs ποικίλλουν. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις των κύριων υποκινητών. [3]

Οι ιοί αυτοί έχουν επίσης ταξινομηθεί με βάση την πιθανότητα να προκαλέσουν το σχηματισμό κάποιου κακοήθους νεοπλασματος σε high-risk και low-risk. Οι low-risk HPVs (6, 11, 26, 31, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 79, 81, 82, 83, και 84) τυπικά προκαλούν καλοήθεις όγκους ενώ οι high-risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 66, 68, και 69) είναι ικανοί να επάγουν το σχηματισμό κακοήθων όγκων. Επιπλέον, έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση την περιοχή στην οποία εντοπίζονται σε ιούς που προσβάλλουν α) το επιθήλιο του δέρματος (1, 5, 8, 14, 20, 21, 25 και 47) β) το επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου (2 and 57) και γ) το επιθήλιο του βλεννογόνου (11, 13, 16, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 49, 51, 52, 56, 58 και 68). Από τους high-risk ιούς, υπεύθυνοι για τη δημιουργία καρκίνου θεωρούνται κυρίως οι HPV-16 και HPV-18 [8].

1.3 Δομή των ιικών σωματιδίων

Τα καψίδια των ιών HPV έχουν διάμετρο 50-60 nm, είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας και δεν περικλείονται από επιπλέον εξωτερικό περίβλημα. Κάθε καψίδιο περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδιώματος του ιού, το οποίο συνδέεται με πρωτεΐνες οι οποίες είναι όμοιες με την ιστόνη. Κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η L1, η οποία εντοπίζεται σε 360 αντίγραφα τα οποία οργανώνονται σε 72 καψομερή καθένα απ' τα οποία περιέχει 5 μονομερή της L1 55 kDa το καθένα [5]. Η πρωτεΐνη L1 έχει δομή β-βαρελιού και η αλληλεπίδραση μεταξύ των καψομερών, γίνεται μέσω του C-τελικού άκρου της L1 με δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι σταθεροποιούν το καψίδιο [3]. Τα καψίδια επίσης περιέχουν σε μικρότερη ποσότητα την πρωτεΐνη L2 μεγέθους 75 kDa η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του ιοσωματίου εκτός από 120 αμινοξέα του N-τελικού άκρου της που εκτίθενται στην επιφάνεια. Τα αντίγραφα

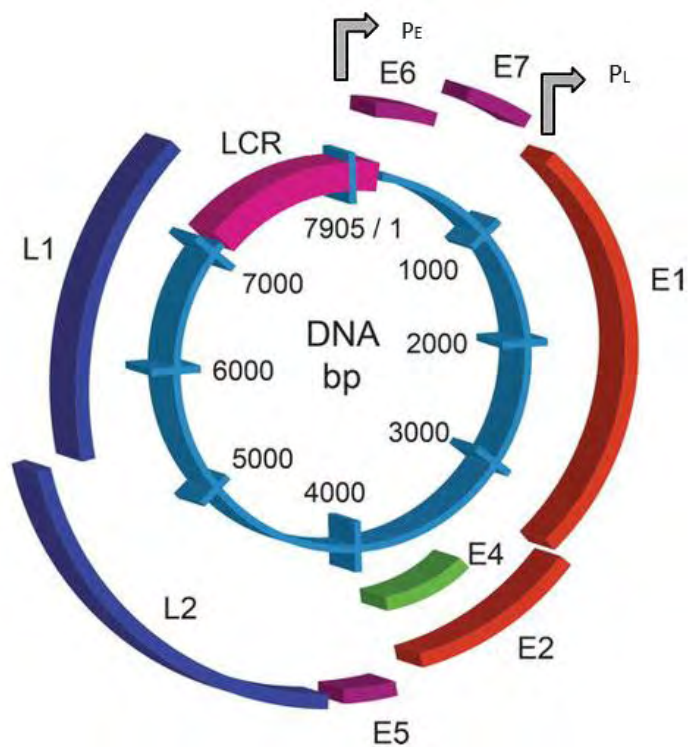


Εικόνα 4 Μικρογραφία ιοσωματίων HPV σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ICTV, 9th report, 2012)

της L2 εντοπίζονται στο κέντρο των πενταμερών που σχηματίζονται από μονομερή της L1 [3, 5].

1.4 Γενωμική οργάνωση των Human Papillomaviruses

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονιδίωμα των ιών HPV αποτελείται από ένα μόριο δίκλωνου, κυκλικού DNA μεγέθους περίπου 8000 bp το οποίο περιλαμβάνει περίπου 8 ORFs (open reading frames) [4]. Το γονιδίωμα, μπορεί να διακριθεί σε 3 περιοχές: α) την πρώιμη (early) η οποία περιέχει 8 ORFs (E1-E8) και κωδικοποιεί για μη δομικές πρωτεΐνες β) την όψιμη (late) η οποία κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του καψιδίου L1,L2 και γ) την LCR (long control region) ο ρόλος της οποίας είναι ρυθμιστικός [1]. Η περιοχή late καλύπτει περίπου το 40% του ιικού γονιδιώματος και βρίσκεται καθοδικά της περιοχής early. Ανοδικά της περιοχής early εντοπίζεται η LCR μεγέθους περίπου 850 bp [13].



Εικόνα 5 Οργάνωση του γονιδιώματος του HPV. Με βέλη υποδεικνύονται οι υποκινητές των early και late γονιδίων

Παρά την ποικιλομορφία στον αριθμό και το μέγεθος των ORFs, όλοι οι papillomaviruses περιέχουν πολύ καλά συντηρημένα γονίδια που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA (E1,E2), και στο πακετάρισμα των καψιδίων (L1,L2). Μεγαλύτερη ποικιλομορφία εντοπίζεται στα υπόλοιπα γονίδια (E4,E5,E6,E7) τα οποία είναι απαραίτητα για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, την αποφυγή των μηχανισμών του ανοσοποιητικού του και την απελευθέρωση του ιού μετά την ολοκλήρωση του κύκλου αντιγραφής του[3].

Πίνακας 1 Περιληπτικά, οι λειτουργίες των δομικών και λειτουργικών περιοχών του γονιδιώματος των HPVs

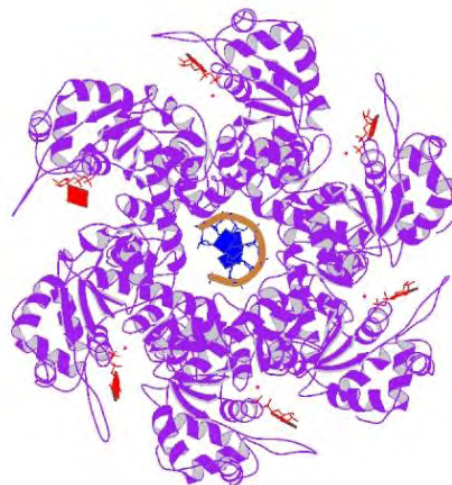
Πρωτεΐνη	Λειτουργία
E1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ξεκινά την αντιγραφή του γονιδιώματος, ▪ Ενεργοποιεί μία ελικάση ▪ Διατηρεί το ιικό DNA σε επισωμική μορφή
E2	Εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή
E3	Άγνωστη
E4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διευκολύνει το πακετάρισμα των ιικών γονιδιωμάτων και την ωρίμανση των ιικών σωματιδίων ▪ Αλληλεπιδρά με μία ελικάση του RNA
E5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα EGF και ενεργοποιεί τον υποδοχέα PDGF ▪ Ογκοπρωτεΐνη που επιτρέπει το συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ξενιστή και καθυστερεί τη διαφοροποίηση
E6	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Μπλοκάρει το φυσιολογικό διαχωρισμό των κυττάρων του ξενιστή ▪ Εξασθενεί τη λειτουργία της p53 μέσω της E6-AP ▪ Αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του ξενιστή ▪ Κύρια ογκοπρωτεΐνη
E7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Μπλοκάρει το φυσιολογικό διαχωρισμό των κυττάρων του ξενιστή ▪ Αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του ξενιστή ▪ Κύρια ογκοπρωτεΐνη.
E8	Άγνωστη
L1	Κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου.
L2	Δευτερεύουσα πρωτεΐνη του καψιδίου που συμβάλλει στη διατήρηση του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού το γονιδίωμα παραμένει σε μορφή επισώματος ωστόσο σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου το γονιδίωμα βρίσκεται στην ενσωματωμένη μορφή και η ενσωμάτωση συνήθως γίνεται σε θέση μεταξύ των περιοχών E1 και E2. Η απώλεια της E2 οδηγεί σε υπερέκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα καρκινογένεσης[35].

1.4.1. Λειτουργικές πρωτεΐνες

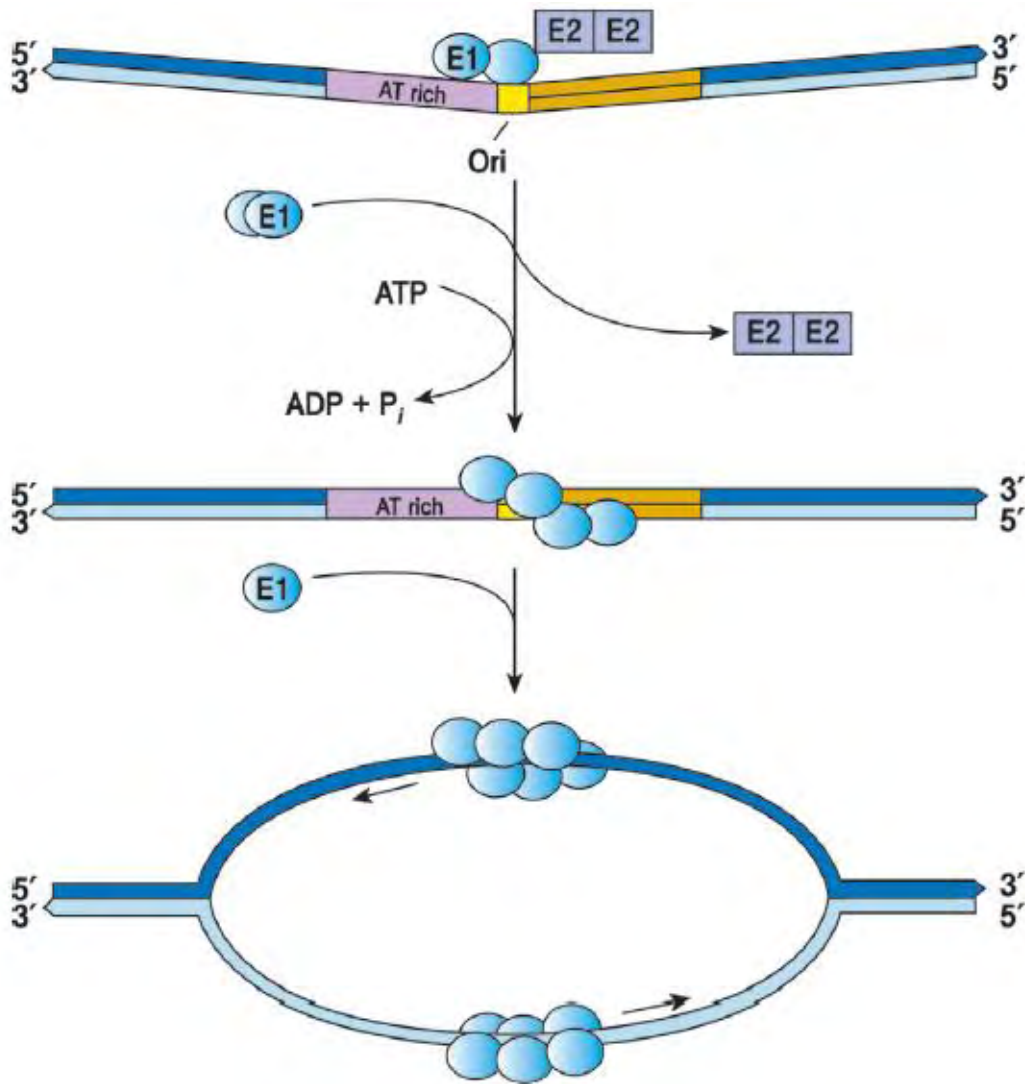
1.4.1.i Η ιική πρωτεΐνη E1

Είναι μία ATP-εξαρτώμενη DNA ελικάση και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο μεγέθους περίπου 1800 bp. Διαθέτει περιοχές πρόσδεσης στο DNA καθώς και μία περιοχή πρόσδεσης στο σημείο έναρξης της αντιγραφής που βρίσκεται στην περιοχή LCR. Αποτελείται από 6 μονομερή τα οποία συγκρατούνται από την E2 και το σύμπλεγμα που προκύπτει έχει δραστικότητα 3'-5' ελικάσης και ξετυλίγει τη διπλή έλικα του DNA για να αρχίσει η αντιγραφή [14].



Εικόνα 6 Κρυσταλλική δομή της E1 σε σύμπλεγμα με ssDNA και ADP όπως προτείνεται από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων RCSB

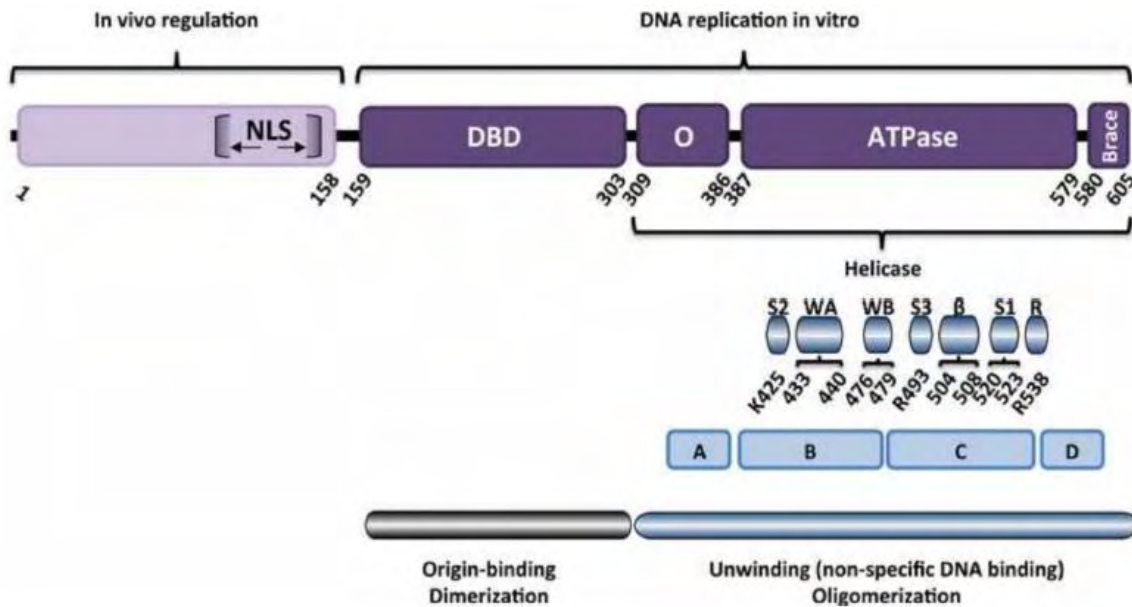
Το μέγεθος της πρωτεΐνης ποικίλλει από 600 έως 650 αμινοξέα. Μπορεί να διακριθεί σε 3 λειτουργικές περιοχές: μία N-τελική ρυθμιστική περιοχή(μεγέθους περίπου 200 αμινοξέων) η οποία είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί σωστά η αντιγραφή και είναι η λιγότερο συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης, μία κεντρική περιοχή που αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή ori και ένα C-τελικό άκρο που χρησιμεύει στην αυτοοργάνωση της πρωτεΐνης σε εξαμερή και είναι υπεύθυνο για την ενζυμική της δραστικότητα [16].



Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση της έναρξης της αντιγραφής των ιικών γονιδίων. Πραγματοποιείται πρόσδεση της E1 στο σημείο έναρξης (ori) ως διμερές και η πρόσδεση αυτή ενισχύεται από τη δράση της E2. Η E2 απομακρύνεται με ταυτόχρονη υδρόλυση του ATP από την ATPase της E1 και στο σημείο έναρξης προσκολλώνται επιπλέον μόρια της E1 και η διπλή έλικα στο σημείο αυτό ανοίγει [58]

Είναι μία απ' τις πιο καλά συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV καθώς διαθέτει το μεγαλύτερο και περισσότερο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Αυτός ο υψηλός βαθμός συντήρησης αντικατοπτρίζει το βασικό της ρόλο κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού καθώς ξεκινά την αντιγραφή του και με αυτόν τον τρόπο αυξάνει τον αριθμό των ιικών επισωμάτων που προσβάλλουν τα κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Επιπλέον διατηρεί ένα σταθερό αριθμό επισωμάτων στα κύτταρα τα οποία μετακινούνται στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου και αρχίζουν να διαφοροποιούνται και

τέλος αυξάνει τον αριθμό των επισωμάτων στο ανώτερο στρώμα του επιθηλίου κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του ιού [15].



Εικόνα 8 Δομή της E1. Η N-τελική ρυθμιστική περιοχή απεικονίζεται με ανοιχτό μωβ ενώ οι περιοχές που απαιτούνται για την αντιγραφή με έντονο μωβ. Η περιοχή NLS είναι υπεύθυνη για τη δράση της πρωτεΐνης στον πυρήνα ενώ η περιοχή DBD είναι η περιοχή πρόσδεσης στο σημείο ori [16].

1.4.1.ii Η ιική πρωτεΐνη E2

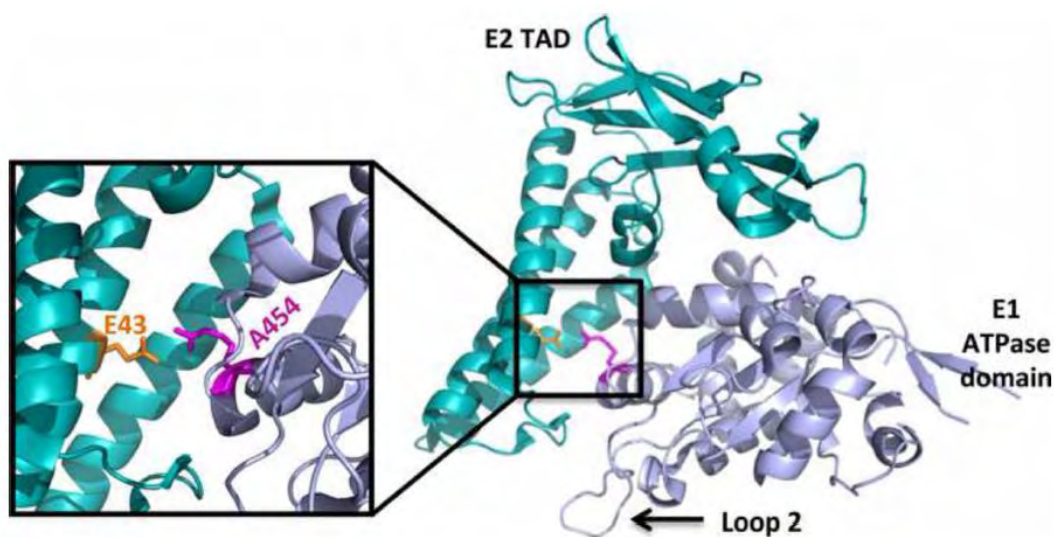
Η πρωτεΐνη αυτή μεγέθους περίπου 50 kDa είναι πολυλειτουργική και εμπλέκεται σε διαδικασίες του κύκλου ζωής του ιού, με κυριότερες τη μεταγραφή και αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Διακρίνεται σε 3 περιοχές: ένα συντηρημένο N-τελικό άκρο μεγέθους περίπου 200 αμινοξέων που φέρει μία περιοχή trans ενεργοποίησης και ένα C-τελικό άκρο 85-100 αμινοξέων που διαθέτει περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Οι δύο αυτές περιοχές συνδέονται με μία αλληλουχία η οποία συχνά καλείται 'hinge', είναι περιοχή πλούσια σε σερίνη και αργινίνη και ποικίλλει σε μέγεθος και αλληλουχία στα διάφορα γένη του HPV [17].



