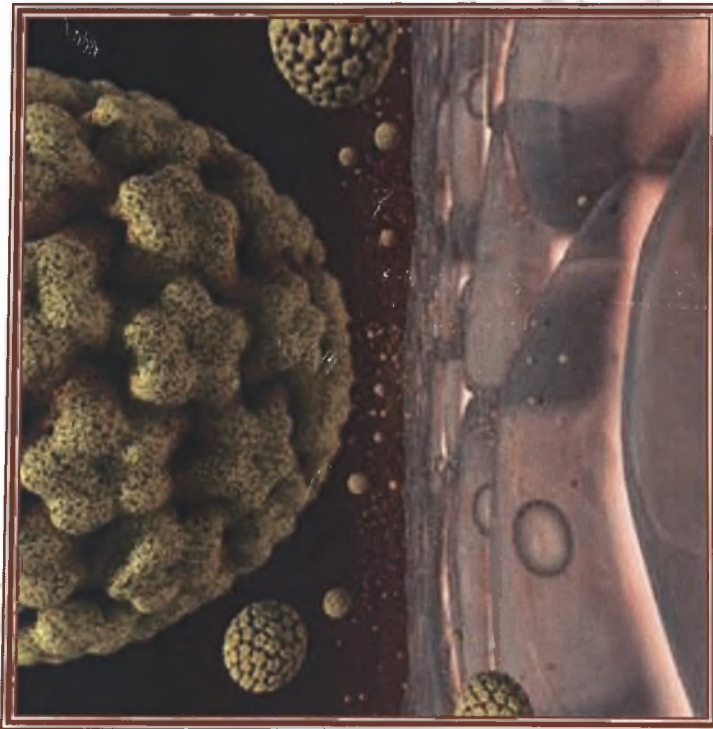




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ  
ΤΩΝ ΙΩΝ ΗΡV-16 ΣΤΗΝ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ  
LCR (LONG CONTROL REGION)**



**ΕΥΔΟΚΙΜΟΥ ΜΑΡΙΟΣ**

**Επιβλέπων: Αν. Καθηγητής Παναγιώτης Μαρκουλάτος**

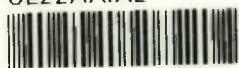
**Λάρισα  
2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6949/1  
Ημερ. Εισ.: 20-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
ΕΥΔ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



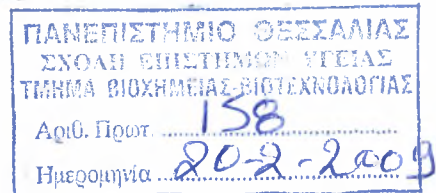
004000087333

Στους γονείς μου, Ευδόκιμο και Λούλλα  
για τις αμέτρητες θυσίες τους.

# Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2007 μέχρι Ιούνιο 2008.

**Επιβλέπων Καθηγητής :** Μαρκουλάτος Παναγιώτης



## Τριμελής Επιτροπή

**Π. Μαρκουλάτος :** Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης  
Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία  
του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ζ. Μαμούρης :** Καθηγητής Γενετικής  
Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δ. Μόσιαλος :** Λέκτορας  
Βιοτεχνολογία Μικροβίων

**Κατάθεση Πτυχιακής εργασίας :** 20 / 02 / 2009

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, την επίβλεψη, την βοήθεια και την πολύτιμη καθοδήγηση του κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό του, που ήταν πραγματικά τιμή για μένα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δεδεψίδη Ευάγγελο και την κα. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα υποψήφιοι διδάκτορες, για την πολύτιμη βοήθεια τους στην επίλυση διάφορων προβλημάτων που προέκυψαν κατά την διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω για την βοήθεια και καθοδήγηση τους, τους συνάδελφους Τσακογιάννη Δημήτριο και Γκορτσίλα Πασχάλη με τους οποίους συνεργάστηκα σε ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων μου.

Με την ευκαιρία αυτή που μου δόθηκε γνώρισα τον σωστό τρόπο λειτουργίας ενός εργαστηρίου που αξιοποιεί στο έπακρο κάθε πόρο που του δίνεται με αποτέλεσμα να διεξάγει πειράματα με συνέπεια και να εξάγει αποτελέσματα στο μέγιστο των δυνατοτήτων του. Γι'αυτό είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων που άνηκα έστω και για λίγο στο εργαστήριο αυτό, από το οποίο αποκόμισα πολλές γνώσεις που είμαι σίγουρος ότι θα μου φανούν πολύ χρήσιμες στο μέλλον.

# Περιεχόμενα

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Περίληψη.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1. Ιστορικά.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2. Βιολογία των papilloma .....</b>                          | <b>11</b> |
| 2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....                                  | 11        |
| 2.2 Ταξινόμηση.....   | 12        |
| 2.2.1 Alpha-papillomavirus .....                                | 15        |
| 2.2.2 Beta-papillomavirus.....                                  | 16        |
| 2.2.3 Gamma, Mu και Nu-papillomavirus .....                     | 16        |
| <b>3.Εξέλιξη .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>4. Δομή του HPV.....</b>                                     | <b>18</b> |
| 4.1 Καψίδιο.....  | 18        |
| 4.1.1 Πρωτεΐνη L1 .....   | 19        |
| 4.2 Γονιδίωμα του HPV .....                                     | 20        |
| 4.2.1 Πρωτεΐνη E1 .....   | 21        |
| 4.2.2 Πρωτεΐνη E2 .....   | 22        |
| 4.2.3 Πρωτεΐνη E4 .....   | 23        |
| 4.2.4 Πρωτεΐνη E5 .....   | 23        |
| 4.2.5 Πρωτεΐνη E6 .....   | 24        |
| 4.2.6 Πρωτεΐνη E7 .....   | 25        |
| 4.2.7 LCR (Long Control Region).....                            | 27        |
| <b>5. Ο κύκλος ζωής των HPV.....</b>                            | <b>31</b> |
| 5.1 Είσοδος του ιού.....  | 31        |
| 5.2 Επισωματική και ενσωματωμένη μορφή του ιϊκού γενώματος..... | 33        |
| 5.3 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος.....                          | 34        |
| 5.4 Διέγερση κυττάρων για πολλαπλασιασμό .....                  | 35        |
| 5.5 Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος .....                         | 35        |
| 5.6 Σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων.....                           | 37        |
| <b>6. HPV στους ανθρώπους.....</b>                              | <b>37</b> |
| 6.1 Η ανεπιτυχής μόλυνση ως πρόδρομος του καρκίνου .....        | 37        |
| 6.2 Ανοσολογική απόκριση .....                                  | 38        |
| 6.3 Εκδηλώσεις.....   | 39        |
| 6.4 Τρόποι μετάδοσης.....                                       | 40        |
| 6.5 Εμβόλιο.....  | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.6 Διάγνωση HPV μόλυνσης.....  | 41        |
| 6.6.1 Pap test.....   | 41        |
| 6.6.2 Hybrid Capture II.....  | 41        |
| 6.6.3 PCR.....  | 42        |
| 6.6.4 Nested PCR.....   | 43        |
| <b>7. Υλικά και μέθοδοι.....</b>  | <b>44</b> |
| 7.1 Δείγματα .....  | 44        |
| 7.2 Προετοιμασία Δειγμάτων .....  | 44        |
| 7.3 Εκκινητές.....  | 45        |
| 7.4 Μάρτυρες.....   | 46        |
| 7.5 Επιβεβαίωση της επιτυχίας της εκχύλισης .....                       | 46        |
| 7.6 PCR των δειγμάτων με primers για την ενίσχυση της LCR .....         | 47        |
| 7.7 Nested PCR.....   | 49        |
| 7.8 Nested PCR με GoTaq Flexi DNA Polymerase .....                      | 50        |
| 7.9 Κλωνοποίηση (Cloning).....  | 51        |
| 7.10 RFLP.....  | 51        |
| <b>8. Επεξεργασία αποτελεσμάτων .....</b>                               | <b>52</b> |
| 8.1 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR .....       | 52        |
| 8.2 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών .....                         | 52        |
| <b>9. Αποτελέσματα.....</b>   | <b>52</b> |
| 9.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης .....                                | 52        |
| 9.1 Αποτελέσματα της ενίσχυσης της LCR με PCR (HPV7099 και HPV480)..... | 54        |
| 9.2 Nested PCR.....   | 54        |
| 9.3 Nested PCR με GoTaq Flexi Πολυμεράση.....                           | 55        |
| 9.4 RFLP με EcoRI.....  | 56        |
| 9.5 Αποτελέσματα από την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών .....   | 57        |
| <b>10. Συζήτηση .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>11. Βιβλιογραφία.....</b>  | <b>65</b> |