Εικόνα 9 Δομή της E2 [17]

Συνήθως συναντάται ως ομοδιμερές που προσδένεται σε αλληλουχίες στην περιοχή LCR στην οποία βρίσκεται ο υποκινητής των early γονιδίων [17].

Η δράση της αφορά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Σχετικά με το ρόλο της ως προς την αντιγραφή, είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της ελικάσης E1 στο σημείο έναρξης η οποία στη συνέχεια ακολουθείται από πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών απαραίτητων για την αντιγραφή όπως η RPA (replication protein A), η DNA pol και η primase [6]. Αναγνωρίζει ένα παλίνδρομο μοτίβο [AACCG(N₄)_cGGTT] στη μη κωδική περιοχή του ιικού γενώματος (LCR) και απαιτείται για το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων του DNA ώστε να μπορέσει να αρχίσει η αντιγραφή του γονιδιώματος [19]. Ακόμη, είναι υπεύθυνη για το συγχρονισμό της αντιγραφής του ιικού γενώματος με το διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων των κυττάρων του ξενιστή αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που βρίσκονται συνδεδεμένες με τη χρωματίνη και επιτρέπει έτσι στα ιικά γενώματα να κατανέμονται σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο το ιικό DNA παραμένει στα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου.



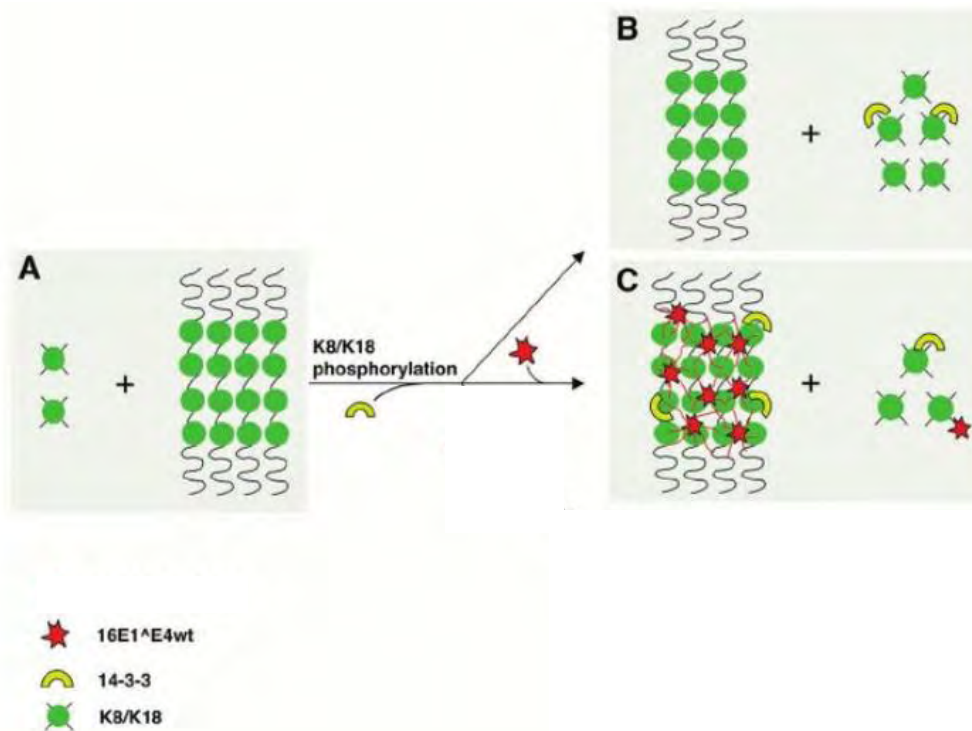
Εικόνα 10 Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της περιοχής TAD (transactivation domain) της E2 με το C-τελικό άκρο της E1 του HPV18 [16]

Εκτός από το ρόλο της στην αντιγραφή και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, σημαντικός είναι ο ρόλος της και στη μεταγραφή καθώς στρατολογεί διάφορους κυτταρικούς παράγοντες που την ενεργοποιούν ή την

καταστέλλουν. Μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και να ρυθμίσει τον υποκινητή των γονιδίων *early*. Όταν βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ενώ σε υψηλά επίπεδα καταστέλλει την έκφραση ογκογονιδίων μετατοπίζοντας τον μεταγραφικό ενεργοποιητή SP1 σε μία περιοχή γειτονικά του υποκινητή των γονιδίων *early*. Στα αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα κωδικά mRNAs μεταγράφονται από τον υποκινητή των γονιδίων *early* έως και το σημείο pAE (*early polyadenylation site*). Στα κύτταρα που διαιρούνται στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου, ενεργοποιείται ο υποκινητής των γονιδίων *late* παραμένοντας ίδιο το σημείο τερματισμού. Τα αντίγραφα που προκύπτουν, κωδικοποιούν για υψηλά αντίγραφα του E2. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ρυθμίζει τον αριθμό των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος στα αδιαφοροποίητα κύτταρα [21]. Οι λειτουργίες της E2 συχνά αναστέλλονται λόγω μεταλλάξεων ή λόγω ρήξης του ιικού γενώματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης κακοήθειας [17].

1.4.1.iii Η ιική πρωτεΐνη E4

Στους HPVs το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη E4 εκφράζεται από ένα ματισμένο mRNA του οποίου το κωδικόνιο έναρξης και τα πρώτα αμινοξέα εντοπίζονται στο πλαίσιο ανάγνωσης του E1. Το πλαίσιο ανάγνωσης του E4 βρίσκεται εξ ολοκλήρου σ' αυτό της E2 και ποικίλλει σε μέγεθος μεταξύ των papillomaviruses. Για το λόγο αυτό συχνά το γονίδιο E4 αναφέρεται και ως E1^{E4}. Αποτελείται από ένα N-τελικό άκρο που περιέχει ένα μοτίβο με κατάλοιπα λευκίνης (LLKLL) το οποίο τη βοηθά να αλληλεπιδρά με την κερατίνη. Αυτή η αλληλεπίδραση ίσως είναι σημαντική για την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων. Επίσης διαθέτει ένα C-τελικό άκρο στο οποίο εντοπίζονται περιοχές που βοηθούν στην αυτοσυναρμολόγηση των πρωτεϊνών E4. Όταν οι πρωτεΐνες E4 αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, σχηματίζουν συμπλέγματα όμοια με 'amyloid fibres' και έτσι είναι πιο εύκολος ο χειρισμός της οργάνωσης του κυττάρου ξενιστή, μέσω αναδιοργάνωσης του δικτύου κερατίνης [23].



Εικόνα 11 Πιθανό μοντέλο αναδιοργάνωσης του δικτύου της κερατίνης από την E1 Λ E4 HPV16 (A) Κατά τη διάρκεια της φάσης G0/G1 το 5% της συνολικής κερατίνης αποτελείται από διαλυτά τετραμερή K8/K18 (B) Όταν το κύτταρο πλησιάζει στη μίτωση ο παράγοντας 14-3-3 προσδένεται στα υπερφωσφορυλιωμένα τετραμερή και αυξάνει τη διαλυτότητά τους (C) Η πρωτεΐνη 16E1 Λ E4 αλληλεπιδρά με την κερατίνη μέσω αλληλουχιών στο C-τελικό της άκρο και είναι ικανή να σχηματίζει πολυμερή μ' αυτήν. Αυτό επιτρέπει στην 16E1 Λ E4 να δρα ως "συνδέτης" και να επάγει το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων κερατίνης [22].

Οι πρωτεΐνες αυτές, παρ'όλο που βρίσκονται στην πρώιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος, εκφράζονται κυρίως στο στάδιο της μόλυνσης όπου εκφράζονται τα γονίδια late ή τη στιγμή που ξεκινά η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Μπορούν να συσσωρεύονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου όπου συγκεντρώνονται τα ιικά σωματίδια [22].

Όσον αφορά τις λειτουργίες της, η ικανότητα της να διασπά το δίκτυο κερατίνης και το σχηματισμό φακέλου μπορεί διευκολύνει την απελευθέρωση ή τη μετάδοση του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Επίσης σε κάποιους τύπους HPV έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου στη φάση G2 και να συμμετάσχει στην αντιγραφή του γονιδιώματος. Ο μηχανισμός με τον οποίο εμπλέκεται στην αντιγραφή δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός ωστόσο ίσως

περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις της E4 με κινάσες, την αλληλεπίδρασή της με την E2 και την ικανότητά της να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο [24].

1.4.1.iv Η ιική πρωτεΐνη E5

Είναι μικρή, μεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 40-93 αμινοξέων. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι όταν υπερεκφράζεται εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα golgi, τον πυρηνικό φάκελο και την πλασματική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες E5 που κωδικοποιούνται από τους high-risk HPV 16 και 18 έχουν μέγεθος 9,4 και 8,3 kDa αντίστοιχα [25]. Η HPV 16 E5, αποτελείται από 3 υδρόφοβες περιοχές που διαπερνούν τη μεμβράνη και φαίνεται ότι αυτοσυναρμολογείται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μέσω αυτών των διαμεμβρανικών περιοχών και πιθανώς μέσω δισουλφιδικών δεσμών [26].

Το γονίδιο που την κωδικοποιεί, βρίσκεται στο 3' άκρο της περιοχής early στο ιικό γονιδίωμα και εκφράζεται από ένα ματισμένο mRNA που αρχίζει ανοδικά του γονιδίου E2.

Λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους τους και της υδρόφοβης φύσης τους, οι πρωτεΐνες E5 στερούνται περιοχές οι οποίες θα τους επέτρεπαν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ή με άλλες πρωτεΐνες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούν έναν εναλλακτικό μηχανισμό, κατά τον οποίο στην υδρόφοβη μεμβράνη σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων αμιδίου της κύριας αλυσίδας και του καρβοξυλίου των διαμεμβρανικών περιοχών με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του συμπλόκου, τη μείωση του ενεργειακού κόστους και το σχηματισμό μίας α-έλικας. Έτσι οι πρωτεΐνες υιοθετούν στη μεμβράνη μία καλά σχηματισμένη δομή στην οποία οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων εκτίθενται ακτινικά στο εξωτερικό του ελικοειδούς άξονα με συνέπεια αυτές οι αλυσίδες να μπορούν να αλληλεπιδρούν είτε με άλλα μόρια της E5, υποβάλλοντάς τα έτσι σε ομο-ολιγομερισμό, είτε με τα διαμεμβρανικά τμήματα άλλων πρωτεϊνών σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο πρωτεϊνικά συμπλέγματα [26].

Η πρωτεΐνη E5 θεωρείται ότι δεν έχει ενζυμική δραστικότητα αλλά δρα ρυθμίζοντας τη δραστικότητα άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών. Εκφράζεται κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσής της συχνά διακόπτεται σε καρκινικά κύτταρα υποδεικνύοντας έτσι την απουσία ουσιαστικού ρόλου στη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου. Έτσι θεωρείται ότι ίσως έχει κάποιο ρόλο στην αρχή του κυτταρικού μετασχηματισμού αλλά δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου [27].

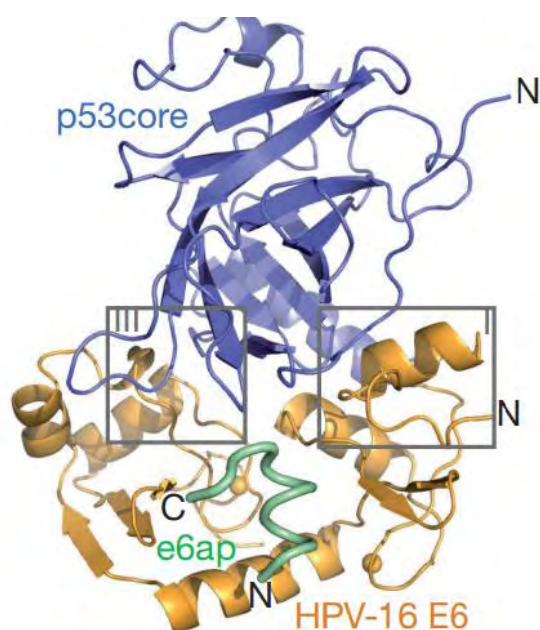
Από διάφορες μελέτες έχει βρεθεί ότι αν και έχει χαμηλή ογκογόνο δράση, μπορεί να ενισχύσει την ικανότητα μετασχηματισμού των E6,E7 και με αυτόν τον τρόπο να έχει έναν υποστηρικτικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Επίσης έχει αναφερθεί ότι είναι ικανή να ενισχύει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του EGF (εικόνα 11) και επιπλέον να μειώνει τα επίπεδα του συμπλέγματος MHC τάξης I (με αποτέλεσμα τη μειωμένη δράση των T-κυττάρων του ξενιστή ως απάντηση στη μόλυνση απ' τον HPV) καθώς και να ρυθμίζει το μονοπάτι των MAP κινασών. Υπάρχουν ακόμη ενδείξεις ότι ίσως συνεργάζεται με την E7 ώστε να διατηρούν ένα περιβάλλον ευνοϊκό για τον πολλαπλασιασμό του HPV στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα [25,28].

1.4.1.v Η ιική πρωτεΐνη E6

Όλοι οι ιοί papilloma, περιέχουν στο γονιδίωμά τους ένα ORF E6 καθοδικά της μη κωδικής περιοχής LCR. Οι πρωτεΐνες E6 έχουν μέγεθος περίπου 150 αμινοξέα και περιέχουν 2 μοτίβα CX2C-X29-CX2C δακτύλων ψευδαργύρου που συνδέονται μεταξύ τους με ένα διαμεμβρανικό σύνδεσμο 36 αμινοξέων πλευρικά των N- και C-τελικών περιοχών. Ένα παρόμοιο μοτίβο περιέχει και η πρωτεΐνη E7, οδηγώντας στην υπόθεση ότι τα δύο αυτά γονίδια προήλθαν από ένα γεγονός γονιδιωματικού διπλασιασμού. Από παρατήρηση κρυσταλλικών δομών έχει διαπιστωθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές τείνουν να σχηματίζουν αδιάλυτα συσσωματώματα. Από την κρυσταλλική δομή του C-τελικού άκρου της HPV16 E6 προτάθηκε ένα μοντέλο για ολόκληρη την πρωτεΐνη σύμφωνα με το οποίο δύο δομές δακτύλων ψευδαργύρου, βρίσκονται συμμετρικά τοποθετημένες η μία απέναντι από την άλλη σε μία

ψευδοδιμερική δομή, με το διαμεμβρανικό τμήμα να σχηματίζει μία έλικα που συμβάλλει στο να παραμένουν άκαμπτες-σταθερές αυτές οι δύο περιοχές. Κάθε περιοχή αποτελείται από 3 δομές β-βαρελιών (S1,S2,S3) και δύο μικρές έλικες (H1,H2). Οι άμινο- και καρβόξυ- τελικές περιοχές είναι ποικίλου μήκους και αλληλουχίας. Αν και η E6 σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ή πρωτεΐνης διμερίζεται, θεωρείται ότι σε φυσιολογικές συνθήκες είναι μονομερής. Εντοπίζεται στον πυρήνα, ωστόσο κάποια θραύσματά της ίσως να βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα [32].

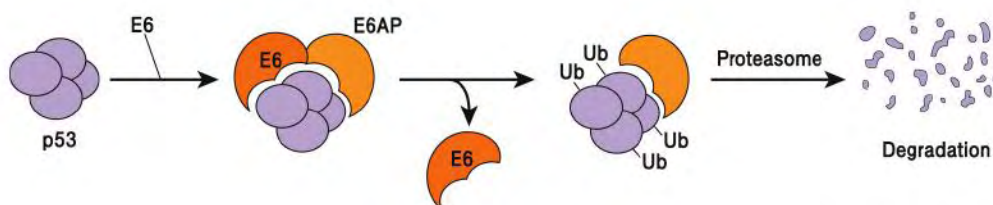
Η πρωτεΐνη αυτή γενικά είναι σημαντική για την αθανатоποίηση και το μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων. Αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Ο μηχανισμός με τον οποίο η E6 αναστέλλει τη δράση της p53 είναι ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο επάγει την ογκογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η E6 του HPV-16 αλληλεπιδρά αρχικά με τη λιγάση της ουβικουιτίνης της πρωτεΐνης E6 (E6AP)



Εικόνα 12 Το σύμπλεγμα E6/e6ap/p53 του HPV-16 [59]

μέσω προσδεσής της σε μία αλληλουχία LXXLL. Το σύμπλοκο το οποίο θα προκύψει στη συνέχεια, προσδένεται στην p53 η οποία ουβικουιτινιώνεται από τη λιγάση E6AP και στη συνέχεια αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Επομένως λόγω των χαμηλών επιπέδων της p53, το κύτταρο αδυνατεί να επιδιορθώσει τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA και επιπλέον χάνονται κάποια σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (G1/S και G2/M) με αποτέλεσμα να προκύπτει αυξημένος αριθμός κυττάρων τα οποία έχουν συσσωρεύσει μεταλλάξεις. Έτσι σταδιακά οδηγούμαστε σε καρκινογένεση. Αυτό ίσως συμβαίνει και μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού που μεσολαβείται από την ARF(ADP-ribosylation factor). Οι low- risk E6 πρωτεΐνες προσδένονται στην p 53 ασθενέστερα από αυτές των high-risk ιών και για

το λόγο αυτό δεν είναι ικανές να προσδεθούν στην E6AP και να την οδηγήσουν για πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα [6,29].



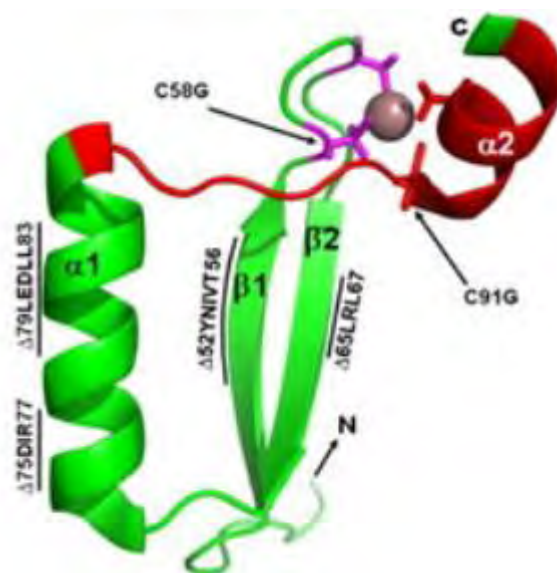
Εικόνα 13 Μηχανισμός αποικοδόμησης της p53 μέσω της E6 [58]

Μία ακόμη πολύ σημαντική λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης η οποία είναι ένα σύμπλεγμα ενζύμων που προσθέτει νουκλεοτίδια στα άκρα των τελομερών στα χρωμοσώματα. Παρ'όλο που ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η E6 παρεμβαίνει στη λειτουργία της hTERT δεν είναι ακόμη γνωστός, είναι σαφές ότι η λειτουργία της ίσως προδιαθέτει για μακροχρόνια μόλυνση και ανάπτυξη καρκίνου. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι οι E6 ενεργοποιούν την τελομεράση μέσω ενεργοποίησης της TERT, της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι πλήρως γνωστός ωστόσο φαίνεται να εμπλέκεται η πρόσδεση στη λιγάση E6AP που αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό προτείνεται λόγω του γεγονότος ότι σε μεταλλάγματα της E6 που την αποτρέπουν να προσδεθεί στην E6AP δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της ικανότητας τελομεράσης. Ένα υποτιθέμενο μοντέλο προτείνει ότι οι E6 και E6AP προσδέονται και αποικοδομούν έναν καταστολέα της TERT, τον NFX1-91 ο οποίος προκαλεί απακετυλίωση των ιστονών [33]. Ένα άλλο μοντέλο υποστηρίζει ότι οι E6 και E6AP προσδέονται στο c-myc και κατά κάποιο τρόπο η αλληλεπίδραση αυτή κάνει το c-myc έναν καλύτερο μεταγραφικό ενεργοποιητή της TERT [34]. Ο λόγος για τον οποίο ο ιός HPV ενεργοποιεί την τελομεράση είναι άγνωστος. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης επιτρέπει μια επέκταση της διάρκειας ζωής των κερατινοκυττάρων για να προσφέρει ένα πλεονέκτημα για αναπαραγωγή. Θεωρείται πιθανό η TERT να φέρει και άλλες λειτουργίες εκτός από την επιμήκυνση των τελομερών, όπως η αναστολή της απόπτωσης [32].

Άλλη μία διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνών E6 ανάμεσα στους high και low-risk HPVs αποτελεί το γεγονός ότι οι high risk έχουν μία περιοχή πρόσδεσης στην PDZ στο C-τελικό άκρο. Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και βρίσκεται στο C-τελικό άκρο. Η ικανότητα των E6 να προσδένονται στη θέση PDZ φαίνεται να ρυθμίζει πολλά στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Κάποιες μελέτες έχουν προτείνει ότι η ικανότητα πρόσδεσης στην περιοχή αυτή παίζει κάποιο ρόλο στην έκφραση της Cyclin B1 που απαιτείται για τη μετάβαση στη φάση G2-M [3].

1.4.1.vi Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη αυτή μαζί με την E6, αποτελούν τις δύο βασικές ογκοπρωτεΐνες των ιών papilloma. Παίζουν κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής τους καθώς επαναπρογραμματίζουν τον κυτταρικό κύκλο του ξενιστή ώστε το περιβάλλον να γίνει ευνοϊκό για την αναπαραγωγή του ιού. Για να εγκαθιδρυθεί η μόλυνση στον ξενιστή και η ανάπτυξη καρκίνου απαιτείται ταυτόχρονη δράση των πρωτεϊνών E6 και E7 [36].



Εικόνα 14 Πιθανό δομικό μοντέλο της E7 [60]

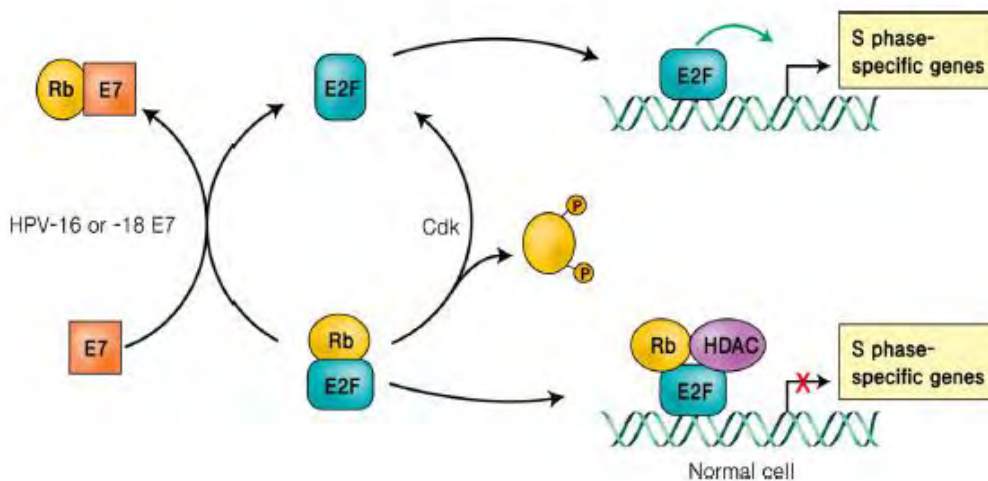
Είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που αποτελείται από 98 αμινοξέα και 3 συντηρημένες περιοχές: την CR1, CR2 και CR3 που περιέχουν ένα συντηρημένο μοτίβο LXCXE το οποίο είναι υπεύθυνο για την υψηλή συγγένεια με την οποία προσδένεται η E7 στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Rb. Η περιοχή CR3 περιέχει δύο μοτίβα CXXC που χωρίζονται από 29 ή 30 αμινοξέα και σχηματίζουν μία περιοχή zinc-binding παρόμοια με αυτήν της E7. Αυτή η περιοχή είναι κρίσιμη για την αλληλεπίδραση με κυτταρικές πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες του

ρετινοβλαστώματος, η p21, p27, TBP και E2F. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, έχει παρατηρηθεί ότι σχηματίζει μακρομοριακά συμπλέγματα.

Σε μελέτες όπου η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* ή *S.cerevisiae*, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη διμερίζεται μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου. Πρωτεΐνες E7 που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από κυτταρικές σειρές που είχαν μολυνθεί με HPV 16 παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη ήταν σε μορφή τετραμερών ή ολιγομερών και ίσως στη μορφή αυτή να έχει ιδιότητες σαπερόνης (chaperone). Ωστόσο θεωρείται ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, η πρωτεΐνη συναντάται ως διμερές [35].

Η E7 ενεργοποιεί ένα σύμπλοκο που περιέχει τη λιγάση της ουβικουιτίνης της E2 με την κυκλίνη 2 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της Rb και την αποσύνδεσή της από την οικογένεια των μεταγραφικών παράγοντων E2F. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η Rb βρίσκεται προσδεδεμένη στον παράγοντα E2F με αποτέλεσμα να μη μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων που εξαρτώνται απ'αυτόν και είναι απαραίτητα για να καταφέρει το κύτταρο να εισέλθει στη φάση S. Έτσι, όταν γίνει αποδέσμευση της Rb από τον παράγοντα αυτόν, τότε είναι ελεύθερος να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων με αποτέλεσμα την πρόωρη είσοδο στη φάση S και τη σύνθεση DNA. Επιπλέον, σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την E7 χάνεται το σημείο ελέγχου για τη μετάβαση από τη G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και τα κύτταρα συνεχίζουν κανονικά τον κυτταρικό τους κύκλο. Τα δύο αυτά γεγονότα οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Φυσιολογικά η πρωτεΐνη Rb είναι μη φωσφορυλιωμένη και βρίσκεται προσδεδεμένη στον παράγοντα E2F. Κατά τη μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνεται από κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cdks) και έτσι αποδεσμεύεται από τον παράγοντα E2F. Η πρωτεΐνη E7 προσδέεται σε αναστολείς αυτών των κινασών (CKIs) και αναστέλλει τη δράση τους. Έτσι αυξάνεται η δράση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και συγκεκριμένα της cdk2 αλλά και των κυκλινών E και A οι οποίες φωσφορυλιώνουν την Rb η οποία είναι ελεύθερη και πάλι να ασκήσει τη δράση της.



Εικόνα 15 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω αλληλεπίδρασης της E7 με την Rb [58]

Μία άλλη κατηγορία πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά και τις απενεργοποιεί, είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) οι οποίες φυσιολογικά καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων των οποίων η μεταγραφή επάγεται από τον παράγοντα E2F. Επιπλέον, ενεργοποιεί πολλούς αναστολείς ανάπτυξης κυτταροκινών που παράγονται από τον ξενιστή μετά τη μόλυνση και έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που επάγονται απ' την ιντερφερόνη παρεμποδίζοντας έτσι την σωστή ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι μπορεί να μπλοκάρει την απόπτωση και μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα TNF-1 αναστέλλοντας έτσι το σχηματισμό συμπλεγμάτων που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο [4].

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της high-risk HPV E7 είναι η ικανότητά της να διεγείρει τη γενωμική αστάθεια στον ξενιστή μέσω απορρύθμισης του χρωμοσωμικού διπλασιασμού στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, επάγει μέσω μεταλλάξεων τη δημιουργία πολλών χρωμοσωμικών ανωμαλιών συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας γεφυρών χρωματίνης κατά την ανάφαση (anaphase bridges) ένα φαινόμενο κατά το οποίο τα τελομερή αποτυγχάνουν να διαχωριστούν και να διαμοιραστούν σε κάθε θυγατρικό κύτταρο στο τέλος του κυτταρικού διπλασιασμού. Λόγω της δράσης της μπορούν ακόμη να προκύψουν λανθασμένως

στοιχισμένα χρωμοσώματα και πολύ συχνά παρατηρείται επαγωγή πολλαπλών μιτώσεων [37].

1.4.2 Δομικές πρωτεΐνες

1.4.2.i Η ιική πρωτεΐνη L1

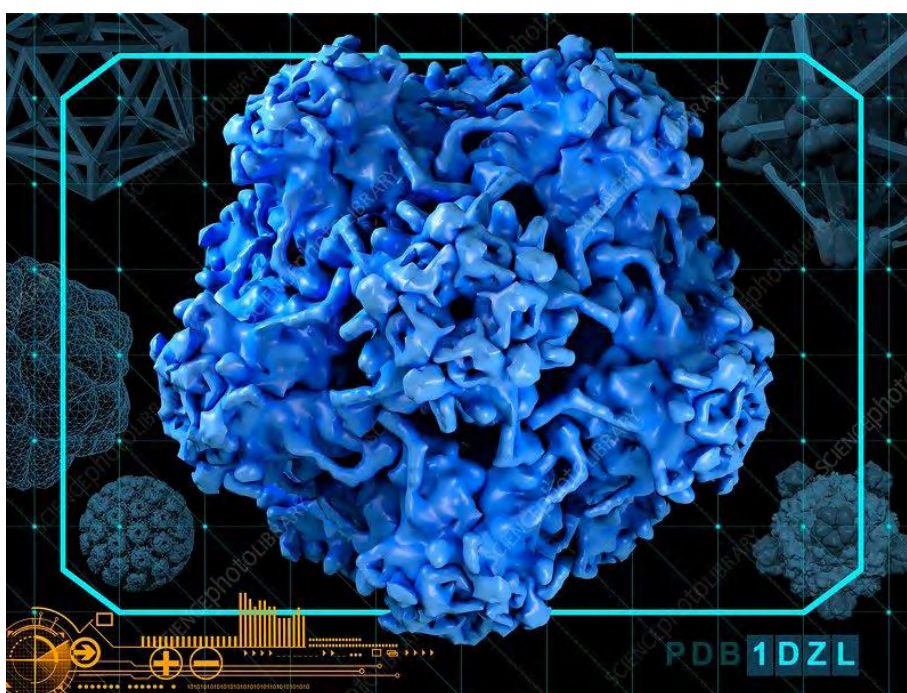
Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου και επιπλέον είναι σημαντικός ο ρόλος της τόσο για την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή όσο και για την απελευθέρωση του γονιδιώματός του. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την L1 αποτελείται από μία αλληλουχία περίπου 1200 βάσεων και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη αρκετά συντηρημένη μεταξύ των HPVs.

Η L1 μεταφράζεται από ένα mRNA του οποίου η μεταγραφή ξεκινάει από ένα σημείο ανοδικά της περιοχής URR(upstream regulatory region). Για να φτάσει το σύμπλοκο της μετάφρασης στην περιοχή late, θα πρέπει να περάσει την περιοχή των πρώιμων γονιδίων. Επομένως τα mRNA που κωδικοποιούν για την L1, προκύπτουν από μάτισμα κατά το οποίο αφαιρούνται οι περιοχές των early γονιδίων που υπάρχουν στο pre-mRNA [38].

Έχει βρεθεί ότι η ανασυνδυασμένη L1 είναι ικανή να αυτοσυναρμολογείται και να σχηματίζει δομές παρόμοιες με αυτές των ιικών σωματίων (VLPs). Η L1 είναι αρκετά ανοσογόνος και έχει επιτόπους οι οποίοι επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών για κάθε τύπο του ιού, κάνοντας την στόχο πολλών εμβολίων [4].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε ένα από τα 72 καψομερή αποτελείται από 5 μονομερή της L1. Από συγκρίσεις μεταξύ δομών των L1 των παπυλωματών, έχει παρατηρηθεί μία συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στην ηπαρίνη στο -COOH άκρο και σε περίπτωση απουσίας αυτής της περιοχής, η L1 αδυνατεί να προσδεθεί τόσο την ηπαρίνη, όσο και στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Θεωρείται ότι η L1 είναι η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη που περιέχει τον καθοριστικό παράγοντα για την αρχική

πρόσδεση των ιικών σωματιδίων στους υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή (HSPGs) επομένως διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μόλυνση. Πιο αναλυτικά, όταν η L1 συνδεθεί στους υποδοχείς αυτούς, το καψίδιο αλλάζει διαμόρφωση με αποτέλεσμα το N-τελικό άκρο, να εκτίθεται και να αποικοδομείται από πολλές πρωτεάσες στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου. Φαίνεται να ακολουθούν περαιτέρω αλλαγές στη διαμόρφωση του καψιδίου οι οποίες επιτρέπουν στο ιοσωμάτιο να προσδέεται και σε άλλους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων [39].

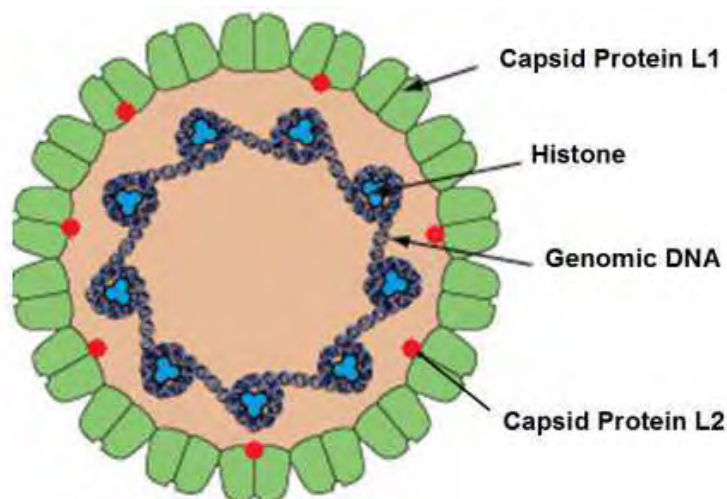


Εικόνα 16 Η δομή της L1 πώς προτείνεται από το SPL (Science Photo Library)

1.4.2.ii Η ιική πρωτεΐνη L2

Έχει μέγεθος περίπου 500 αμινοξέα το οποίο αντιστοιχεί σε εκτιμώμενο βάρος 55 kDa, ωστόσο συνήθως με SDS- page ανάλυση, το μέγεθός της προσδιορίζεται στα 64-78 kDa για λόγους οι οποίοι δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί ωστόσο θεωρείται ότι οφείλεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [41]. Το N- τελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτής, περιέχει δύο υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (C22, C28) που σχηματίζουν μία ενδομοριακή δομή φουρκέτας [40].

Η πρωτεΐνη αυτή σε αντίθεση με την L1 δεν είναι ικανή να σχηματίζει VLPs. Ωστόσο έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την L1 και να κάνει σταθερότερη τη δομή που σχηματίζει. Επίσης διευκολύνει την καψιδίωση του ιικού DNA κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης των ιοσωματίων στον πυρήνα των τελικώς διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων.



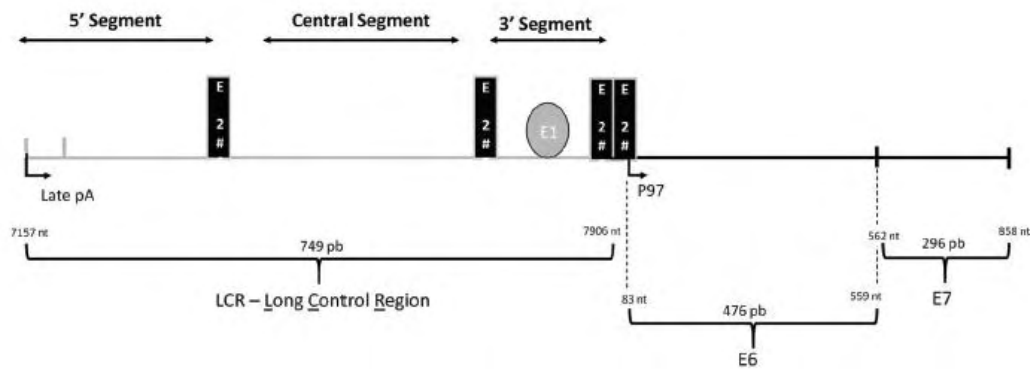
Εικόνα 17 Ιοσωμάτιο του HPV [4]

1.4.3 Long control region (LCR)

Η περιοχή αυτή αποτελείται από περίπου 850 bp και αποτελεί το 10% του συνολικού ιικού γονιδιώματος. Εντοπίζεται στο τέλος του γονιδίου που κωδικοποιεί για την L1 έως και την αρχή της περιοχής early. Κάποιοι papillomaviruses περιέχουν μία επιπλέον μη κωδική περιοχή μεταξύ του τέλους της περιοχής early και την αρχή της L2. Το 5' άκρο της φέρει αλληλουχίες τερματισμού της μεταγραφής και μία περιοχή πρόσδεσης στη μήτρα του πυρήνα (nuclear matrix), ενώ το κεντρικό τμήμα της περιέχει έναν ενισχυτή ο οποίος λειτουργεί μόνο σε επιθηλιακά κύτταρα. Το 3' άκρο περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και τον υποκινητή του γονιδίου E6.

Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται τα περισσότερα από τα cis ρυθμιστικά στοιχεία που ρυθμίζουν τη βιολογία των ιών papilloma. Δεν κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη και ο ρόλος της είναι κυρίως ρυθμιστικός καθώς περιέχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που είναι

υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της μεταγραφής από την RNA pol II τόσο των early όσο και των late γονιδίων [42,43]. Η LCR του HPV 16 περιέχει στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες που μπορούν να διεγερθούν από οιστρογόνα και υπάρχουν ενδείξεις για συνεργασία μεταξύ των οιστρογόνων και των HPV στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [7].