## Περίληψη

Οι ιοί Papilloma είναι οι ιοί των θηλωμάτων. Το όνομα τους προέρχεται από την λατινική λέξη Papilla, δηλαδή θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma (όγκος). Οι Papilloma ιοί συγκροτούν την μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Ο human papilloma virus (HPV) δηλαδή ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων, ανήκει σ' αυτή την μεγάλη οικογένεια και προσβάλλει τον άνθρωπο.

Η ανακάλυψη του Papillomavirus έγινε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, συγκεκριμένα το 1933 από τον Richard Shope έπειτα από την απομόνωση του από κουνέλια που είχαν προσβληθεί από τον ιό αυτό. Οι Papilloma είναι μικροί ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα με διάμετρο 52-55nm και δίκλωνο κυκλικό DNA μήκους περίπου 8000 bp που κωδικοποιεί οκτώ ιικές πρωτεΐνες και περιέχει μια ρυθμιστική περιοχή, την LCR. Η LCR είναι μια περιοχή μετά την κωδικοποιούσα για την L1 πρωτεΐνη περιοχή. Η μεταγραφή και ο κύκλος ζωής των ιών αυτών ρυθμίζεται από την LCR, ένα τμήμα περίπου 900bp που περιέχει ρυθμιστικές περιοχές μεταγραφικών παραγόντων.

Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 γενότυποι HPV, οι οποίοι μολύνουν δερματικούς και βλεννογόνους ιστούς του γεννητικού συστήματος. Αυτοί που προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του γεννητικού συστήματος χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την σοβαρότητα της βλάβης που προκαλούν και την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου. Στην πρώτη ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High Risk) ανήκουν ιοί όπως HPV 16, 18, 31, 33, 45 που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου στο ουροποιητικό σύστημα και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου. Στην δεύτερη ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle Risk) ανήκουν οι ιοί που ανιχνεύονται σε δυσπλασίες όπως HPV 26, 53, 66. Τέλος στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low Risk) ανήκουν ιοί όπως HPV 6, 11, 40 που συνδέονται με την πρόκληση θηλωμάτων.

Οι HPV είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι ιοί και ενοχοποιούνται για την πρόκληση καρκίνου μιας και το DNA τους έχει ανιχνευθεί σε πέραν του 95%, σε δείγματα από καρκινώματα τραχήλου, με κύριους ενόχους τον HPV-16 και 18 που φαίνεται ότι επικρατούν στις τραχηλικές αλλοιώσεις σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Οι συνεχείς μολύνσεις από τα στελέχη high risk του ιού μπορεί να οδηγήσουν σε



ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου (CIN), αιδοίου (VIN), πέους (PIN) και πρωκτού (AIN).

Μιας και δεν έχει βρεθεί ακόμα κάποιος αποτελεσματικός τρόπος καταπολέμησης των HPV η μόνη λύση προς το παρόν είναι η πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση τα οποία επιτυγχάνονται με το PAP test (test Παπανικολάου) το οποίο ανιχνεύει ανωμαλίες στα τραχηλικά κύτταρα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου είναι αισθητά αυξημένος σε γυναίκες άνω των 40 ετών αλλά είναι θεραπεύσιμος αν ανιχνευθεί έγκαιρα. Για αυτούς τους λόγους είναι αναγκαία η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων διάγνωσης, ανίχνευσης και ταυτοποίησης για την καλύτερη κατανόηση για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.

Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως η PCR και κατ' επέκταση η Nested PCR με πολύ μεγάλη ευαισθησία για να γίνει εφικτή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση. Αυτές είναι και οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

Ο κατεξοχήν σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ταυτοποίηση και χρήση αυτών των μεθόδων για την χαρτογράφηση των πολλαπλών ρυθμιστών της μεταγραφής των HPV-16 στην γενωμική περιοχή LCR, από κλινικά δείγματα τα οποία θεωρείται ότι είναι μολυσμένα με HPV. Στην εργασία αυτή εξετάστηκαν κάποια δείγματα από κολπικό υγρό που παραχωρήθηκαν από το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών Άγιος Σάββας για ερευνητικούς σκοπούς τα οποία ήταν ύποπτα για μόλυνση από HPV. Για την επίτευξη του σκοπού της εργασίας χρειάστηκε πρώτα να πραγματοποιηθούν έπειτα από εκχύλιση μια σειρά από PCR αρχικά για την ενίσχυση του ιϊκού DNA και έπειτα Nested-PCR στα προϊόντα αυτά για περαιτέρω ενίσχυση και ανίχνευση. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές LCR-7099, LCR-256, LCR-480 για την ενίσχυση της γενωμικής LCR περιοχής του HPV-16. Έπειτα το ενισχυμένο γενετικό υλικό των δειγμάτων στάλθηκε για αλληλούχιση (sequencing) και στην συνέχεια χαρτογραφήθηκαν οι ρυθμιστές μεταγραφής.