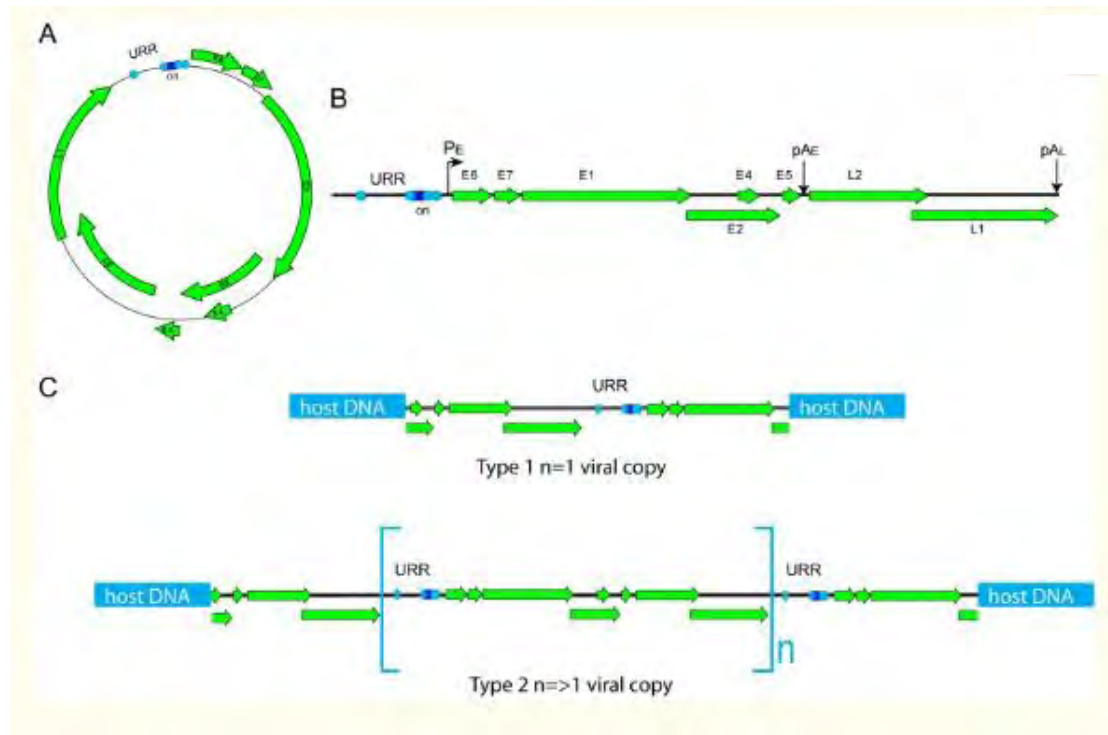
Εικόνα 18 LCR HPV-16 [50]

1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος

Το ιικό DNA μπορεί να υπάρχει στα κύτταρα του ξενιστή είτε σε μία κλειστή κυκλική μορφή γνωστή ως επίσωμα, είτε ενσωματωμένο με το ανθρώπινο DNA, είτε σε μεικτή μορφή. Το DNA βρίσκεται σε επισωματική μορφή κατά την παραγωγική φάση του ιού όπου ο αριθμός των επισωμάτων παραμένει χαμηλός στον πυρήνα και στην περίπτωση αυτή μόνο οι early πρωτεΐνες εκφράζονται από το ιικό γονιδίωμα [1]. Γενικά η ενσωμάτωση είναι ένα ατύχημα για τον ιό καθώς αδυνατεί να ολοκληρώσει φυσιολογικά τον κύκλο ζωής του και να παράξει κάποιες πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργία του και τη σύνθεση του καψιδίου [45].

Η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή είναι ένα κρίσιμο γεγονός για την ανάπτυξη των περισσότερων περιπτώσεων καρκίνου και παρ'όλο που αυτό μπορεί να συμβεί σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα, μελέτες έχουν δείξει ότι συνήθως συμβαίνει σε εύθραυστες θέσεις (CFS) ένα γεγονός που συχνά έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή ιικών γονιδίων των οποίων η μεταγραφή ρυθμίζεται από την LCR [7]. Γενικά θεωρείται ότι η ενσωμάτωση συμβαίνει σε περιπτώσεις υψηλού βαθμού δυσπλασίας CIN2, CIN3 και όταν συμβεί μπορεί να αυξηθεί η έκφραση των E6, E7. Το

κλειδί σε αυτή τη διαδικασία είναι η E2, που όπως ήδη αναφέρθηκε είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τα επίπεδα E6/E7 μέσω πρόσδεσης σε περιοχές της LCR [44].



Εικόνα 19 (Α) Το γονιδίωμα του HPV στην επισωμική του μορφή (Β) Τύπος 1 ενσωμάτωσης (C) Τύπος 2 ενσωμάτωσης

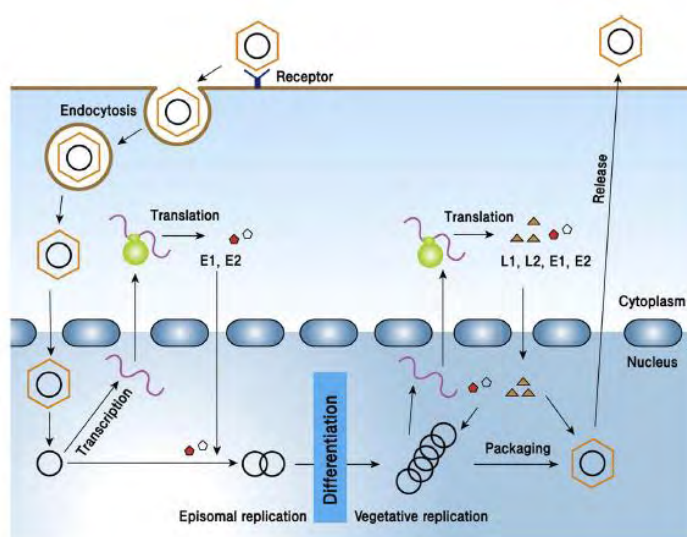
Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστροφή του DNA ή παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή του DNA, ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στην ενσωμάτωση. Το 2007 μία μελέτη έδειξε ότι σε περιπτώσεις με αυξημένο αριθμό δίκλωνων ρήξεων που προκαλούνται εξαιτίας μεταλλάξεων στον παράγοντα Ku 70, τα γεγονότα ενσωμάτωσης ήταν αυξημένα. Η πρωτεΐνη Ku 70 είναι μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στην επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού [45].

Πώς όμως η ενσωμάτωση οδηγεί στην ογκογένεση; Έχει βρεθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση και αύξηση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6, E7 τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καταργούν σημεία ελέγχου και προκαλούν γενωμική αστάθεια. Αυτό δίνει ένα πλεονέκτημα στα κύτταρα αυτά και επάγει την πρόοδο της ογκογένεσης.

Μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους. Στον τύπο 1 στο χρωμόσωμα του ξενιστή εντοπίζεται μόνο ένα αντίγραφο του ιού ενώ στον τύπο 2 πολλές επαναλήψεις 'head-to-tail' που μπορεί να παρεμβάλλονται από ενδιάμεσες κυτταρικές αλληλουχίες. Και στις δύο περιπτώσεις η μεταγραφή των mRNA των ογκογονιδίων E6, E7 αρχίζουν από τον κύριο υποκινητή που βρίσκεται στην LCR. Στον τύπο 2 υπάρχουν ενδείξεις ότι συνήθως μόνο το 3' άκρο του ιικού γενώματος είναι μεταγραφικά ενεργό [46].

1.6 Κύκλος ζωής των HPV

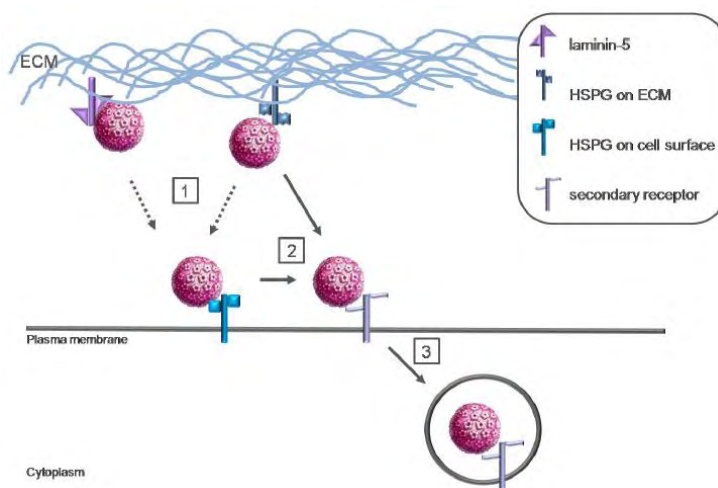
Γενικά ο κύκλος ζωής του ιού ξεκινάει μόλις ο ιός εισέλθει στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και μολύνει τα κύτταρα. Εισέρχεται μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου και η ανάπτυξη του εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή δηλαδή τα κύτταρα του διαιρούνται κάθετα προς τις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλιακού ιστού. Ο αριθμός των αντιγράφων του ιικού DNA ενισχύεται στα ανώτερα στρώματα του επιθηλιακού ιστού και οι νεοσχηματισμένοι ιοί εντοπίζονται στην εξωτερική στοιβάδα. Σε κάθε ένα από τα στάδια αυτά υπάρχει έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 20 Συνοπτική παρουσίαση του κύκλου ζωής του HPV [58]

Ένα χαρακτηριστικό της μόλυνσης από HPV είναι η λανθάνουσα φάση καθώς μετά τη μόλυνση, ο ιός μπορεί να παραμένει ανενεργός. Αυτός είναι ένας τρόπος με τον οποίο ο ιός μπορεί να ξεφύγει από το ανοσοποιητικό του ξενιστή καθώς στη μορφή αυτή δεν παράγονται κάποιες πρωτεΐνες του οι οποίες αν γινόταν αισθητές απ' τον ξενιστή θα ενεργοποιούσαν την ανοσολογική του απόκριση. Ο ιός υπάρχει σαν ένα γυμνό νουκλεϊκό οξύ συχνά ως επίσωμα το οποίο πολλαπλασιάζεται όταν τα κύτταρα του ξενιστή διαχωρίζονται.

1.6.1 Είσοδος στο κύτταρο ξενιστή και απέκδυση



Εικόνα 21 Μοντέλο πρόσδεσης των ισωματίων του HPV στα κύτταρα του ξενιστή και της εισόδου του σ'αυτά[55]

Ο κύκλος ζωής ξεκινά μόλις ο HPV εισέλθει στα βλαστικά κύτταρα του επιθηλίου (CSCs) μέσω πρόσδεσης της L1 σε υποδοχείς πρωτεογλυκανών ηπαρίνης (HSPs) των κυττάρων-στόχων. Αυτή η σύνδεση προκαλεί δομικές αλλαγές στο καψίδιο καθώς η L2 διασπάται σε κάποια σημεία στο N-τελικό άκρο και στη συνέχεια προσδένεται σε δευτερογενείς υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων που είναι απαραίτητοι για την είσοδο του ιού και την επακόλουθη μεταφορά του DNA στον πυρήνα. Τα ισωμάτια εισέρχονται στο κύτταρο αργά και στη συνέχεια ακολουθεί ενδοκύτωση (στους HPV-16 με κυστίδια κλαθρίνης), απελευθέρωση του καψιδίου και μεταφορά του γονιδιώματος στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη L2 εξασφαλίζει τη μεταφορά στον πυρήνα ενώ η L1 παραμένει στο ενδόσωμα και οδηγείται για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα [1, 6, 7].

1.6.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Αμέσως μετά την είσοδο του DNA στον πυρήνα, ακολουθεί ένας πρώτος κύκλος αντιγραφής του γονιδιώματος ανεξάρτητος από την αντιγραφή των κυττάρων του ξενιστή, ο οποίος θα βοηθήσει τον ιό να διατηρήσει ένα χαμηλό αριθμό αντιγράφων (περίπου 200 επισώματα σε κάθε κύτταρο). Στο στάδιο αυτό θεωρείται ότι απαιτείται η έκφραση των πρωτεϊνών E1 και E2 και είναι απαραίτητο για να καταφέρει ο ιός να εγκαθιδρύσει τη μόλυνση. Οι E1, E2 προσδέονται στο σημείο έναρξης της αντιγραφής και στρατολογούν κυτταρικές DNA πολυμεράσες και άλλες πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή [47]. Έτσι οι ιικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στα αδιαφοροποίητα κύτταρα και ο ιός ξεφεύγει από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή και εξασφαλίζει την παραμονή του σε αυτόν. Η διατήρηση των ιικών επισωμάτων στα βασικά κύτταρα είναι η κυριότερη λειτουργία της πρώιμης φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση των E1, E2, E6 και E7 είναι απαραίτητη για το συνεχή πολλαπλασιασμό των επισωμάτων. Οι E1 και E2 συνεργάζονται για να αρχίσει η αντιγραφή ενώ οι E6 και E7 τροποποιούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου για να εξασφαλίσουν ότι το DNA θα συνεχίσει να αντιγράφεται [48].

Μετά τη φάση της εγκαθίδρυσης, ακολουθεί η φάση διατήρησης στη φάση S του κυτταρικού κύκλου όπου το ιικό DNA αντιγράφεται συντονισμένα με τα χρωμοσώματα του κυττάρου-ξενιστή και τα ιικά γονιδιώματα κατανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα. Έτσι εξασφαλίζεται η παραμονή του ιού στον επιθηλιακό ιστό [49].

Όσο ο ιός κατευθύνεται στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου οι ιικές πρωτεΐνες αρχίζουν να παράγονται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τη φάση διατήρησης. Για να συνεχίσει ο ιός να πολλαπλασιάζεται και στα διαφοροποιημένα κύτταρα απαιτείται η λειτουργία της πρωτεΐνης E7 η οποία απενεργοποιεί την Rb. Σε απάντηση στη διαφοροποίηση του κυττάρου ξενιστή, ενεργοποιείται ο υποκινητής των όψιμων γονιδίων του ιού με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών. Έτσι τα αντίγραφα του ιού αυξάνονται σε εκατοντάδες ανά κύτταρο [4].

1.6.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

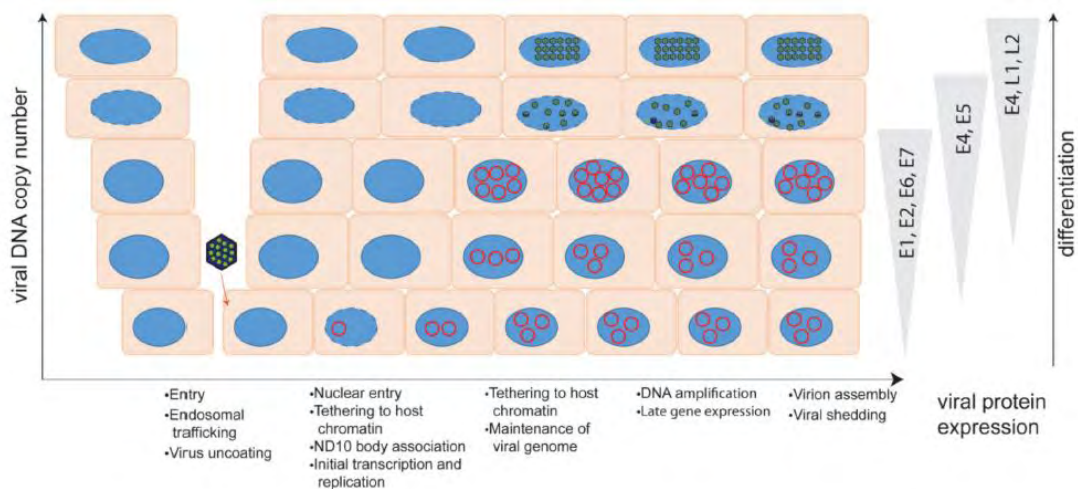
Όπως η διαδικασία της αντιγραφής, έτσι και αυτή της μεταγραφής εξαρτάται από τους μηχανισμούς του ξενιστή. Όλα τα mRNA είναι πολυκιστρονικά, περιέχουν πολλά εξόνια και ιντρόνια και προκύπτουν από τον ένα κλώνο του DNA. Η παραγωγή των πρωτεϊνών ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο καθώς και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων όπως με μεθυλίωση του DNA. Η μεταγραφή ρυθμίζεται κυρίως από την πρωτεΐνη E2 γι' αυτό το λόγο σε περιπτώσεις ενσωμάτωσης στις οποίες χάνεται το γονίδιο της E2 παρατηρείται απορρύθμιση και συνεχής έκφραση των ογκοπρωτεϊνών. Περίπου 90 bp καθοδικά του σημείου πρόσδεσης της E1 εντοπίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής [50].

Για όλους τους HPVs που ανήκουν στο γένος alpha έχουν βρεθεί 2 κύριοι υποκινητές. Ο ένας ρυθμίζει τη μεταγραφή των early γονιδίων (E1-E8) και είναι ο P97 για τους HPV16 and 31 και ο P105 για τους HPV18. Βρίσκεται στην περιοχή LCR και είναι συνέχεια ενεργός κατά τη διάρκεια του κύκλου αντιγραφής του ιού. Ο δεύτερος υποκινητής ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων late (L1,L2), είναι ο P670 για τους HPV16 και P742 για τους HPV31 και εντοπίζεται στο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου E7. Η λειτουργία του είναι ανάλογη της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων δηλαδή ενεργοποιείται στις διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλιακού ιστού [51].

1.6.4 Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση ιοσωματίων

Το τελευταίο βήμα για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού, απαιτεί το πακετάρισμα των ιικών γονιδιωμάτων που έχουν προκύψει από την αντιγραφή σε ιοσωμάτια. Αρχικά παράγεται η λιγότερη σε αφθονία πρωτεΐνη L2, πραγματοποιείται έξοδος του ιού από τον κυτταρικό κύκλο και στη συνέχεια παραγωγή της L1 που επιτρέπει το πακετάρισμα του γονιδιώματος. Δεν είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής πραγματοποιείται η σύνθεση των καψιδιακών πρωτεϊνών ωστόσο εξαρτάται από

αλλαγές στο μάτισμα των mRNA και από την παραγωγή μεταγράφων που τερματίζονται στη θέση πολυαδενυλίωσης. Η συναρμολόγηση των καψιδίων στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου φαίνεται να απαιτεί εκτός από τις πρωτεΐνες του καψιδίου και τη δράση της E2 η οποία ενισχύει την αποτελεσματικότητα της καψιδίωσης. Η L2 στο N-τελικό και C-τελικό της άκρο περιέχει κάποια σήματα τα οποία είναι υπεύθυνα για την τοποθέτησή της στον πυρήνα. Αν και τα ισωμάτια των ιών papilloma μπορούν να συναρμολογούνται και απουσία της L2, η παρουσία της συμβάλλει στο πακετάρισμα και ενισχύει τη μολυσματικότητα του ιού. Η L2 αλληλεπιδρά με την L1 μέσω μίας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο. Η απελευθέρωση των ισωματίων δεν απαιτεί καταστροφή των κερατινοκυττάρων. Η ωρίμανση των ικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στα ανώτερα στρώματα των κερατινοκυττάρων που πεθαίνουν λόγω απόπτωσης.



Εικόνα 22 Αριθμός των αντιγράφων του γονιδιώματος του HPV στο επιθήλιο, ανάλογα με τη στοιβάδα και την έκφραση των ικών γονιδίων [53]

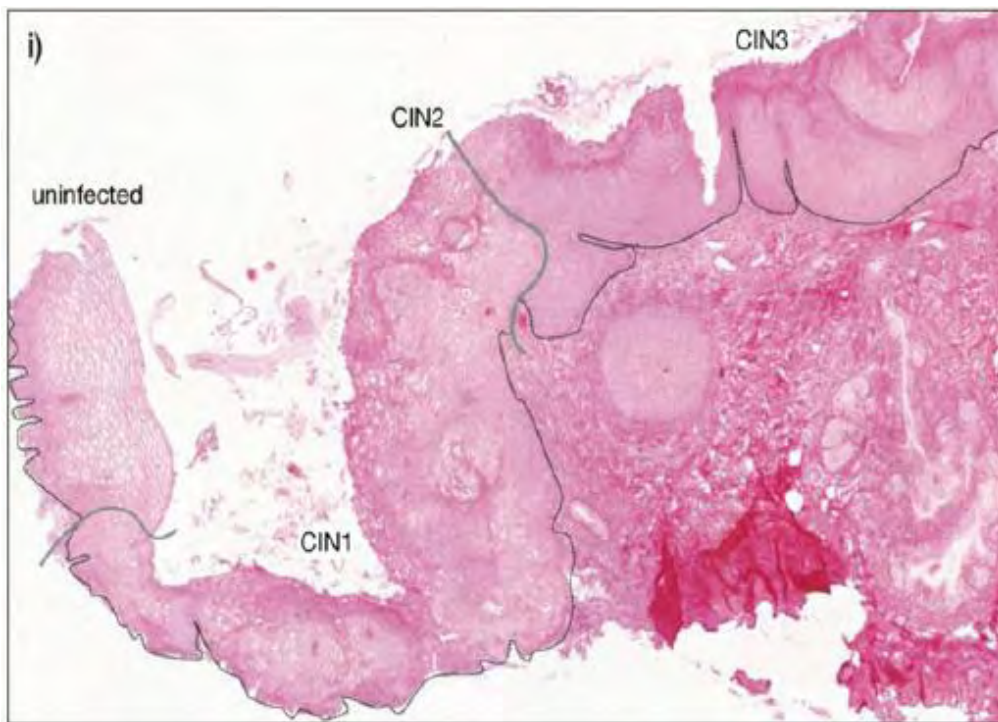
1.7 Κλινικά συμπτώματα-Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι ιοί papilloma έχουν εξελιχθεί εδώ και πολλές χιλιάδες χρόνια μολύνοντας διαφορετικά είδη ξενιστών. Αυτό έχει οδηγήσει στη δημιουργία πολλών διαφορετικών τύπων του ιού καθώς και στην εμφάνιση διαφορετικών στρατηγικών που ακολουθούν για την εγκαθίδρυση και τον πολλαπλασιασμό τους στο επιθήλιο. Μία στρατηγική που ακολουθούν ορισμένοι τύποι είναι να προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις παράγοντας χαμηλό αριθμό ισωματίων για μεγάλο χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα να κρατούν μειωμένα τα επίπεδα ικών γονιδίων. Κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης μόλυνσης, δεν απελευθερώνονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και δεν παράγονται σήματα για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και των κυττάρων του Langerhans και με αυτόν τον τρόπο ο ιός ξεφεύγει από το ανοσοποιητικό του ξενιστή. Αυτού του είδους οι μολύνσεις γενικά προκαλούνται από τους Betapapillomavirus και Gammapapillomavirus τους οποίους είναι ικανό να καταστείλει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Συνήθως οι τύποι αυτοί μολύνουν παιδιά και η μόλυνση συμβαίνει μετά τη γέννηση. Ωστόσο κάποιες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του επιθηλίου μπορεί να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή και να επιτρέψουν στον ιό να παράξει ορατά θηλώματα και σε κάποιες περιπτώσεις να κάνει πιο ευνοϊκό το περιβάλλον για εμφάνιση καρκίνου. Σε κάποιους Betapapillomaviruses οφείλεται ο μη μελανωματικός καρκίνος του δέρματος και τον προκαλούν με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν που προκαλούν καρκίνο οι Alphapapillomaviruses.

Μία δεύτερη στρατηγική απαιτεί την εξέλιξη πιο περίπλοκων μηχανισμών ώστε οι ιοί να ξεφεύγουν από τα συστήματα ανοσίας και επιτρέπει σε κάποιους τύπους να προκαλούν την ανάπτυξη εστιών με διακριτά παθολογικά χαρακτηριστικά όπως εμφανή και επίπονα θηλώματα. Αυτή η στρατηγική έχει εξελιχθεί κυρίως στους Alphapapillomaviruses συμπεριλαμβανομένων αυτών που προκαλούν κονδυλώματα των γενετικών οργάνων στους εφήβους ή τα κοινά κονδυλώματα στα παιδιά [52].

Οι papillomaviruses εμφανίζουν διαφορές στον τροπισμό και μπορούν να μολύνουν είτε το επιθήλιο του δέρματος είτε του βλεννογόνου. Οι διαφορές στον

τροπισμό προκύπτουν από διαφορές στη λειτουργία ιικών πρωτεϊνών, στα πρότυπα έκφρασης γονιδίων καθώς και στη διαφορετική ρύθμιση ανάλογα με τη θέση τους στο επιθήλιο. Μεταξύ αυτών που μολύνουν το επιθήλιο του δέρματος είναι οι 1, 5, 8, 14, 20, 21, 25 και 47, ιοί χαμηλής επικινδυνότητας οι οποίοι συνήθως εξαλείφονται μετά από κάποιους μήνες από το ανοσοποιητικό ή μπορεί ακόμη να προκαλέσουν καλοήθεις νεοπλασίες. Το επιθήλιο του βλεννογόνου προσβάλλουν οι τύποι 11, 13, 16, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 49, 51, 52, 56, 58 και 68 και μπορούν να προκαλέσουν δυσπλασίες και ενδοθηλιακές νεοπλασίες, μέχρι και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [8].



Εικόνα 9 Απεικόνιση ιστού με διαφορετικούς βαθμούς μετά από μόλυνση με HPV [7]

CIN	Normal	CIN 1/LSIL (Condyloma)	CIN 1/LSIL (Mild Dysplasia)	CIN 2/HSIL (Moderate Dysplasia)	CIN 3/HSIL (Severe Dysplasia/CIS)	Invasive Cancer
Histology of Squamous Cervical Epithelium						

Εικόνα 24 Αλλοίωση κυττάρων μολυσμένα με HPV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των αντιγράφων των ιικών γονιδιωμάτων των ιών υψηλού κινδύνου HPV 16 και HPV 18 μέσω του προσδιορισμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 καθώς και η συσχέτισή τους με το βαθμό της επιθηλιακής αλλοίωσης σε δείγματα ασθενών του ελληνικού πληθυσμού.

3.1 Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 98 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας εκ των οποίων τα 56 ήταν θετικά για τον ιό HPV-16, τα 29 θετικά για τον HPV-18 και 12 ήταν αρνητικά. Από τα θετικά ως προς τον HPV-16 δείγματα, τα 22 ήταν χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, τα 28 υψηλού βαθμού δυσπλασίας και τα 6 ήταν καρκινικά. Όσον αφορά τον HPV-18, τα 19 ήταν χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, τα 9 υψηλού βαθμού δυσπλασίας και 1 ήταν καρκινικό. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από το πανεπιστημιακό γενικό νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το γενικό αντικαρκινικό νοσοκομείο «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ» και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας ήταν αποθηκευμένα στο υγρό υλικό μέσο συντήρησης Thin Prep και συλλέχθηκαν κατά την περίοδο 2010-2015.

Πίνακας 2.1 Δείγματα θετικά για τον ιό HPV-16 (Χαμηλού Βαθμού Δυσπλασίας)

Κλινικά δείγματα	Βαθμός επιθηλιακής αλλοίωσης	Υλικό μέσο συντήρησης	Νοσοκομείο προέλευσης
9972-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9969-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10030-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s92-17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1213-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10644-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ1	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
2209	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
2290	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
2148	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
ΑΤΤ8	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
2121	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
2127	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
2216	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
A17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΝΛ13	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ80	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ13	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ9	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ98	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ8	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ12	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Πίνακας 2.2 Δείγματα θετικά για τον ιό HPV-16 (Υψηλού Βαθμού Δυσπλασίας)

Κλινικά δείγματα	Βαθμός επιθηλιακής αλλοίωσης	Υλικό μέσο συντήρησης	Νοσοκομείο προέλευσης
10647-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9974-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s386-17	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s2186-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10029-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1426-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10658-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10000-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9992-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1220-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1225-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9981-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10713-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10036-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
Δ16	HGSIL	παραφίνη	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΚΟΡΔΑΣ Β.
ΑΤΤ5	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
PNL11	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΝΛ5	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
Α3	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΑΤΤ16	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s102-17	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10021-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10720-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10693-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9983-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10715-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
Α24	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΝΛ9	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ

Πίνακας 2.3 Δείγματα θετικά για τον ιό HPV-16 (Καρκίνοι)

Κλινικά δείγματα	Βαθμός επιθηλιακής αλλοίωσης	Υλικό μέσο συντήρησης	Νοσοκομείο προέλευσης
10732-14	CANCER	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
Δ66	CANCER	παραφίνη	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΚΟΡΔΑΣ Β.
Δ64	CANCER	παραφίνη	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΚΟΡΔΑΣ Β.
Δ65	CANCER	παραφίνη	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΚΟΡΔΑΣ Β.
Δ63	CANCER	παραφίνη	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΚΟΡΔΑΣ Β.
ΠΝΛ7	CA in situ	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ

Πίνακας 3 Κλινικά δείγματα θετικά για τον HPV 18

Κλινικά δείγματα	Βαθμός επιθηλιακής αλλοίωσης	Υλικό μέσο συντήρησης	Νοσοκομείο προέλευσης
s11-16	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S70-17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s262-17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s401-16	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S 519-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s522-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9973-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1099/17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1403-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s5946-17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
1327	LGSIL	Thin Prep	«ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΑΣ»
ΑΤΤ99	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10021-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S439-16	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S1283-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S157-17	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9991-14	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s1432-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S512-15	LGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΠΝΛ24	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
s118/13	ADENO-CA	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s308-17	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s836-15	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S1303/10	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S1426/14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΠΝΛ39	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΑΤΤ84	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S1340-15	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
S2542-14	HGSIL	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Πίνακας 4 Δείγματα με φυσιολογική μορφή επιθηλιακού ιστού

Κλινικά δείγματα	Βαθμός επιθηλιακής αλλοίωσης	Υλικό μέσο συντήρησης	Νοσοκομείο προέλευσης
s1177-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10033-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10645-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10730-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10735-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10677-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10696-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s81-17	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
s101-17	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9967-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9975-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9997-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
9982-14	Φυσιολογικό	Thin Prep	ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Κατά την πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα κλινικά δείγματα. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) η οποία αποτελεί ένα χημικό σύμπλοκο που δρα ως χαοτροπικός παράγοντας και επιπλέον έχει την ικανότητα απενεργοποίησης νουκλεασών. Επομένως με την προσθήκη του συμπλόκου αυτού στα δείγματα αρχικά πραγματοποιείται λύση των κυττάρων και κατά δεύτερον μετουσίωση των ενζυμών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν αναστολείς της PCR [56].

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά, σε erpendorfs των 2ml προστέθηκαν κατά σειρά 10 μl γλυκογόνου το οποίο ήταν παγωμένο σε θερμοκρασία -20°C , 100 μl δείγματος και 300 μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0.5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Κατά το επόμενο στάδιο προστέθηκαν 400 μl ισοπροπυλικής αλκοόλης η οποία ήταν παγωμένη στους -20°C και ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στην κατάψυξη (-20°C). Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000 rcf, απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη 500 μl 70% παγωμένης αιθανόλης (-20°C) και ανάδευση. Πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις 14.000 rcf για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Τέλος, το ίζημα διαλύθηκε σε 100 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH_2O) και το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20°C .

3.3 Έλεγχος εκχύλισης

Για να διαπιστωθεί εάν η εκχύλιση στο προηγούμενο βήμα έγινε σωστά, πραγματοποιήθηκε PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) με ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στο γονίδιο αναφοράς GAPDH. Η αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR παρουσιάζονται παρακάτω:

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος της PCR
GAPDH F	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	250 bp
GAPDH R	TGATTTTGGAGGGATCTCGC	

Πειραματική διαδικασία:

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή σε τελικό όγκο 50 μl (45 μl από το μείγμα αντίδρασης και 5 μl δείγματος). Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε: dNTPs σε συγκέντρωση 1mM, 25 pmol από τον κάθε εκκινητή GAPDH F και R, 1.5 Units DNA πολυμεράσης (Dream Taq™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA) , Dream Taq buffer σε συγκέντρωση 1X (2mM MgCl₂) καθώς και ddH₂O.

Συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή(EPPENDORF):

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Στάδιο 1	95 °C	3 λεπτά	1
Στάδιο 2	95 °C	10 δευτερόλεπτα	40
Στάδιο 3	50 °C	30 δευτερόλεπτα	
Στάδιο 4	72 °C	1 λεπτό	
Στάδιο 5	72 °C	5 λεπτά	

- Στάδιο 1 – Αρχική αποδιάταξη
- Στάδιο 2 – Αποδιάταξη
- Στάδιο 3 – Υβριδισμός εκκινητών
- Στάδιο 4 – Επέκταση εκκινητών και πολυμερισμός αλυσίδας
- Στάδιο 5 – Τελική επιμήκυνση

Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε gel αγαρόζης 2%.

3.4 Μοριακή κλωνοποίηση για κατασκευή των πλασμιδίων HPV16,E6 και HPV18,E6

Στο στάδιο αυτό δημιουργήθηκαν δύο πλασμίδια τα οποία περιείχαν ως ένθεμα την αλληλουχία των γονιδίων E6 του HPV 16 και HPV 18 αντίστοιχα με σκοπό την μετέπειτα κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς. Η αλληλουχία του γονιδίου απομονώθηκε από δείγματα τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί για την ύπαρξη των ιών και στη συνέχεια ακολούθησε ο πολλαπλασιασμός της και η εισαγωγή της σε πλασμίδια μέσω της αντίδρασης τοποϊσομεράσης.

Τα βασικά στάδια της διαδικασίας ήταν:

1. Επιλογή και προετοιμασία του ενθέματος

Στην παρούσα εργασία το γονίδιο E6 ενισχύθηκε με PCR σε δείγματα τα οποία ήταν θετικά ως προς τους ιούς HPV 16 και HPV 18. Η ενίσχυση αυτή έγινε με την Dream Taq DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) η οποία είναι θερμοανθεκτική και έχει την ικανότητα κατά τον πολυμερισμό να προσθέτει αδενίνες στα 3' άκρα του προϊόντος.

2. Επιλογή και προετοιμασία του φορέα

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το pCR™2.1-TOPO του TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, by life Technologies, USA). Ο φορέας αυτός φέρει στο 3' άκρο μονόκλωνες αλληλουχίες θυμίνης και έτσι μπορεί να συνδεθεί με τα μονόκλιωνα άκρα της αδενίνης που περιέχει το ένθεμα.

3. Κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα

Τα μονόκλιωνα άκρα του γονιδίου E6 και του πλασμιδίου ενώθηκαν μέσω της δράσης της Τοποϊσομεράσης

4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα E. Coli.

5. Ανάπτυξη και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιείχε LB άγαρ και αμπικιλίνη.

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά στο μείγμα της αντίδρασης (1μl salt solution, 1 μl φορέα και 1 μl ddH₂O) προστέθηκαν 3 μl από το προϊόν της PCR και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Έπειτα σε tubes των 2 ml προστέθηκαν 200 μl κυττάρων JM109 και 6 μl από την προηγούμενη αντίδραση και αναδεύτηκαν ήπια. Τα δείγματα επώαστηκαν κατά σειρά στον πάγο για 30 λεπτά, σε υδατόλουτρο στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα και έπειτα στον πάγο για 2 λεπτά. Προστέθηκαν 200 μl των μετασχηματισμένων κυττάρων σε σωλήνες που περιείχαν 800 μl LB Broth και επώαστηκαν στους 37 °C για μία ώρα υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθως, 100 μl από την καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν αμπικιλίνη (1μl/ml) και x-Gal (50mg/ml). Τέλος ακολούθησε επώαση για όλη τη νύχτα στους 37 °C.

6. Colony PCR

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχθηκαν 3 λευκές επειδή αυτές περιείχαν το ένθεμα και την ικανότητα διάσπασης της β-γαλακτοσιδάσης και για την κάθε μία δημιουργήθηκε εναιώρημα σε 15 μl ddH₂O. Στη συνέχεια ακολούθησε Colony PCR για να επαληθευτεί η παρουσία του ενθέματος στο φορέα και σε μοριακό επίπεδο (η πρώτη επαλήθευση έγινε με την παρατήρηση των λευκών αποικιών). Για το λόγο αυτό η PCR πραγματοποιήθηκε με ζεύγη εκκινητών ειδικά τόσο για το γονίδιο E6 του HPV 16 όσο και για τον HPV 18.

Πειραματική διαδικασία:

Σε tubes της PCR προστέθηκαν 3 μl από κάθε εναιώρημα και ακολούθησε θέρμανση στους 95 °C για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό ήταν απαραίτητο για να γίνει η

λύση των κυττάρων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 22 μl από το Mastermix το οποίο περιείχε dNTPs (1mM), τους ειδικούς εκκινητές (25 pmol), Dream Taq (Thermo Fischer Scientific, USA ,1.25U), Dream Taq Buffer (1X) και ddH₂O.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'->3')	Μέγεθος προϊόντων της PCR
HPV 16 F3	ATGCACCAAAAAGAGAACTGC	186 bp
HPV 16 B3	ACAGCATATGGATTCCCATCTC	

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'->3')	Μέγεθος προϊόντων της PCR
HPV 18 F3	GACTCTGTGTATGGAGACACATT	202 bp
HPV 18 B3	GTTTCTCTGCGTCGTTGGA	

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Στάδιο 1	95 °C	3 λεπτά	1
Στάδιο 2	95 °C	30 δευτερόλεπτα	20
Στάδιο 3	50 °C	30 δευτερόλεπτα	
Στάδιο 4	72 °C	1 λεπτό	

Για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

7. Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA

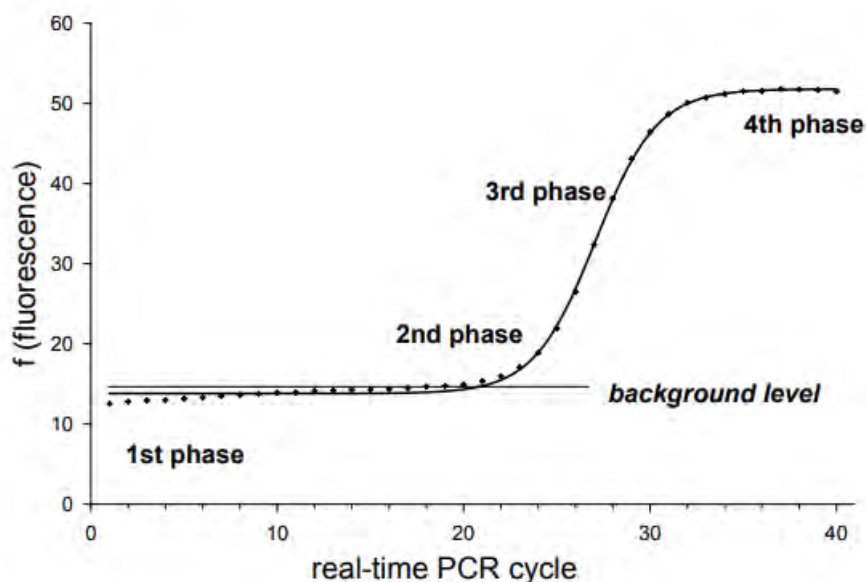
Μετά την επιβεβαίωση μέσω της Colony PCR της επιτυχούς κλωνοποίησης τα υπόλοιπα 12 ml από το εναιώρημα μεταφέρθηκαν σε 2 ml LB Broth και οι υγρές αποικίες επώστηκαν στους 37 °C για μία νύχτα. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Germany). Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενσωμάτωση του ενθέματος στο φορέα πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού ECORI το οποίο αναγνωρίζει αλληλουχίες εκατέρωθεν της αλληλουχίας του γονιδίου E6 καθώς και ηλεκτροφόρηση για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.5 Real time PCR (qPCR) σε υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις των πλασμιδίων

Η real time PCR βασίζεται στην κλασική PCR με τη διαφορά ότι ανιχνεύει την ενίσχυση του DNA στόχου έπειτα από κάθε κύκλο μέσω ενός σήματος φθορισμού. Με τον τρόπο αυτόν παρέχεται η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του προϊόντος και ανίχνευσης του αρχικού αριθμού αντιγράφων. Ο φθορισμός μπορεί να προέρχεται από ανιχνευτές DNA οι οποίοι προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA. Οι ανιχνευτές αυτοί (Taq Man Probe, Molecular Beacon, scorpion probes) φέρουν στα άκρα τους δύο χρωστικές και φθορίζουν μόνο όταν κοπεί ο αποσβέστης από την Taq πολυμεράση (Taq Man Probe), ή όταν απομακρυνθεί από την φθορίζουσα ουσία ο αποσβέστης (Molecular Beacon, scorpion probes) και υβριδισμός στην αλληλουχία στόχο. Επίσης ο φθορισμός μπορεί να προέρχεται από φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες προσδένονται μη ειδικά σε δίκλωνο DNA (SYBR Green, Eva green). Στη συγκεκριμένη εργασία η real time PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green.