Η νουκλεοτιδική και φυλογενετική αυτή μελέτη της LCR είναι πολύ σημαντική γιατί θα οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού μεταγραφής που διέπει τους HPV και κατ' επέκταση του κύκλου ζωής τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με τον άνθρωπο με αποτέλεσμα την καλύτερη αντιμετώπιση τους με την ανάπτυξη κατάλληλων φαρμάκων που να στοχεύουν συγκεκριμένες διεργασίες ή αλληλουχίες του ιού.

# 1. Ιστορικά

Η έρευνα γύρω από τους HPV (Human Papilloma Virus) διεξάγεται εδώ και πολλά χρόνια και έχει περάσει διάφορες φάσεις εξέλιξης. Ξεκίνησε αργά με την μελέτη της μετάδοσης θηλωμάτων των ζώων και του ανθρώπου στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Το ενδιαφέρον για τους ιούς αυτούς αυξήθηκε κατά το 1930 με την ανακάλυψη ότι εκχυλίσματα από θηλώματα του δέρματος κουνελιών είχαν την δυνατότητα να προκαλέσουν βλάβες με δυνατότητα κακοήθειας (Douglas R. Lowy). Πολλές από τις πρώτες παρατηρήσεις που έγιναν κατά την περίοδο 1930-1940 παρόλο που περιορίζονταν σε *in vivo* πειράματα, βοήθησαν να κατανοηθεί αρκετά η βιολογία των papilloma.

Οι ιοί αυτοί φάνηκε ότι ήταν οι δεύτεροι σε σειρά μετά τους ρετροϊούς που μπορούσαν να προκαλέσουν κακοήθεις όγκους έτσι έγιναν ένα σημαντικό πειραματικό μοντέλο στην ιϊκή ογκογένεση (Shor, 1933). Εκχυλίσματα όχι μόνο προκαλούσαν θηλώματα σε κουνέλια αλλά μερικές βλάβες εξελίσσονταν σε καρκίνο επιθηλιακών κυττάρων που ήταν η πρώτη απόδειξη ότι ένας ιός θηλαστικών είχε την δυνατότητα να προκαλέσει κακοήθεις όγκους (Rous and Beard 1935, Syverton 1952, Syverton and Berry 1935). Επίσης βρέθηκε ότι μερικά θηλώματα υποχωρούσαν ενώ άλλα ήταν πιο επίμονα χωρίς όμως να εξελίσσονται. Επίσης στις αρχικές αυτές έρευνες φάνηκε η άκρως επιλεκτικότητα των HPV ως προς τους ξενιστές τους. Το ενδιαφέρον για τους ιούς αυτούς χάθηκε κατά την περίοδο μεταξύ 1950 και 1960 κυρίως λόγω του ότι οι ιοί papilloma δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες ενώ την ίδια περίοδο αρκετοί άλλοι ογκογόνοι ιοί βρίσκονταν ήδη σε *in vitro* πειράματα (Douglas R. Lowy).

Οι papilloma δεν ανιχνεύονταν εύκολα σε καλλιέργειες ιστών και ούτε θεωρούνταν παράγοντες σημαντικών ασθενειών του ανθρώπου. Κατά αυτή την περίοδο οι papilloma ιοί κατατάχτηκαν στην ίδια οικογένεια με τους polyoma και του SV40 (στη papovaviridae) μιας και το καψίδιο καθώς και το γονιδίωμα του ιού papilloma έμοιαζαν παρόλο που ήταν μεγαλύτερο από αυτό του SV40 και polyoma (Crowford 1969, Stone et al. 1959, Williams et al. 1961).

Με την εξέλιξη της κλωνοποίησης και σχετικών τεχνικών που αναπτύχθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970 βοήθησαν να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που μέχρι τότε εμπόδιζαν την σωστή έρευνα των ιών papilloma, αναζωογονώντας το

ενδιαφέρον για αυτούς τους ιούς και την απόκτηση νέων πληροφοριών για αυτούς (Douglas R. Lowy).

Η δυνατότητα μετάλλαξης και κλωνοποίησης του ιϊκού γονιδιώματος του BPV1 βοήθησε στην μελέτη του γενώματος του ιού αυτού και το κατέστησε ως ένα πολύ σημαντικό πειραματικό μοντέλο προσελκύνοντας πολλούς μοριακούς βιολόγους που τελικά κατέληξε στην πλήρη αλληλούχιση του γονιδιώματος του πρώτου papilloma ιού, του BPV1 (Chen et al. 1982). Η αλληλούχιση του γενώματος του HPV1 (Danos et al. 1982, 1983) και του HPV6 (Schwartz et al 1983) ακολούθησαν λίγο μετά.

Σε αντίθεση με προηγούμενες πεποιθήσεις, η οργάνωση του γονιδιώματος του papilloma βρέθηκε ότι διέφερε από αυτό του SV40 και polyoma και δεν υπήρχαν σχεδόν καθόλου ομόλογες αλληλουχίες μεταξύ του papilloma και του polyoma ιού. Λόγω αυτών των διαφορών οι papilloma τελικά κατατάχθηκαν σε ξεχωριστή οικογένεια ιών (Douglas R. Lowy). Έπειτα από αυτές τις εξελίξεις έγιναν μελέτες σε διάφορους HPV που προσβάλλουν βλεννογόνους ιστούς και το ουρογεννητικό σύστημα, κυρίως από τον Zur Hausen και τους συνεργάτες του. Από αυτές τις μελέτες παρατηρήθηκε ότι η ιστολογική εμφάνιση της δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας (ενός σταδίου πριν τον καρκίνο τραχήλου) έμοιαζε με ιϊκά θηλώματα. Αυτή η παρατήρηση καθώς και άλλα αποτελέσματα οδήγησαν στην εισήγηση ότι η μόλυνση από HPV πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου (Meisels and Morin 1981, Zur Hausen et al. 1981). Αυτή η συσχέτιση έγινε εμφανείς με την κλωνοποίηση και ταυτοποίηση του HPV16 (Dust et al. 1983) και του HPV 18 (Boshart et al. 1984) όπου έγινε αντιληπτό ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου ανιχνεύεται DNA από HPV 16 ή και HPV 18. Παρόλο που η μόλυνση από HPV δεν αρκεί από μόνη της να προκαλέσει καρκίνο του τραχήλου είναι σίγουρα ένας κυρίαρχος παράγοντας (Schiffman 1992) και όπως έχουν αποδείξει επιπλέον μελέτες, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου προϋποθέτει μόλυνση από HPV υψηλού κινδύνου (Walboomers et al.1999). Επίσης πολύ συχνά σ' αυτές τις περιπτώσεις το ιϊκό DNA ήταν ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του ξενιστή ενώ σε καλοήθους βλάβες βρισκόταν συνήθως σε επισωματική μορφή (Schwarz et al. 1985). Έτσι μέχρι τις αρχές του 1990 οι HPV ενοχοποιήθηκαν ως αιτιολογικοί παράγοντες για καρκίνο του τραχήλου.

## 2. Βιολογία των papilloma

### 2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι ιοί papilloma είναι οι ιοί των θηλωμάτων. Το όνομα τους προέρχεται από την λατινική λέξη Papilla δηλαδή θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma (όγκος). Οι ιοί αυτοί συγκροτούν μια πολύ ετερογενή ομάδα ιών, την papillomaviridae όπου ανήκει και ο HPV (human papilloma virus). Αυτή η οικογένεια αποτελείται από μικρούς ιούς (52-55nm) χωρίς εξωτερικό περίβλημα με δίκλωνο DNA μεγέθους περίπου 7900bp που κωδικοποιεί οκτώ ιικές πρωτεΐνες και μολύνουν το επιθήλιο του δέρματος αρκετών σπονδυλωτών με συγκεκριμένο τροπισμό (Zur Hausen H., University of Cambridge). Προκαλούν επιθηλιακά κονδυλώματα, θηλώματα στα γεννητικά όργανα, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία όπως νεοπλασία τραχήλου (CIN), αιδοίου (VIN), πέους (PIN) και πρωκτού (AIN). Αυτές οι προκαρκινικές δυσπλασίες μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο (de Villiers E.M. et al. 2004).

Η ανακάλυψη του papillomavirus ικανού να προκαλέσει θηλώματα έγινε το 1933 από τον Richard Shope και από τότε έχουν ασχοληθεί πολλοί επιστήμονες αποκαλύπτοντας αρκετά στοιχεία για την βιολογία και την δράση αυτών των ιών. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 100 τύποι του HPV και μαζί με αυτούς που μολύνουν ζώα χωρίζονται σε 18 γένη βάση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της πρωτεΐνης L1 (de Villiers E.M. et al. 2004). Οι HPV μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής και μια ομάδα περίπου 35-40 τύποι μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής και μολύνουν την περιοχή των γεννητικών οργάνων.

Οι HPV έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του τραχήλου σε ποσοστό πάνω από 99%. Παρόλο που μερικοί τύποι δεν προκαλούν κανένα σύμπτωμα ενώ κάποιοι άλλοι φαίνεται να έχουν άμεση συσχέτιση με την πρόκληση καρκίνου (Dell G., and K. Gaston 2001, Flores E. R., and P.F. Lambert 1997, Hebner C. M., and L. A. Laimins 2005). Τέτοιες περιπτώσεις καρκίνου ανιχνεύονται κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο με τον αριθμό των νέων περιστατικών να ξεπερνά τις 450.000 γυναίκες ανά έτος (Parkin D.M. 2000).

Οι HPV διαχωρίζονται σε δερματικούς και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1. Η πρώτη είναι αυτή της υψηλής επικινδυνότητας (High

Risk) στην οποία ανήκουν HPV που συνδέονται με την πρόκληση νεοπλασιών, μια μορφή της οποίας είναι και η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου που μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο. Το DNA των high risk HPV ανιχνεύεται σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου (>99,7%) (Dootbar J. 2006). Οι τύποι HPV 16 και HPV 18 έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται στενά με την πρόκληση καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος, μιας και το DNA τους ανιχνεύεται σε 50% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου πράγμα το οποίο υποστηρίζει την άποψη ότι μέλη αυτής της ομάδας είναι παράγοντες κλειδιά για την πρόκληση καρκίνου του ουρογεννητικού (Durst M. Gissman 1983, Boshart M. Et al. 1984, Zur Hausen H. 1977). Η δεύτερη ομάδα είναι αυτή της ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle Risk) τα μέλη της οποίας βρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος η Τρίτη ομάδα είναι αυτή της χαμηλής επικινδυνότητας (Low Risk) στην οποία οι ιοί που την αποτελούν βρίσκονται κυρίως σε κονδυλώματα και δεν φαίνεται να έχουν κάποια σχέση στην ανάπτυξη καρκίνου. Αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι γυναίκες με HR-HPV τύπους διατρέχουν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου απ'ότι γυναίκες με LR-HPV τύπους (Laura Sichero et al. 2007). Κάθε χρόνο διαγνώζονται πέραν των 450,000 νέων περιστατικών καρκίνου του τραχήλου, κάνοντας αυτό το είδος καρκίνου το τρίτο πιο συχνά εμφανιζόμενο στις γυναίκες (Zur Hausen H. 2002).

**Πίνακας 1.1: Ομάδες επικινδυνότητας των HPV που προσβάλλουν το βλεννογόνο επιθήλιο.**

| <b>Ομάδα επικινδυνότητας</b>             | <b>Τύπος HPV</b>  |
|--|---|
| <b>Υψηλού κινδύνου (High risk)</b>       | <b>HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68</b> |
| <b>Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle risk)</b> | <b>HPV-26, 53, 66</b>   |
| <b>Χαμηλού κινδύνου (Low risk)</b>       | <b>HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 81</b>      |

## 2.2 Ταξινόμηση

Οι ιοί papilloma όπως έχει ήδη αναφερθεί βάση παρατηρήσεων στα μέσα του 70 άνηκαν αρχικά στην οικογένεια των papovaviridae μαζί με τον SV40 μιας και το καψίδιο και γένωμα θεωρείτο ότι έμοιαζαν δομικά (Crowford 1969, Stone et al. 1959, Williams et al. 1961). Χάριν της μοριακής βιολογίας τα τελευταία 25 χρόνια που



οδήγησε και στην επίτευξη της μοριακής κλωνοποίησης και βελτίωση των μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης DNA ιών βρέθηκε ότι το γένωμα των HPV διέφερε από αυτό του SV40 όσο αφορά το μέγεθος που είναι 8kb σε αντίθεση με 5kb και διαφορετική οργάνωση γενώματος του SV40 (Dertant and Self 1984). Έτσι διαχωρίστηκε ως μια ξεχωριστή οικογένεια, αυτή των papillomaviridae και αυτός ο διαχωρισμός επισημοποιήθηκε πρόσφατα με την αναγνώριση από το International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (de Villiers et al. 2004). Μέσα σ'αυτή την οικογένεια κάθε φυλογενετικό κλαδί από στενά συγγενικά papilloma virus αναφέρεται ως γένος (genus) ενώ στενά συγγενικά HPV θεωρούνται είδη (species). Τέλος οι papilloma ιοί κατατάσσονται ως διαφορετικοί τύποι (types) όταν η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει από άλλα κατά τουλάχιστο 10%. Ο όρος υπότυπος (subtype) αναφέρεται σε απομονωθέντα στελέχη (isolates) papilloma που διαφέρουν από 2 έως 10% από την αλληλουχία οποιουδήποτε άλλου τύπου. Είναι αξιοσημείωτο ότι πολύ λίγοι ιοί papilloma μπορούν να καταταχθούν σε αυτή την κατηγορία και επίσης ποτέ δεν έχει βρεθεί γονιδίωμα που να είναι ενδιάμεσο δύο τύπων PV. Αυτή η απουσία υπότυπων στους papilloma ιούς δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή αλλά μάλλον αφορά την εξέλιξη τους. Αντιθέτως, ανάλυση γονιδιωμάτων HPV έδειξε ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός παραλλαγών (variants). Variant θεωρούνται οι HPV με γονιδίωμα που διαφέρει ελάχιστα από το πρότυπο με νουκλεοτιδική διαφορά μικρότερη του 2%.