Η Real Time PCR μπορεί να διακριθεί κυρίως σε 4 φάσεις (εικόνα 23). Κατά την πρώτη φάση η ποσότητα του φθορισμού είναι χαμηλότερη από αυτήν που αναμένεται κατά την ενίσχυση ενός ειδικού προϊόντος. Αυτό συμβαίνει καθώς ο στόχος αρχικά υπάρχει στην αντίδραση σε πολύ χαμηλά επίπεδα και η ποσότητά του αυξάνεται στο τέλος του κάθε κύκλου ενίσχυσης. Η δεύτερη φάση αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης (Ct) κατά τον οποίο η τιμή του φθορισμού ξεπερνά το κατώφλι επομένως από τη στιγμή που συμβαίνει αυτό και έπειτα θεωρείται ότι ο φθορισμός που εκπέμπει η χρωστική οφείλεται στο ειδικό προϊόν που έχει ενισχυθεί από τους εκκινητές και όχι σε διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα. Από την τιμή του Ct μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα αντιγράφων. Μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητό ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να ξεπεραστεί το κατώφλι. Στη συνέχεια ακολουθεί μία εκθετική φάση ενίσχυσης του στόχου όπου παρατηρείται απότομη αύξηση στην τιμή του φθορισμού και τέλος η φάση plateau όπου η τιμή του φθορισμού σταματά να αυξάνεται λόγω εξάντλησης της ποσότητας κάποιων εκ των αντιδραστηρίων. Εκτός από τη SYBR GREEN, στην παρούσα εργασία κατά τη διάρκεια της qPCR μετρήθηκε και ο φθορισμός μίας άλλης φθορίζουσας

χρωστικής, της ROX η οποία δε δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και δρα ως χρωστική αναφοράς επομένως κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ο φθορισμός που εκπέμπει θα πρέπει να παραμένει σταθερός [61].



Εικόνα 25 Στάδια της Real time PCR [Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.]

Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου στα κλινικά δείγματα για την εύρεση του αριθμού των αντιγράφων του ιού, ήταν απαραίτητη η κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις πλασμιδίων που περιείχαν το γονίδιο E6. Για το λόγο αυτό στα πλασμίδια (HPV 16 E6 και HPV 18 E6) που είχαν κατασκευαστεί με μοριακή κλωνοποίηση έγιναν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ και στη συνέχεια Real Time PCR στις συγκεντρώσεις αυτές. Επιπλέον, Real Time PCR έγινε και σε πλασμίδια που περιείχαν ως ένθεμα την αλληλουχία του γονιδίου GAPDH σε συγκεντρώσεις $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$.

Πειραματική διαδικασία:

Σε tubes της real time PCR προστέθηκαν 3μl δείγματος και 17 μl από το μείγμα της αντίδρασης που περιείχε τους εκκινητές (F3,B3, 5pmol/μl), H₂O(ελεύθερο νουκλεασών) καθώς και Master Mix(2X). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα MxPro 3005P στις ακόλουθες συνθήκες:

Θερμοκρασία Αντίδρασης	Χρόνος αντίδρασης	Αριθμός κύκλων
50°C	2 λεπτά	1
95°C	2 λεπτά	1
95°C	15 δευτερόλεπτα	35
60°C	1 λεπτό	

Έπειτα ακολούθησε Melting curve analysis μεταξύ των θερμοκρασιών 55 °C-95 °C. Με την ανάλυση αυτή, ουσιαστικά ανιχνεύουμε την ειδικότητα του προϊόντος που ενισχύθηκε κατά την PCR. Βασίζεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης του προϊόντος καθώς ανάλογα με το μέγεθος και την αλληλουχία οι διάφορες δίκλωνες αλληλουχίες αποδιάσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία αποδιάταξης η αλληλουχία που ενισχύθηκε βρίσκεται στη δίκλινη μορφή της επομένως η SYBR green δεσμεύεται στο DNA και ανιχνεύεται ο φθορισμός. Σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία αποδιάταξης όμως το προϊόν βρίσκεται σε μονόκλινη μορφή, επομένως η SYBR green δε μπορεί να δεσμευτεί.

3.6 Real time PCR στα κλινικά δείγματα

Για να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ του αριθμού των ιικών αντιγράφων όλων των δειγμάτων, ήταν απαραίτητο ο προσδιορισμός των αντιγράφων του γονιδίου E6 να γίνει με βάση τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου αναφοράς το οποίο στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν το GAPDH. Για το λόγο αυτό δεν εφαρμόστηκε απλή ποσοτική PCR όπως αυτή που εφαρμόστηκε για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αλλά συγκριτική (comparative quantitation). Έτσι, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο GAPDH (GAPDHF/GAPDHR) και στη δεύτερη εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο E6 (HPV 16 F3/ HPV 16 B3 και HPV 18 F3/HPV18 B3). Επομένως η τιμή της απορρόφησης από την αντίδραση με τους ειδικούς για το γονίδιο E6 εκκινητές, έγινε με βάση την απορρόφηση της χρωστικής (Calibrator) που λάμβανε το μηχάνημα από την αντίδραση με τους εκκινητές που στόχευαν στο γονίδιο GAPDH. Και οι δύο αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα στο ίδιο

μηχάνημα για να είναι δυνατή η σχετική ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με βάση τα πρότυπα.

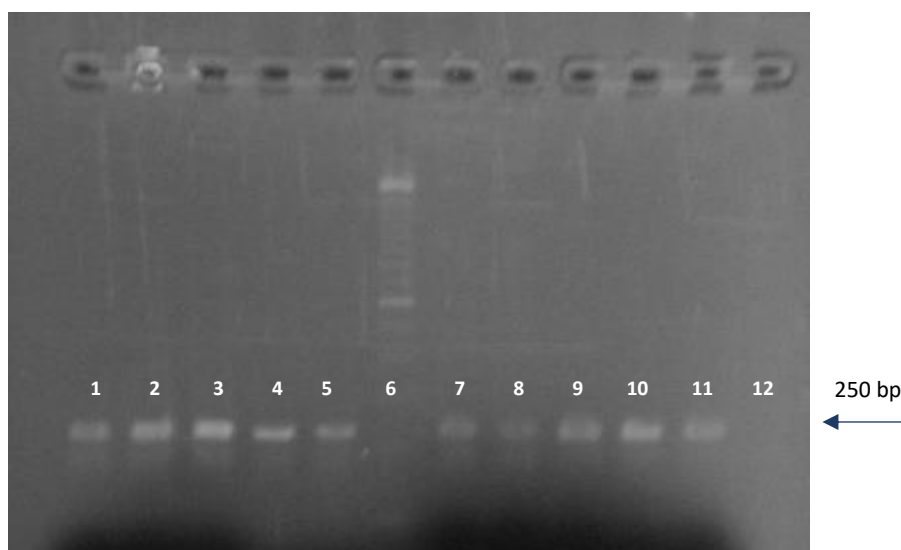
Πειραματική διαδικασία:

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 15 μl , 3 μl από το δείγμα και 12 μl από το μείγμα της αντίδρασης που περιείχε εκκινητές (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$), H_2O (ελεύθερο νουκλεασών) και Master Mix(2X). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα MxPro 3005 στις ίδιες συνθήκες στις οποίες έγινε η αντίδραση για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Σημείωση: και στα δύο είδη αντιδράσεων Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε dd H_2O ως control(NTC).

4.1 PCR για τον έλεγχο της εκχύλισης

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων έπειτα από την αντίδραση. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε gel αγαρόζης 2% σύμφωνα με την εξής διαδικασία: Σε κωνική φιάλη των 250 ml προστέθηκαν 0.8 g αγαρόζης σε 40 ml TBE (Tris- Boric acid-EDTA) και ακολούθησε θέρμανση του μείγματος για να λιώσει η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε προστέθηκε σε αυτό βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και το διάλυμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε tray ώστε να κρυώσει και να πήξει.



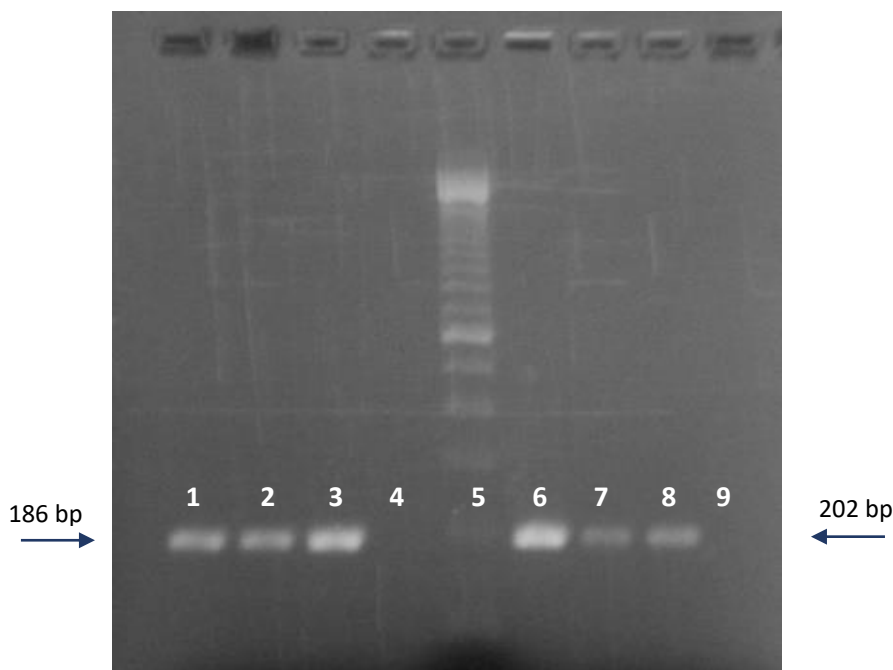
Εικόνα 26 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης από την PCR που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της εκχύλισης.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενδεικτικά από κάποια δείγματα. Οι θέσεις 1-5 και 6-9 αντιστοιχούν σε δείγματα στα οποία προηγουμένως έγινε εκχύλιση του DNA ενώ η θέση 10 στο θετικό μάρτυρα. Η θέση 6 αντιστοιχεί σε μάρτυρα μοριακού βάρους (100bp) ενώ στη θέση 12 έχει προστεθεί νερό αντί του δείγματος επομένως αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα.

Συμπέρασματα: Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε ότι τόσο τα δείγματα όσο και ο θετικός μάρτυρας εμφάνισαν μία ειδική ζώνη στη

θέση που αντιστοιχεί σε προϊόν μεγέθους 250 bp επομένως η απομόνωση του DNA κρίθηκε επιτυχής. Ανάλογη ήταν η εικόνα και για τα υπόλοιπα δείγματα στα οποία έγινε εκχύλιση του DNA.

4.2 Colony PCR



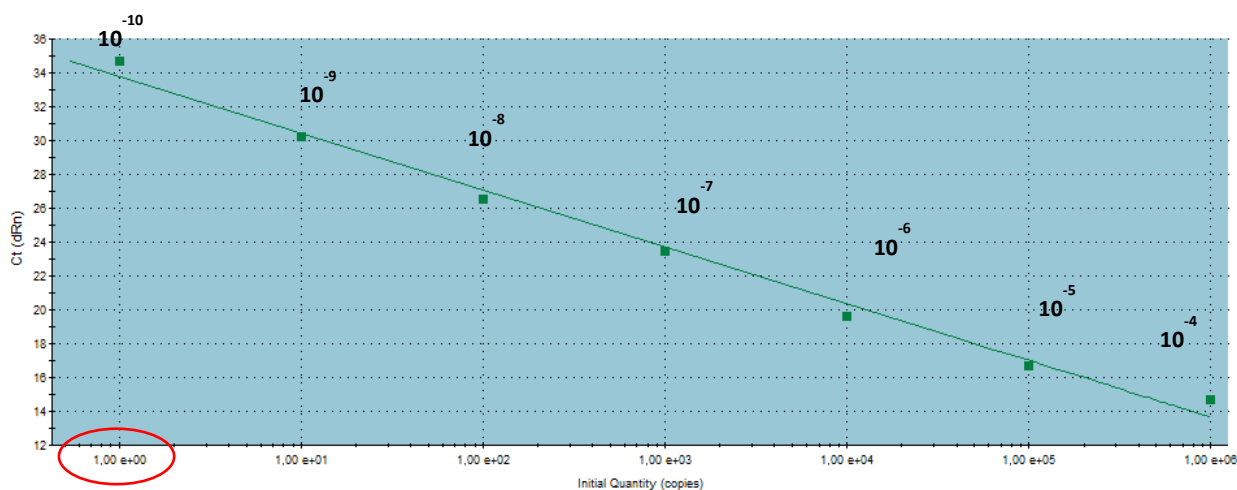
Εικόνα 27 Αποτελέσματα της Colony PCR που έγινε με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας της κλωνοποίησης

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Colony PCR που έγινε έπειτα από την κλωνοποίηση του γονιδίου E6 των ιών HPV 16 και HPV 18 σε πλασμιδιακούς φορείς. Στις θέσεις 1-3 αντιστοιχούν τα δείγματα από 3 διαφορετικές λευκές αποικίες που ως ένθεμα είχαν το γονίδιο E6 του HPV 16 και στις θέσεις 6-9 του HPV 18 αντιστοίχως. Οι θέσεις 4 και 9 αποτελούν το αρνητικό control ενώ η θέση 5 αντιστοιχεί σε ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (100bp).

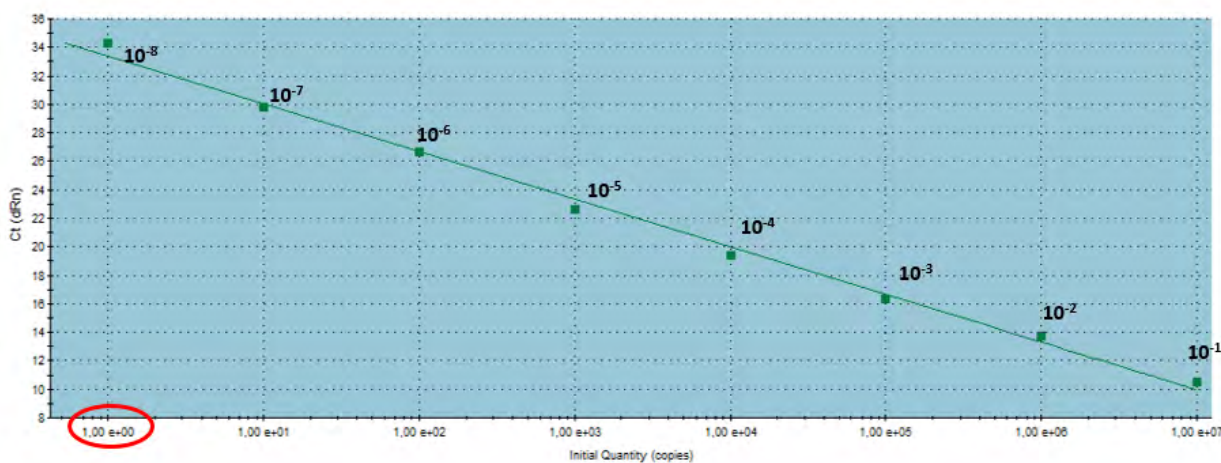
Συμπεράσματα: Παρατηρούμε ότι οι ζώνες ήταν ειδικές καθώς και ότι δεν εντοπίστηκαν ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες. Επομένως τα προϊόντα της κλωνοποίησης ήταν ικανά για χρήση με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

4.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

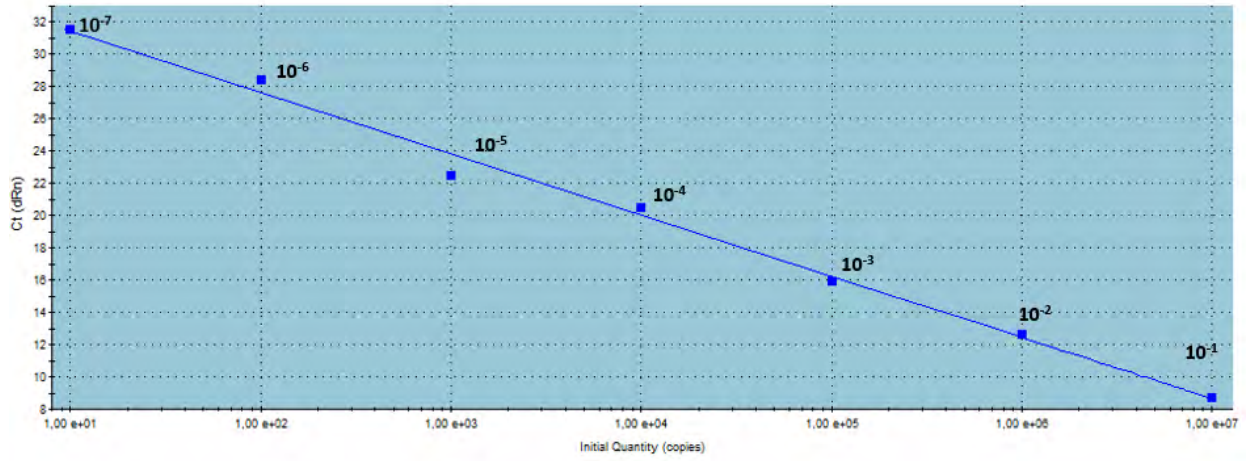
Από τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που περιείχαν ως ένθεμα την αλληλουχία του γονιδίου GAPDH καθώς και την αλληλουχία του γονιδίου E6 του HPV 16 και E6 του HPV 18 προέκυψαν οι εξής πρότυπες καμπύλες:



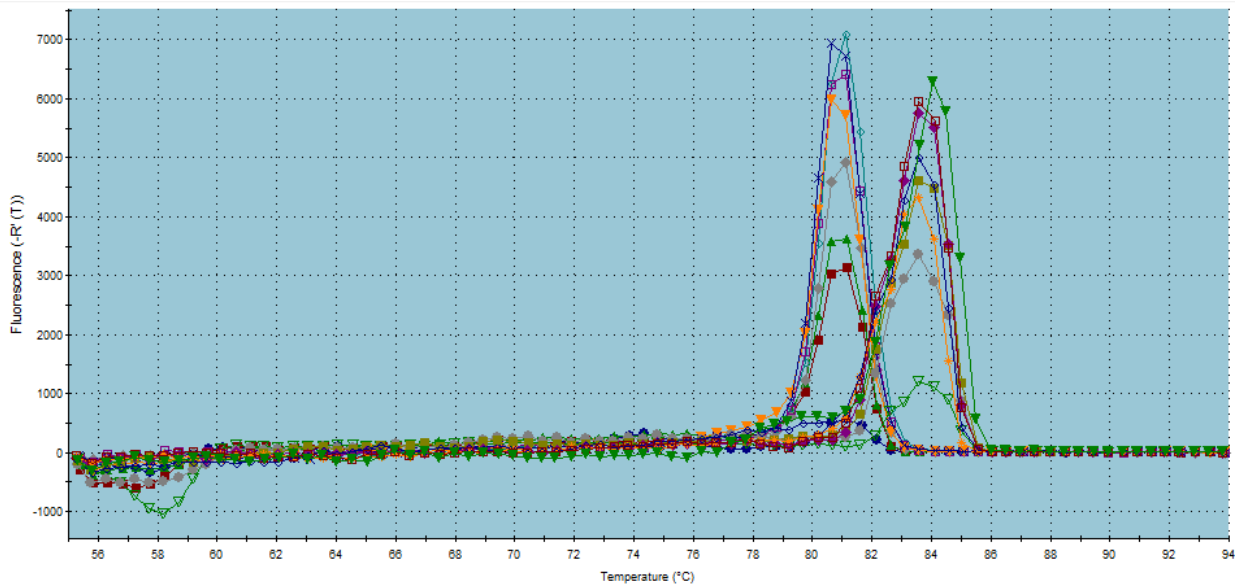
Εικόνα 28 Πρότυπη καμπύλη έκφρασης του γονιδίου GAPDH