Μερικά variants HPV τύπων πιθανό να εξελίχθηκαν σε ανθρώπινους πληθυσμούς συγκεκριμένων γεωγραφικών περιοχών μιας και κάποια variants αρκετών HPV τύπων βρίσκονται σε αφθονία σε κάποιες εθνικές ομάδες ενώ δεν υπάρχουν άλλου (Ho et al. 1993, Ong et al. 1993, Stewart et al. 1996). Σε κάποιες περιπτώσεις variants από HPV τύπους εξαπλώνονται όπως και τα κληρονομούμενα χρωμοσωμικά γονίδια και έτσι οι ιοί ενός πληθυσμού αντιπροσωπεύουν την σύνθεση του από διάφορες εθνικότητες.

Τα γενώματα των papilloma φαίνεται να εξελίσσονται πολύ αργά και το φυλογενετικό δέντρο όλων των γνωστών ζωικών και ανθρώπινων ιών papilloma φαίνεται να αντιπροσωπεύει μια εξελικτική ιστορία τόσο αρχαία όσο και των φορέων τους, πέραν των 100 εκατομμυρίων ετών όσον αφορά τους ιούς των σπονδυλωτών (Bernard H-U).

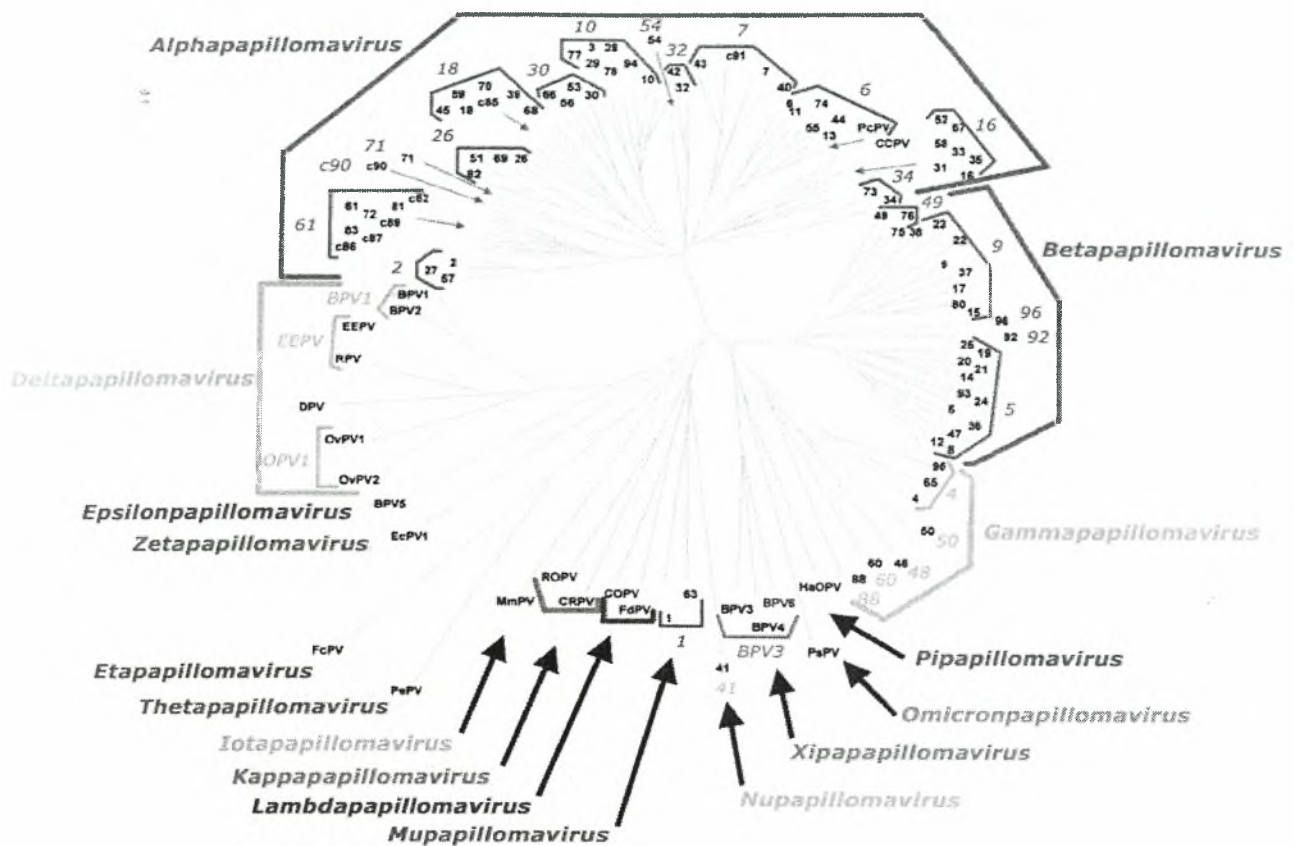
Υπάρχουν σήμερα επισήμως πέραν των 118 τύποι papilloma ιών που μολύνουν τα ζώα και τον άνθρωπο και πιστεύεται ότι με περαιτέρω μελέτες αυτός ο

αριθμός θα αυξηθεί δραματικά. Έτσι κρίθηκε απαραίτητο να καθιερωθεί ένα είδος ταξινόμησης για να ταξινομηθούν οι papilloma και οι νέοι ιοί που πιθανό να προκύψουν. Έτσι από την δεκαετία του 1990 έχουν γίνει προσπάθειες ταξινόμησης των papilloma ιών (PV) με την βοήθεια αλγορίθμων που συγκρίνουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Από την σύγκριση ολόκληρων γενωμάτων, γονιδίων ή τμημάτων των PV, έγινε φανερό ότι προκύπτουν πολύ όμοια φυλογενετικά δέντρα (Chan et al. 1992, 1995, Van Ranst et al. 1992, Farmer et al. 1995, Matsukura and Sugase 2001, de Villiers 2004) και από αυτό θα μπορούσε να συμπεράνει κανείς ότι το γονιδίωμα των PV δεν ανασυνδυάζεται συχνά. Ένα τέτοιο φυλογενετικό δέντρο με τους 118 papilloma ιών φαίνεται στην εικόνα 2.1.

Αρχικά για να περιγραφούν αυτές οι ομαδοποιήσεις των δέντρων χρησιμοποιούνταν διάφοροι όροι όπως μείζονες (Major) και ελάσσονες (Minor) διακλαδώσεις (Chan et al. 1995, Farmer et al. 1995). Αυτού του είδους φυλογενετικά δέντρα θεωρήθηκαν ασαφή μιας και οδηγούσαν σε ταξινομικούς συσχετισμούς που δεν ομαδοποιούσαν papilloma τύπους με παρόμοιες βιολογικές και παθολογικές ιδιότητες. Έτσι για να διορθωθεί αυτό το ICTV σε συνεργασία με μια ομάδα ειδικών επιστημόνων, συμφώνησαν να χρησιμοποιείται η λέξη "γένος" για την περιγραφή papilloma με υψηλή συγγένεια καθώς και ελληνικά γράμματα για την ονομασία αυτών των γενών. Έτσι πρόσφατα εκδόθηκε λίστα με όλους τους τύπους των ιών papilloma ταξινομημένοι με αυτό τον τρόπο (de Villiers et al. 2004). Βάση αυτής της ταξινόμησης οι PV κατηγοριοποιούνται σε γένη όπως Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gamma-papillomavirus, Delta-papillomavirus κ.α. όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1.

Τα δυο κύρια γένη HPV είναι τα Alpha και Beta papillomavirus στα οποία ανήκουν περίπου το 90% των μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένων HPV.





Εικόνα 2.1: Φυλογενετικό δέντρο με τους 118 papilloma ιούς όπου φαίνεται και η ταξινόμηση τους.

### 2.2.1 Alpha-papillomavirus

Οι Alpha-papillomavirus αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα HPV's και είναι η ομάδα που περιλαμβάνει τους HPV's που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Περιλαμβάνει επίσης και papilloma που προκαλούν μόνο θηλώματα και πολύ σπάνια φαίνεται να εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 30 τύποι προσβάλλουν το επιθήλιο του τραχήλου και ένα μέρος αυτών συσχετίζεται με αλλοιώσεις που εξελίσσονται σε καρκίνο. Τέτοιοι τύποι βέβαια είναι αυτοί που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου και ανήκουν στην πρώτη ομάδα των Alpha-papillomavirus με τον HPV 16 να αποτελεί το πιο συχνό HPV υψηλού κινδύνου στον γενικό πληθυσμό και αιτία του 50% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου. Η συχνότητα εμφάνισης σε καρκίνο του τραχήλου από ιούς που ανήκουν στην ομάδα Alpha-papillomavirus φαίνεται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Συχνότητα εμφάνισης ιών Alpha-papillomavirus σε καρκίνο του τραχήλου.

| Γένος    | Τύπος  | Συχνότητα εμφάνισης | Κατηγορία        |
|----------|--------|---------------------|------------------|
| Alpha 7  | HPV 18 | 11.27 %             | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 45 | 5.21 %              | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 59 | 1.05 %              | Υψηλού κινδύνου  |
| Alpha 9  | HPV 16 | 54.38 %             | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 31 | 3.82 %              | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 33 | 2.06 %              | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 35 | 1.27 %              | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 52 | 2.25 %              | Υψηλού κινδύνου  |
|          | HPV 58 | 1.72 %              | Υψηλού κινδύνου  |
| Alpha 10 | HPV 6  | 0.07 %              | Χαμηλού κινδύνου |
|          | HPV11  | 0.07 %              | Χαμηλού κινδύνου |
|          | HPV 55 | 0.04 %              | Χαμηλού κινδύνου |

### 2.2.2 Beta-papillomavirus

Οι Beta-papillomavirus συνήθως συσχετίζονται με κλινικά ασυμπτωματικές μολύνσεις στους ανθρώπους αλλά σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ατόμων η ανθρώπων μου πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια κονδυλωματώδης επιδερμιδοδυσπλασία (epidermodysplasia verruciformis, EV) αυτοί οι ιοί μπορεί να εξαπλωθούν ανεξέλεγκτα και να προκαλέσουν μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Doorbar J. 2006).

### 2.2.3 Gamma, Mu και Nu-papillomavirus

Τα στελέχη των HPV που ανήκουν σε αυτές τις ομάδες προκαλούν δερματικά θηλώματα τα οποία δεν εξελίσσονται σε καρκίνο (Doorbar J. 2006).

### 3.Εξέλιξη

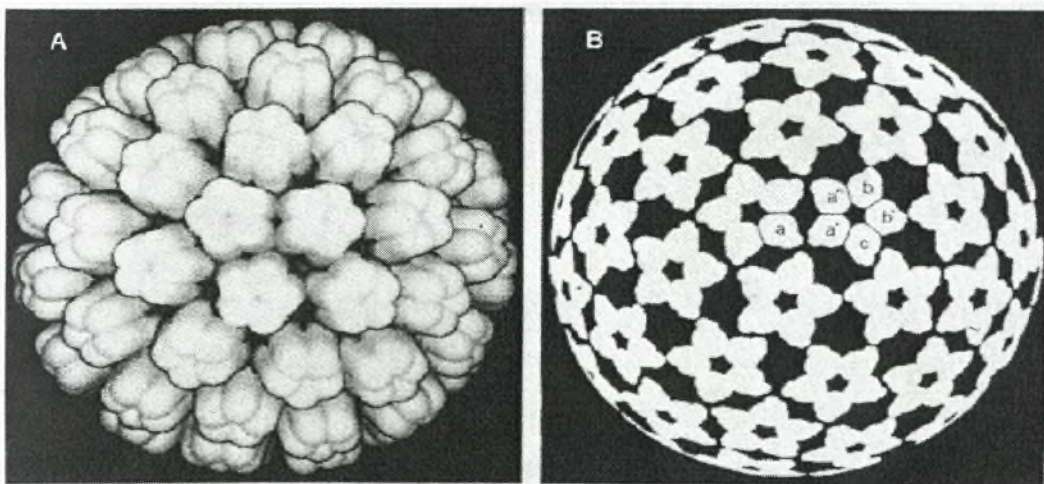
Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που δείχνουν ότι οι PV φαίνεται να εξελίχθηκαν στενά με τους φορείς τους. Για παράδειγμα PV που απομονώθηκαν από συγγενικά είδη φορείς, όπως είναι ο άνθρωπος και ο πίθηκος, είναι και αυτά με την σειρά τους συγγενικά (de Villiers et al. 2004). Στο φυλογενετικό δέντρο των PV φαίνεται ότι ξενιστές γενετικά απομακρυσμένοι από τους ανθρώπους μολύνονται με τύπους PV επίσης γενετικά απομακρυσμένοι από τους HPV's. Έτσι φαίνεται ότι η εξέλιξη των PVs σε ομάδες ταξινόμησης ξεκίνησε με διαχωρισμό των ξενιστών τους. Βέβαια οι διαδικασίες που έλαβαν μέρος για να δώσουν ένα τόσο μεγάλο αριθμό PVs δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, αλλά η γενετική παρέκκλιση (genetic drift) και το φαινόμενο του στενωπού (bottleneck effect) φαίνεται να είναι πιθανά σενάρια για αυτή την ετερογένεια. Αλλαγές στο γονιδίωμα των PVs συμβαίνουν με πάρα πολύ αργό ρυθμό. Έτσι έχει υπολογιστεί ότι αλλαγές στο γονιδίωμα τους συμβαίνουν περίπου όπως και στους ξενιστές τους, δηλαδή 1% νουκλεοτιδική αλλαγή ανά 100.000 με 1.000.000 χρόνια. Μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί PVs σε κατώτερα σπονδυλωτά ή σε ασπόνδυλα, έτσι η προέλευση των papillomaviridae παραμένει άγνωστη (Bernard H-U).