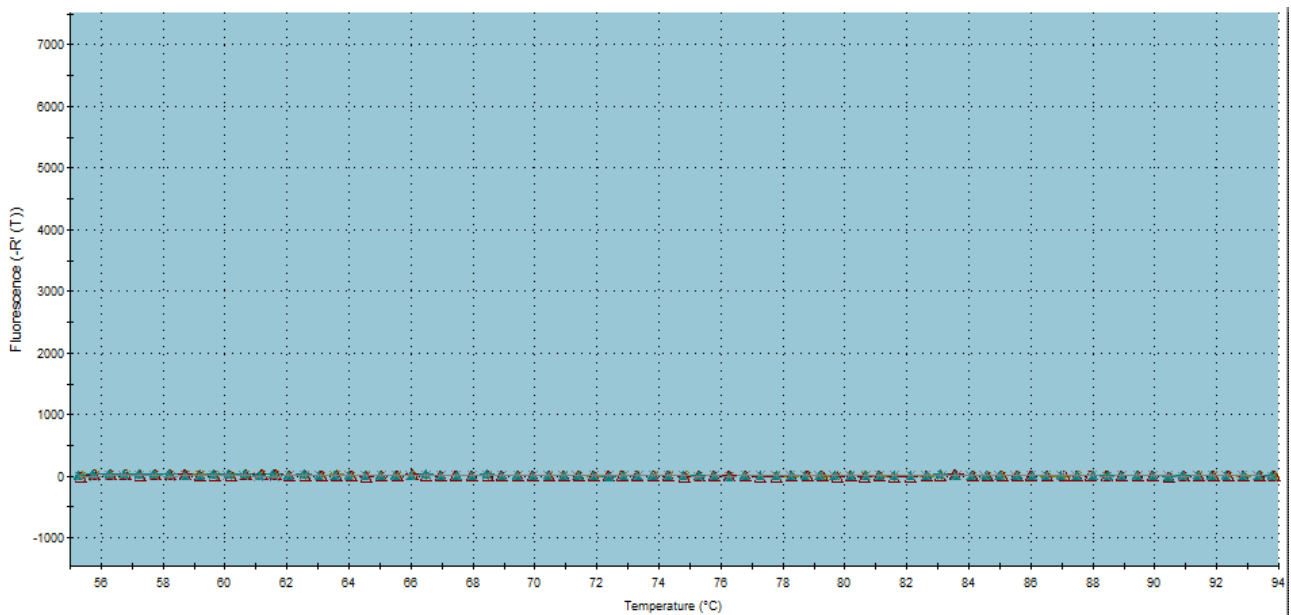
Εικόνα 29 Πρότυπη καμπύλη έκφρασης του γονιδίου E6 του ιού HPV 16



Εικόνα 30 Πρότυπη καμπύλη έκφρασης του γονιδίου E6 του ιού HPV 18



Εικόνα 31-i Melting curve analysis των προϊόντων της Real Time PCR των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κατασκευή πρότυπης καμπύλης



Εικόνα 32 ii Melting Curve analysis των NTC

Συμπεράσματα: Από τις παραπάνω πρότυπες καμπύλες συμπεραίνουμε ότι το ένα αντίγραφο του γονιδίου GAPDH προσδιορίζεται σε συγκέντρωση 10^{-10} ενώ η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε ήταν η $Y = -3.352 \cdot \text{LOG}(X) + 33.76$ με $\text{Eff.} = 98.8\%$. Όσον αφορά τις άλλες δύο καμπύλες το ένα αντίγραφο του γονιδίου E6 του ιού HPV 16 προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 10^{-8} , συγκέντρωση στην οποία εντοπίστηκε και το ένα αντίγραφο του ιού HPV 18. Οι εξισώσεις που προέκυψαν ήταν οι $Y = -3.349 \cdot \text{LOG}(X) + 33.39$ με $\text{Eff.} = 98.9\%$ και $Y = -3.518 \cdot \text{LOG}(X) + 35.29$ με $\text{Eff.} = 92.4\%$ για τους ιούς HPV 16 και HPV 18 αντιστοίχως. Επίσης από την melting curve analysis συμπεραίνουμε ότι τόσο για το γονίδιο GAPDH ($\theta=84$) όσο και για το γονίδιο E6($\theta=81$) το προϊόν που ενισχύθηκε ήταν ειδικό.

4.4 Real time PCR στα κλινικά δείγματα

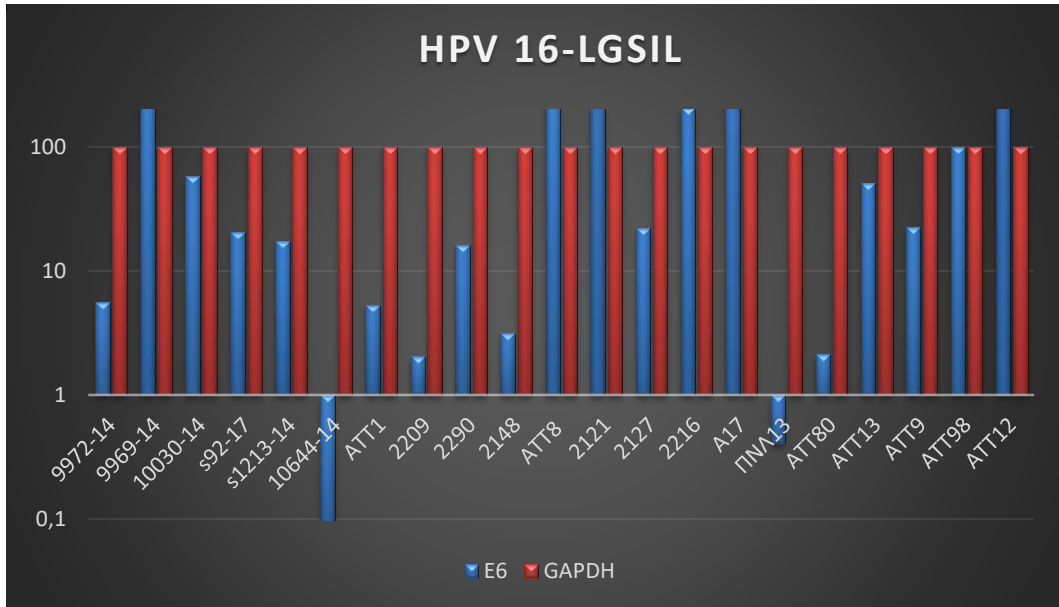
Όπως προαναφέρθηκε η κανονικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 έγινε με βάση τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς GAPDH. Αρχικά έγινε ο προσδιορισμός των αντιγράφων του γονιδίου GAPDH σε κάθε δείγμα συσχετίζοντας το Ct του με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό των

αντιγράφων του γονιδίου E6 σε κάθε δείγμα. Για κάθε δείγμα, το λογισμικό του προγράμματος Mx Pro 3005 έδωσε μία τιμή η οποία συσχετίζει τον αριθμό αντιγράφων του E6 γονιδίου ως προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς GAPDH. Επιτρέποντας έτσι τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων του ιού, έχοντας ίδιο αριθμό αντιγράφων της GAPDH και κατά συνέπια, ίσο αριθμό κυττάρων σε κάθε δείγμα.

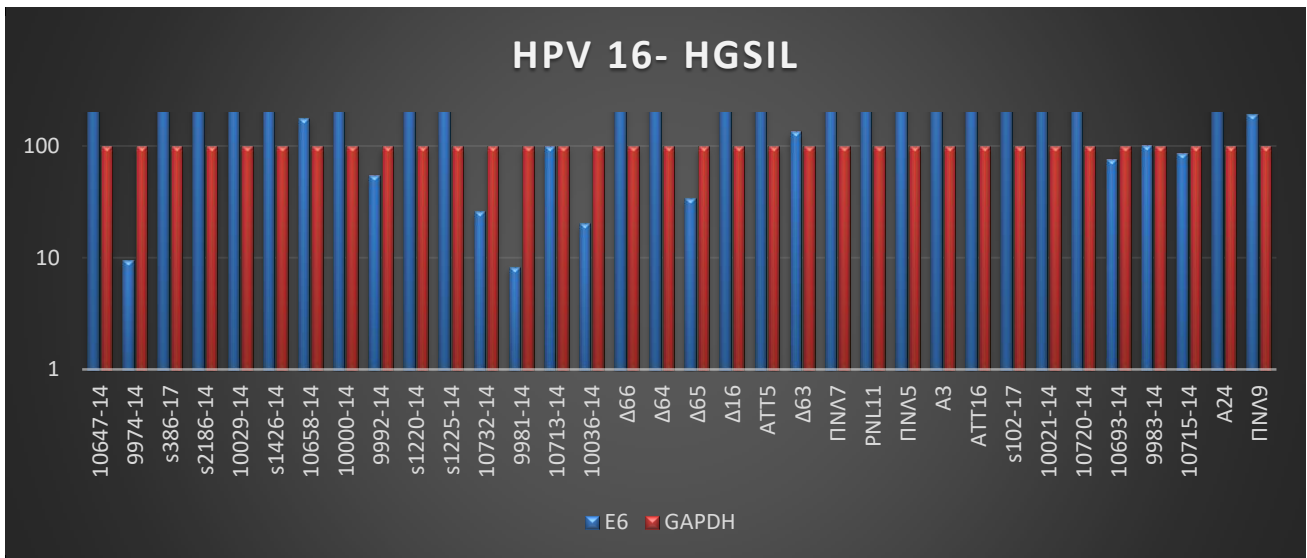
Από τα αποτελέσματα της Real-Time για τα αντίγραφα της GAPDH παρατηρήθηκε ότι κυμαίνονταν περίπου στα 100 αντίγραφα, οπότε και στην κανονικοποίηση ορίστηκε σαν τιμή τα 100 αντίγραφα της GAPDH. Έτσι στις στήλες των αντιγράφων του E6 που έχουν προκύψει έπειτα από κανονικοποίηση, αντιστοιχούν οι τιμές αντιγράφων του E6 γονιδίου, για 100 αντίγραφα GAPDH.

Πίνακας 5 Αποτελέσματα δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας θετικά για τον HPV 16

Δείγματα HPV 16 LGSIL	Αντίγραφα GAPDH	Αντίγραφα E6 (Πριν την κανονικοποίηση)	Αντίγραφα E6 (Μετά την κανονικοποίηση)
9972-14	19,46	2,41	5,58
9969-14	128,7	221,1	585
10030-14	399,8	73,1	58
s92-17	101,2	8,04	20,5
s1213-14	8,78	0,594	17,5
10644-14	1516	46,69	0,0895
ΑΤΤ1	615,4	24,99	5,34
2209	1050	15,63	2,03
2290	686,7	71,58	16
2148	3437	69,79	3,15
ΑΤΤ8	375,65	713,7	377
2121	1574	133400	26200
2127	14,39	5,89	22,1
2216	66,81	193,6	207
A17	10,08	520,5	2940
ΠΝΛ13	2440	7,12	0,409
ΑΤΤ80	1697	25,31	2,11
ΑΤΤ13	23,9	26,13	50,7
ΑΤΤ9	168,5	63,86	22,6
ΑΤΤ98	42,21	68,91	99,7
ΑΤΤ12	5,33	4163	71400



Εικόνα 33 Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 του HPV 16 σε σχέση με το γονίδιο GAPDH σε δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας



Εικόνα 34 Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 του HPV 16 σε σχέση με το γονίδιο GAPDH σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας

Πίνακας 6 Αποτελέσματα δειγμάτων υψηλού βαθμού δυσπλασίας θετικά για τον HPV 16

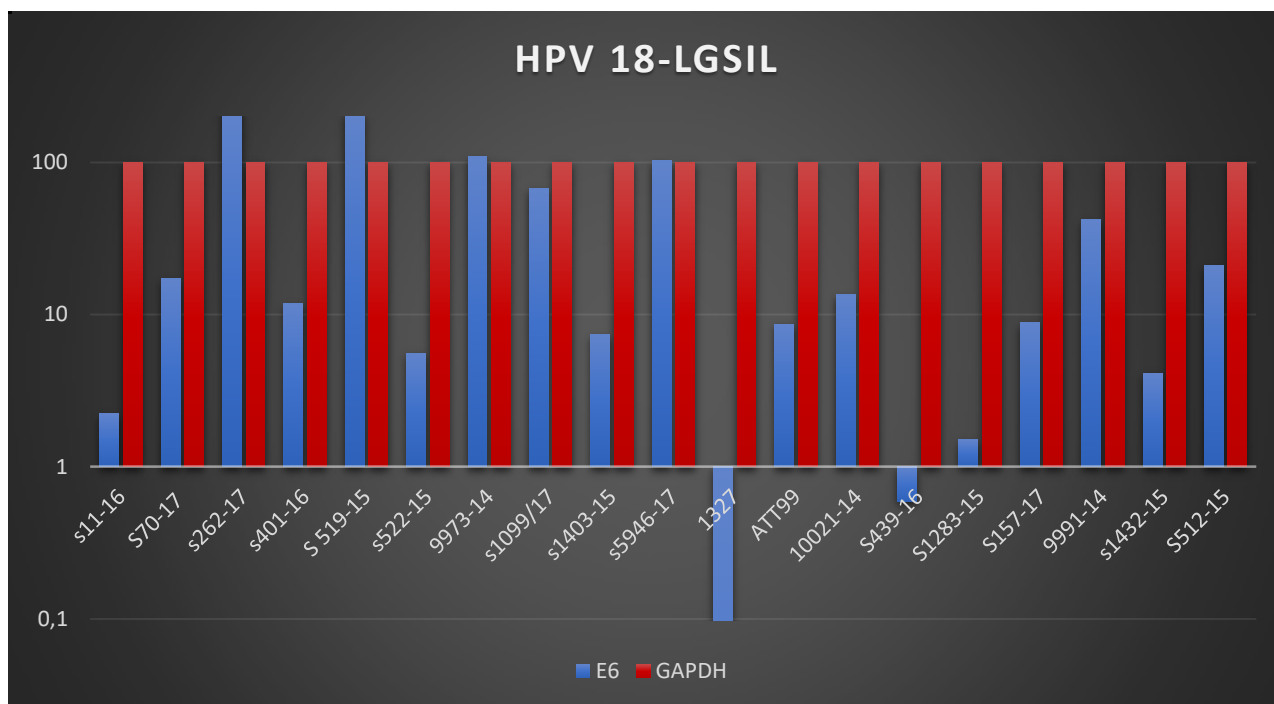
Δείγματα HPV 16 HGSIL	Αντίγραφα GAPDH	Αντίγραφα E6 (Πριν την κανονικοποίηση)	Αντίγραφα E6 (Μετά την κανονικοποίηση)
10647-14	63,88	7,99	81300
9974-14	79,3	14,31	9,41
s386-17	67,03	2953	2930
s2186-14	38,96	419,1	2780
10029-14	40,88	219,6	1710
s1426-14	45,01	166,8	987
10658-14	190,4	103,8	178
10000-14	13,07	19,93	1370
9992-14	305,9	22,87	54,8
s1220-14	4,3	43,65	3580
s1225-14	17,56	50,77	731
10732-14	261,2	54,01	26,3
9981-14	355,8	9,42	8,33
10713-14	12,2	18,48	98,8
10036-14	27,64	79,83	20,3
Δ66	2,33	62,66	1670
Δ64	1,2	41,24	2070
Δ65	43,98	26,8	34
Δ16	5,75	237,2	2890
ΑΤΤ5	7,77	993,7	10200
Δ63	23,4	53,82	136
ΠΝΛ7	21130	66020	839
ΡΝΛ11	1881	21090	2770
ΠΝΛ5	6369	27530	435
Α3	122,1	6612	4980
ΑΤΤ16	110,9	4816	3900
s102-17	16,17	8003	138300
10021-14	24,76	2854	36300
10720-14	84,66	3207	5030
10693-14	68,9	84,45	75,9
9983-14	50,23	40,47	103
10715-14	14,1	9,42	85,9
Α24	35,32	45710	144300
ΠΝΛ9	7,51	25,47	191



Εικόνα 35 Σύγκριση του αριθμού των ικών αντιγράφων του HPV 16 σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίας

Πίνακας 5 Αποτελέσματα δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας θετικά για τον HPV 18

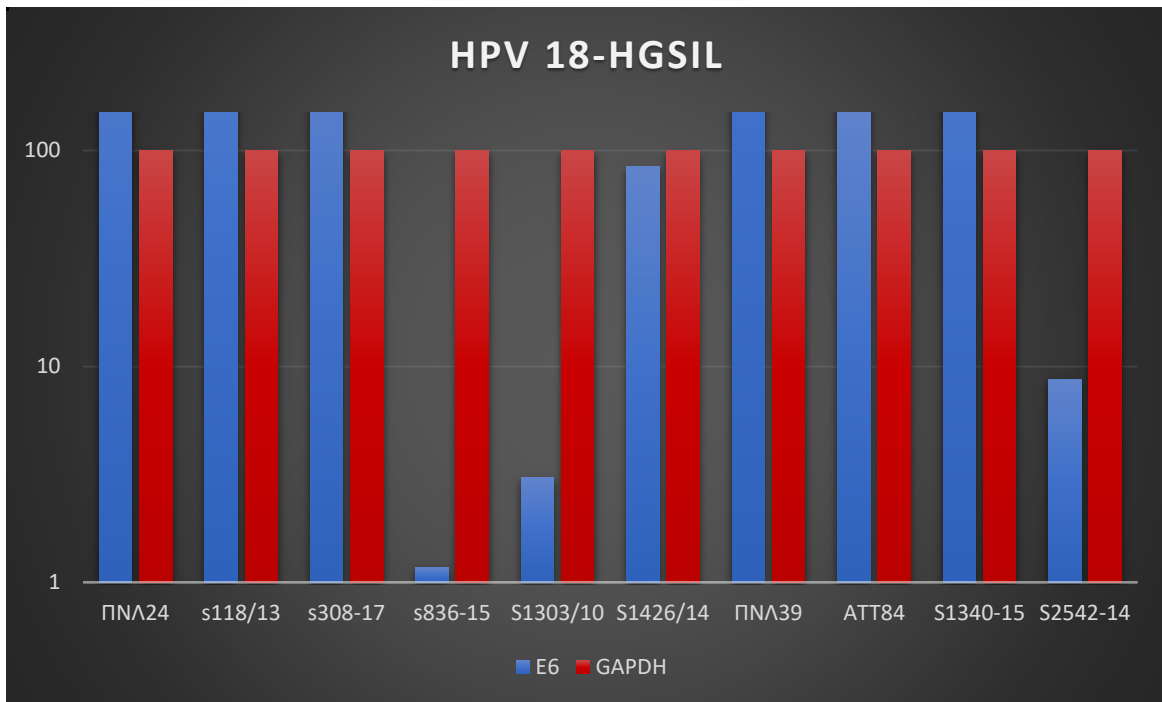
Δείγματα HPV 18 LGSIL	Αντίγραφα GAPDH	Αντίγραφα E6 (Πριν την κανονικοποίηση)	Αντίγραφα E6 (Μετά την κανονικοποίηση)
s11-16	54,02	4,75	2,236428
S70-17	95,41	1672000000	17,26921
s262-17	133,5	270,7	226,95
s401-16	582,6	20,81	11,82678
S 519-15	815	254,9	207,825
s522-15	133,5	10,57	5,5536
9973-14	42,21	140,8	108,9018
s1099/17	59,87	92,21	67,0544
s1403-15	84,92	13,46	7,371056
s5946-17	167,4	134,2	102,114
1327	2,8	136,6	1,876E-07
ΑΤΤ99	27,22	15,28	8,65596
10021-14	38,61	22,65	13,43628
S439-16	1,39	1,43	0,59075
S1283-15	5,18	3,29	1,5022
S157-17	12,9	15,47	8,8236
9991-14	37,83	61,1	41,9913
s1432-15	129	8,1	4,1022
S512-15	23,74	33,16	20,93868