Η μόλυνση με PV είναι φανερό πως παίζει σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση θηλώματος και κυρίως για την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου αλλά παρόλα αυτά δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως παράγοντες που προκαλούν νεοπλασίες γιατί ένας μεγάλος αριθμός HPV βρίσκονται και σε άτομα χωρίς κανένα κλινικό σύμπτωμα (Antonsson et al. 2000, 2003, Antonsson and Hansson 2002). Ακόμα και οι υψηλού κινδύνου HPV όπως ο HPV 16 συνήθως προκαλούν νεοπλασίες μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς όπως στον τράχηλο της μήτρας, ενώ δεν προκαλούν προβλήματα αλλού. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην άποψη ότι οι PVs εξελίχθηκαν προς ένα κύκλο ζωής ο οποίος δεν οδηγεί πάντα σε νεοπλασίες αλλά σε ένα είδος “επισωμικού” κύκλου ζωής.

## 4. Δομή του HPV

### 4.1 Καψίδιο

Οι papilloma ιοί είναι μικροί σφαιρικοί DNA ιοί με 55-60nm διάμετρο, χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Το καψίδιο τους αποτελείται από 72 πενταμερή της κύριας ιϊκής καψιδιακής πρωτεΐνης L1 διατεταγμένα με  $T=7$  (όπου το T είναι ο αριθμός που εξηγεί την εικοσαεδρική συμμετρία των καψιδίων και προϋποθέτει ότι για να ισχύει αυτή η συμμετρία πρέπει να υπάρχουν  $60 \times T$  καψιδιακές υπομονάδες) σχηματίζοντας έτσι καψίδια εικοσαεδρικής γεωμετρίας όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1 (Garcea L.R. and Xiaojiang Chen 2007). Αυτή η εικοσαεδρική γεωμετρία προσφέρει ένα σχεδόν σφαιρικό καψίδιο το οποίο αξιοποιεί στο μέγιστο την σχέση (λόγο) εμβαδού και όγκου. Βέβαια αυτή η δομή των 72 πενταμερών (καψομερή) με 360 ( $72 \times 5$ ) μονομερή παραβιάζε τους κανόνες Caspar-Klug που προέβλεπαν  $60 \times T$  μονομερή για την επίτευξη εικοσαεδρικής γεωμετρίας (Caspar and Klug 1962). Για να ισχύει αυτή η γεωμετρία των 72 πενταμερών βρέθηκε ότι μερικά πενταμερή γειτονεύουν με πέντε πενταμερή ενώ μερικά με έξι (Baker et al. 1989, 1991, Belnap et al. 1996, Liddington et al. 1991). Αυτή η δυνατότητα των πενταμερών να διατάσσονται σε δυο διαφορετικές διατάξεις (προσανατολισμούς) ώστε να γειτονεύουν πότε με πέντε και πότε με έξι πενταμερή οφείλεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης L1. Εσωτερικά της L1 πρωτεΐνης βρίσκεται η L2 πρωτεΐνη και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις σχηματίζουν το καψίδιο μέσα στο οποίο περικλείεται το ιϊκό γένωμα.

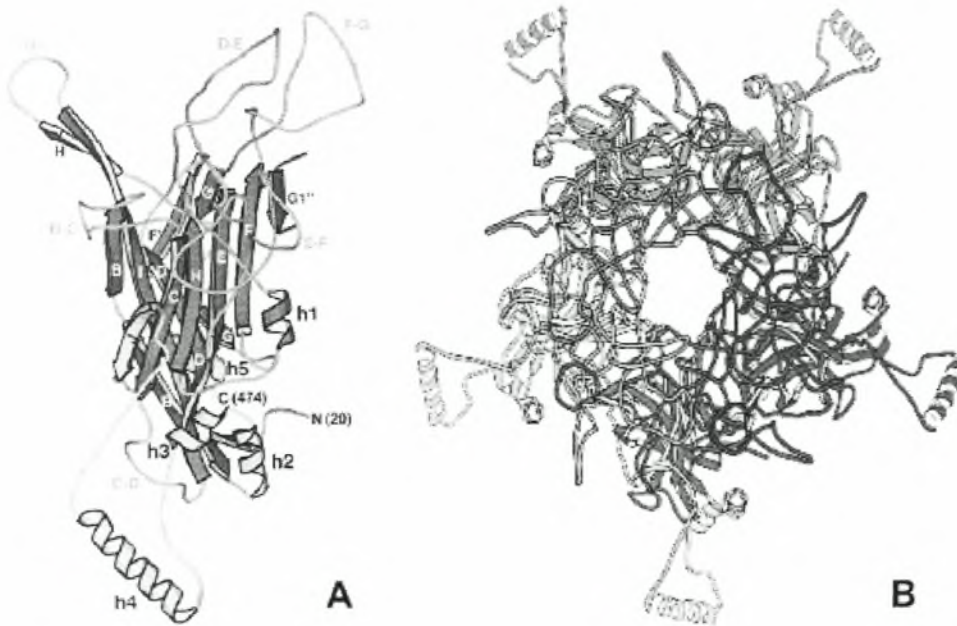


Εικόνα 4.1: Εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου του HPV 16.