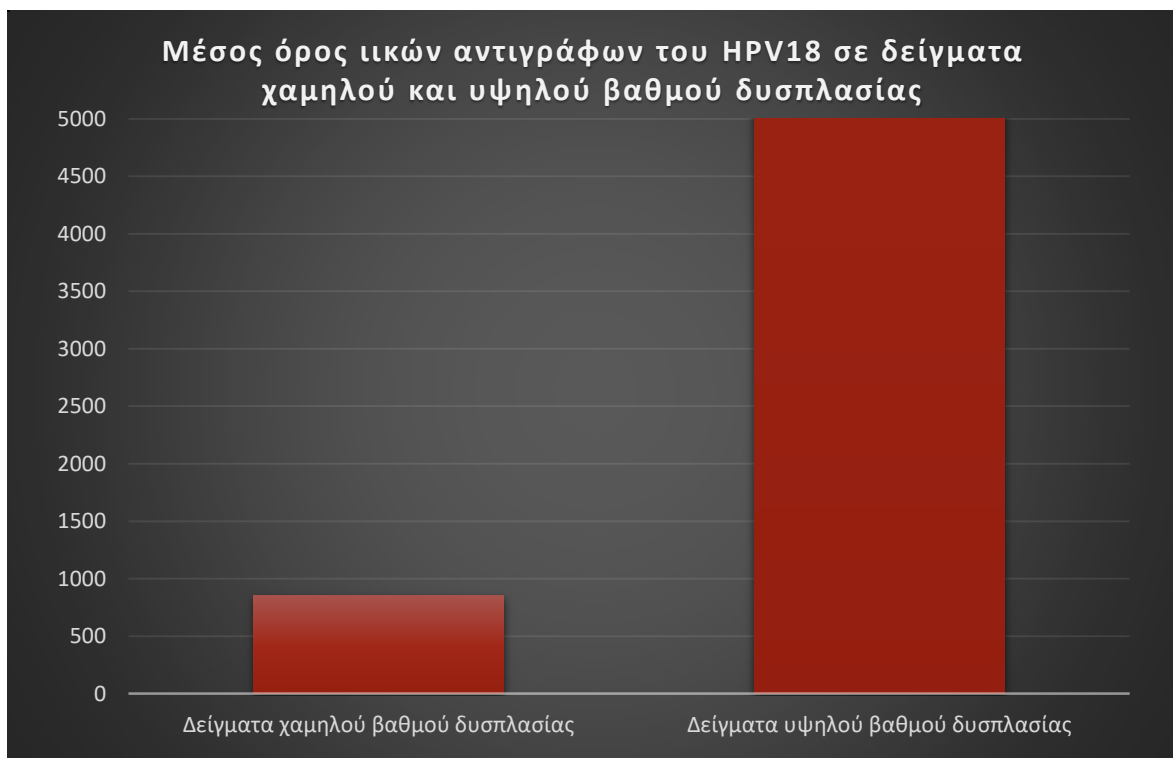
Εικόνα 36 Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 του HPV 18 σε σχέση με το γονίδιο GAPDH σε δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας

Πίνακας 6 Αποτελέσματα δειγμάτων υψηλού βαθμού δυσπλασίας θετικά για τον HPV 18

Δείγματα HPV 18 HGSIL	Αντίγραφα GAPDH	Αντίγραφα E6 (Πριν την κανονικοποίηση)	Αντίγραφα E6 (Μετά την κανονικοποίηση)
ΠΝΛ24	46,46	1456	1588,932
s118/13	32,53	1653	1834,692
s308-17	261,3	458,4	410,241
s836-15	10,65	2,64	1,1715
S1303/10	1,1	5,98	3,047
S1426/14	33,67	111,9	84,175
ΠΝΛ39	2127	11400	15952,5
ΑΤΤ84	25,6	203,7	167,936
S1340-15	95,4	44,61	3043,26
S2542-14	5,63	15,19	8,7265



Εικόνα 37 Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 του HPV 18 σε σχέση με το γονίδιο GAPDH σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας



Εικόνα 38 Σύγκριση του αριθμού των ικών αντιγράφων του HPV 18 σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίας

Πίνακας 6 Αποτελέσματα δειγμάτων με φυσιολογική μορφή επιθηλίου

Κλινικά δείγματα	Αντίγραφα GAPDH	Αντίγραφα E6
s1177-14	69,37	no copies
10033-14	76,38	no copies
10645-14	93,85	no copies
10735-14	3,98	no copies
10677-14	11,55	no copies
10696-14	95,81	no copies
s81-17	44,09	no copies
s101-17	327,6	no copies
9967-14	116,9	no copies
9975-14	127	no copies
9997-14	136	no copies
9982-14	150,8	no copies

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) ανήκουν στην οικογένεια Papillomaviridae και αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα προσβάλλοντας ένα σημαντικό εύρος ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Μετά την προσβολή, οι ιοί αυτοί εντοπίζονται στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και του δέρματος και συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Ωστόσο, εμμένουσα λοίμωξη από HPVs μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση κάποιων ασθενειών μεταξύ των οποίων μυρμηγκιές και κονδυλώματα τα οποία αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα. Σε πιο σπάνιες περιπτώσεις κάποιοι HPVs υψηλού κινδύνου (κυρίως οι HPV 16 και HPV 18) μπορεί να προκαλέσουν τραχηλικές δυσπλασίες και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [2, 5, 6].

Είναι μικροί ιοί, με διάμετρο που δε ξεπερνά τα 55 nm και διαθέτουν ένα δίκλωνο κυκλικό DNA μήκους περίπου 8.000 βάσεων. Το γονιδίωμά τους μπορεί να διακριθεί σε 3 περιοχές, την περιοχή των πρώιμων γονιδίων, την περιοχή όψιμων γονιδίων και την περιοχή LCR. Τα πρώιμα γονίδια (E1-E8) κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή και τον κύκλο ζωής του. Τα όψιμα γονίδια είναι απαραίτητα για το πακετάρισμα των ιικών γονιδιωμάτων και το σχηματισμό των καψιδίων. Η περιοχή LCR είναι μία μικρή περιοχή (850 bp) η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο καθώς σε αυτήν εντοπίζεται η θέση έναρξης της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος καθώς και θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων [1, 3].

Η κύρια ογκοπρωτεΐνη του ιού είναι η E6 καθώς μέσω της δράσης της αθανατοποιεί και μετασχηματίζει τα επιθηλιακά κύτταρα επάγοντας έτσι την ανάπτυξη και αύξηση του όγκου. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με πολλές πρωτεΐνες του ξενιστή, εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Πιο συγκεκριμένα προσδένεται

σε μία αλληλουχία LXXLL της E6AP (λιγάση της ουβικουιτίνης της πρωτεΐνης E6) και το σύμπλοκο που προκύπτει προσδένεται στη συνέχεια στην p53 η οποία ουβικουιτινώνεται από την E6AP και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Μία άλλη βασική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης πιθανώς μέσω ενεργοποίησης της TERT. Έτσι, η τελομεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στα τελομερή των χρωμοσωμάτων και καθυστερεί η γήρανση των κυττάρων [1, 3, 6, 32].

Όσον αφορά τη μορφή στην οποία εντοπίζεται το ιικό γονιδίωμα στα κύτταρα του ξενιστή, συνήθως παραμένει εκεί ως επίσωμα. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή στην οποία παρατηρείται υπερέκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 [1, 44]. Για το λόγο αυτό, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συσχέτιση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E6 των ιών υψηλού κινδύνου, HPV 16 και HPV 18 με το βαθμό αλλοίωσης του επιθηλιακού ιστού του τραχήλου της μήτρας σε κλινικά δείγματα ελληνίδων γυναικών.

Από δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, κατά το παρελθόν έχει γίνει συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας τόσο με τους τύπους του ιού HPV όσο και με το ιικό φορτίο αυτών. Όσον αφορά τον αριθμό αντιγράφων, έχει διαπιστωθεί αυξημένος αριθμός σε δείγματα με αυξημένο βαθμό αλλοίωσης του επιθηλιακού ιστού συμπέρασμα που συνάδει και με τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής [63, 64].

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, έγινε συλλογή των δειγμάτων και ακολούθησε εκχύλιση και απομόνωση του ιικού γονιδιώματος. Συλλέχθηκαν συνολικά 98 δείγματα, 56 θετικά ως προς τον ιό HPV 16, 29 θετικά ως προς τον HPV 18 και 12 αρνητικά ως προς τις δύο κατηγορίες ιών. Έπειτα ακολούθησε έλεγχος της εκχύλισης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές ειδικούς για την αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς GAPDH. Στην ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε, σε όλα τα δείγματα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί εκχύλιση, εντοπίστηκε ειδική ζώνη στις 250 bp ενώ στον αρνητικό μάρτυρα (ddH₂O) δεν εντοπίστηκε ζώνη. Επομένως η εκχύλιση κρίθηκε επιτυχής.

Σε μετέπειτα στάδιο, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και κατασκευή δύο πλασμιδίων τα οποία περιείχαν ως ένθεμα την αλληλουχία του γονιδίου E6 των ιών HPV 16 και HPV 18. Για την διαπίστωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης σε μοριακό επίπεδο, ακολούθησε colony PCR και τέλος απομόνωση και καθαρισμός του βακτηριακού DNA από τα κύτταρα. Δημιουργήθηκαν σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων αυτών καθώς και πλασμιδίων που είχαν ως ένθεμα την αλληλουχία του γονιδίου GAPDH, και ακολούθησε ποσοτική PCR (Real Time PCR) με σκοπό τη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης έκφρασης των γονιδίων αυτών. Από τις πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν, το ένα αντίγραφο του γονιδίου E6 τόσο για τον HPV 16 όσο και για τον HPV 18 προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA 10^{-8} ενώ ο προσδιορισμός του ενός αντιγράφου του γονιδίου GAPDH έγινε σε συγκέντρωση 10^{-10} . Από τις καμπύλες αναφοράς, προέκυψαν εξισώσεις με τις οποίες μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων αυτών και σε δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης.

Στο τελευταίο στάδιο της εργασίας, ακολούθησε συγκριτική Real Time PCR και κανονικοποίηση του αριθμού των ιικών ογκογονιδίων E6 μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς τα 100 αντίγραφα GAPDH και με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σε κάθε δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις στις ίδιες συνθήκες. Στη μία αντίδραση οι εκκινητές στόχευαν την αλληλουχία του γονιδίου GAPDH και στην άλλη την αλληλουχία του γονιδίου E6. Με βάση την τιμή της απορρόφησης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green στην αντίδραση με τους εκκινητές που ήταν ειδικοί για το γονίδιο GAPDH, το μηχάνημα μετρούσε την τιμή της απορρόφησης στην αντίδραση με το άλλο ζεύγος εκκινητών.

Από τα διαγράμματα που προέκυψαν είναι εμφανές ότι στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου E6 τόσο στα δείγματα που ήταν μολυσμένα με τον ιό HPV 16 όσο και σε αυτά που ήταν μολυσμένα με τον ιό HPV 18, ενώ δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο E6 στα δείγματα control. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύουν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών οι οποίες συσχετίζουν το βαθμό δυσπλασίας με αυξημένο ιικό φορτίο του ιού HPV 16 [63, 64]. Όσον αφορά τον HPV18, σε μελέτες που είχαν

πραγματοποιηθεί δεν είχε διαπιστωθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και του αριθμού των ιικών αντιγράφων [66].

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μπορεί να γίνει συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας των δειγμάτων που ήταν μολυσμένα με τους ιούς HPV 16 και HPV 18 και του αριθμού των αντιγράφων των ιών αυτών καθώς παρατηρήθηκε ότι όσο αυξημένος αριθμός ιικών αντιγράφων υπήρχε στα δείγματα, τόσο μεγαλύτερο βαθμό επιθηλιακής αλλοίωσης εμφάνιζαν. Ωστόσο θα πρέπει η συγκεκριμένη μέθοδος να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων έτσι ώστε τα αποτελέσματα αυτά να έχουν στατιστική ισχύ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pinidis P, Tsikouras P, IATRAKIS G, ZERVOUDIS S, KOUKOULLA Z, BOTHOU A, GALAZIOS G, VLADAREANU S, (2016). Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 11:48-54.
2. Horvath C, Boulet G, Renoux M, Delvenne P, Bogers J, (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview, 7:11.
3. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Murakami C, (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. Reviews in Medical Virology, 25:2-23.
4. JV Fernandes, Araújo TA, (2012). Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective, Dr. Davy Vanden Broeck (Ed.), ISBN: 978-953-307-860-1
5. Burd ME, (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews, 16:1-17
6. Doorbar J (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clinical Science, 110:525-541
7. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses, 5:55-70
8. Senba M, Mori N, (2012). Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. Oncology Reviews, 6:135-144
9. Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A (2009). HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. Archives of Medical Research, 6:428-434.
10. Bernard HU (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. Journal of Clinical Virology, 32:1-6.
11. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. Virology, 476:341-344
12. Fehrmann F, Laimins LA (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene, 22:5201-5207.
13. Zhi MZ, Baker C, (2006). PAPILOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. Frontiers in bioscience, 11:2286-2302
14. Wilson R, Fehrmann F, Laimins AL, (2005). Role of the E1^{E4} Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. Journal of Virology, 79:6732-6740.
15. Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T, (2012). The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. Journal of Virology, 6:3276-3283
16. Bergvall M, Melendy M, Archambault J, (2013). The E1 proteins. Virology, 1-2:35-56

17. McBride A, (2013). The Papillomavirus E2 Proteins. *Virology*, 445:57-79
18. Bernard H, Burk R, Chen Z, Doorslaer K, Hausen H, Michele E, (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*, 401:70-79.
19. Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R, Gaston K (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *Journal of Molecular Biology*, 334:979-991.
20. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA (2006). Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *Journal of Virology*, 80:9530-9543.
21. Johansson C, Schwartz S (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol*, 11:239-51.
22. Doorbar J, (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 1-2:80-98.
23. McIntosh PB1, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J (2010). E1^{E4}-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*, 12:2810-2822.
24. Yajid AI, Zakariah MA, Mat Zin A A, Othman N, (2017). Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18:315-319.
25. Müller M, Prescott ME, Wasson C, Macdonald A (2015). Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virology*, 10:27-39.
26. DiMaio D, Petti L (2014). The E5 Proteins. *Virology*, 445:99-114.
27. Hausen H, (2000). Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 92:690-8.
28. Moody CA, Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10:550-60.
29. Li B, Dou QP (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:3850-5.
30. Drews CM, Case S1, Vande Pol SB (2019). E6 proteins from high-risk HPV, low-risk HPV, and animal papillomaviruses activate the Wnt/ β -catenin pathway through E6AP-dependent degradation of NHERF1. *PLoS Pathog*, 15:e1007575.
31. Delury C, Marsh E, James C, Shi Boon S, Banks L, Knight G, Roberts S (2013). The Role of Protein Kinase A Regulation of the E6 PDZ-Binding Domain during the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 18. *J Virol*, 87:9463-9472.
32. Vande Pol S, Klingelhutz A, (2014). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445:115-137.
33. Xu M, Luo W, Elzi DJ, Grandori C, Galloway DA (2008). NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol*, 28:4819-28.

34. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8211-8216.
35. Bello J, Nieva L, Paredes A, Gonzalez A, Zavaleta L, Lizano M. Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7, (2015) *Oncoproteins. Viruses*, 7:4734-55.
36. Romana A, Munger K, (2014). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445:138-168.
37. McLaughlin-Drubin M, Munger K, (2009). Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1782:127-150.
38. Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM, (2011). Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol*, 85:8080-92.
39. Buck C, Day P, Trus B, (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445:169-74.
40. Wang JW, Roden RB (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445: 175-86.
41. Marusic MB, Mencin N, Licen M, Banks L, Grm HS, (2010). Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *J Virol*, 84:11585-9.
42. Bernard HU, (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*, 7:219-37.
43. Stünkel W, Bernard HU (1999). The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol*, 73:1918-30.
44. Häfner N, Driesch C, Gajda M, Jansen L, Kirchmayr R, Runnebaum IB, Dürst M, (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*, 27:1610-7.
45. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ, (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*, 6:45-57.
46. McBride AA, Warburton A, (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog*, 13:e1006211.
47. Hamid NA, Brown C, Gaston K (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*, 66:1700-17.
48. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS, (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*, 274:2696-705.
49. Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF (1999). Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology*, 362:344-54.
50. Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L, (2018). Regulation of HPV transcription. *Clinics (Sao Paulo)*, 73:e486s.

51. Graham SV (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*, 5:1493-506.
52. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7:3863-90.
53. Porter SS, Stepp WH, Stamos JD, McBride AA (2017). Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. *Virus Res*, 231:10-20.
54. Braaten KP, Laufer MR, (2008). Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol*, 1:2-10.
55. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Viol J*, 7:11
56. P.E. Mason, G.W. Neilson, C.E. Dempsey, A.C. Barnes, J.M. Cruickshank, (2003). The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:4557-31.
57. Carrasco D, Melody Van der Straten, Tying KS, (2001). Prophylactic and Therapeutic Vaccines for Genital Papillomavirus Infection. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3:238-243.
58. ShickRyu W, (2017). *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Academic press, 1st Edition, chapter 7.
59. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Vande Pol S, Podjarny A, Travé G, Zanier K, (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, 529:541-5.
60. Dreier K, Scheiden R, Lener B, Eehalt D, Pircher H, Müller-Holzner E, Rostek U, Kaiser A, Fiedler M, Ressler S, Lechner S, Widschwendter A, Even J, Capesius C, Jansen-Dürr P, Zwerschke W, (2011). Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. *Virology*, 409:54-68.
61. Yibing J, (2012). Chapter 3 Real Time PCR. *Methods in cell biology*, 112:55-68.
62. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW, (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 31:e122.
63. Long W, Yang Z, Li X, Chen M, Liu J, Zhang Y, Sun X, (2018). HPV-16, HPV-58, and HPV-33 are the most carcinogenic HPV genotypes in Southwestern China and their viral loads are associated with severity of premalignant lesions in the cervix. *Virology Journal*, 15:94.
64. Segondya M, Ngoua J, Kellyc H, Omard T, Goumbri-Lompoe O, Doutreb S, Mayaudc P, Didelota M, (2018). Diagnostic value of human papillomavirus (HPV) 16 and HPV18 viral loads for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+) in a cohort of African women living with HIV. *Journal of Clinical Virology*, 99-100 : 79-83
65. World Health Organization (2018). Early diagnosis and screening in cancer prevention. Retrieved from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>

66. Wanga W, Zhangb X, Lic, Haoa C, Zhaoa Z, Lianga H, (2018). Association between viral loads of different oncogenic human papillomavirus types and the degree of cervical lesions in the progression of cervical Cancer. *Clinica Chimica Acta*, 483 : 249 - 255