### 4.1.1 Πρωτεΐνη L1

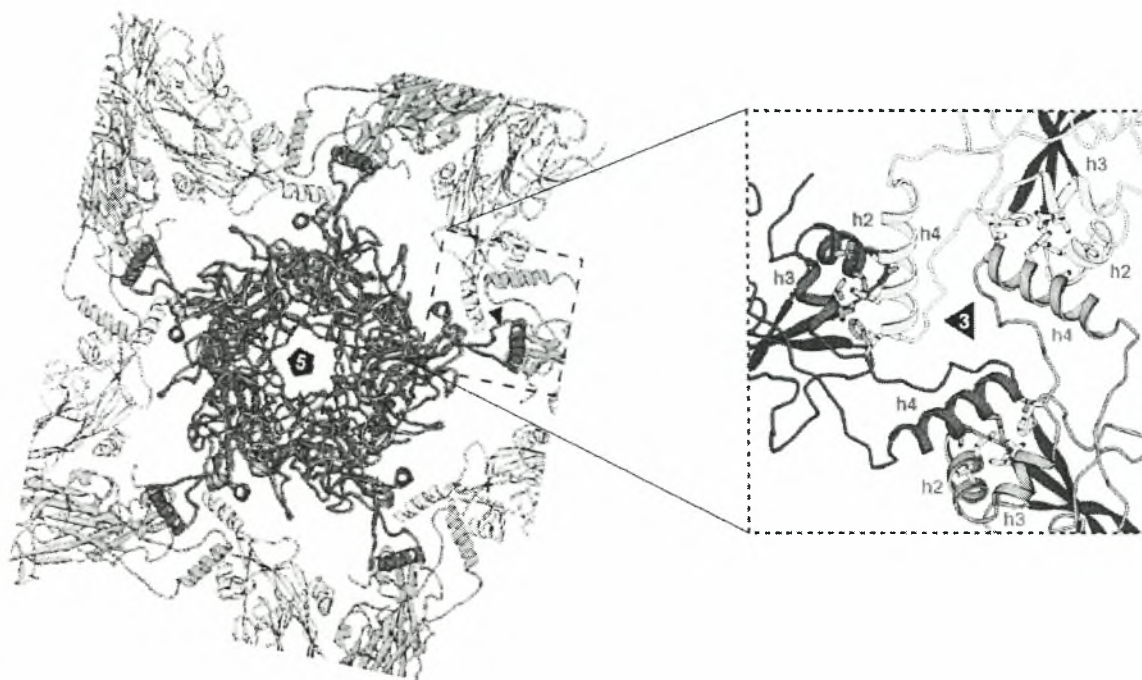
Αρχικές προσπάθειες για απομόνωση της L1 αποδεικνύονταν ανεπαρκείς μέχρι που χρησιμοποιήθηκε ένας πιο αποτελεσματικός τρόπος με την έκφραση του γονιδίου L1 του HPV σε κύτταρα *E. Coli*. Εφόσον συγκεντρώθηκε αρκετή πρωτεΐνη, κρυσταλλοποιήθηκαν τα πενταμερή της L1 και ακολούθησε η ανάλυση της δομής της (Chen et al. 2000). Η πρωτεΐνη L1 των HPV αποτελείται από 504 αμινοξέα, από τα οποία τα περισσότερα αποτελούν τον πυρήνα του L1 μονομερούς, που φαίνεται να έχει διαμόρφωση οκτώ-φύλλα αντιπαράλληλων β-βαρελιών σε δύο διακριτά φύλλα, το CHEF και BIDG (Liddington et al. 1991, Stehle et al. 1996). Από το κεντρικό τμήμα του μονομερούς προεξέχουν τρεις θηλιές (HI, DE και FG) που εκτείνονται στο εσωτερικό του πενταμερούς όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2. Τα τελευταία 30 αμινοξέα του C-τελικού άκρου πιθανό να εκτείνονται στο εσωτερικό του πενταμερούς όπου αλληλεπιδρούν με το ιϊκό DNA. Απαλοιφή αυτών των αμινοξέων του c-τελικού άκρου μέχρι και 30 κατάλοιπων δεν φαίνεται να εμποδίζει τον σχηματισμό του πενταμερούς (Chen et al. 2001, Muller et al. 1997, Painsil et al. 1996).



Εικόνα 4.2: (A) L1 μονομερές. (B) L1 πενταμερές.

Τα πενταμερή της L1 του HPV 16 διαμόρφωση T1( δηλαδή κάθε πενταμερές γειτνιάζει με άλλα πέντε πενταμερή) συνδέονται μεταξύ τους με ισχυρούς

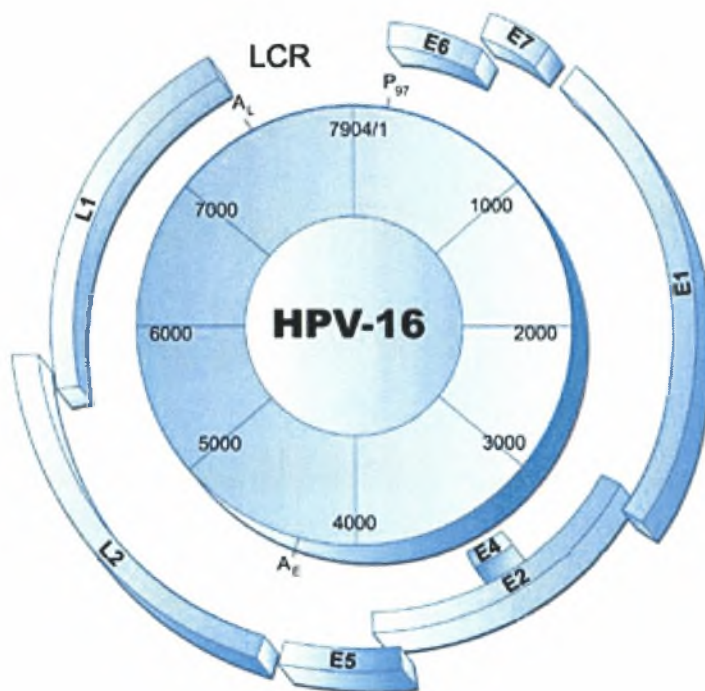
υδροφοβικούς δεσμούς, μεταξύ της έλικας 4 (h4) από το κάθε πενταμερές με τις έλικες 2 (h2) και 3 (h3) γειτονικών πενταμερών όπως φαίνεται στην εικόνα 4.3 (Modis et al. 2002).



Εικόνα 4.3: Οι αλληλεπιδράσεις ενός πενταμερούς της L1 πρωτεΐνης με γειτονικά πενταμερή.

#### 4.2 Γονιδίωμα του HPV

Όλοι οι PV μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά και παρόλο που το ιϊκό γονιδίωμα μπορεί να διαφέρει ελάχιστα σε μέγεθος μεταξύ των διάφορων HPV αποτελείται από περίπου 8000bp (7904για το HPV 16) (Doorbar J. 2006). Οι PV είναι ιοί με δίκλωνο κυκλικό DNA που βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια μορφή που μοιάζει με χρωματίνη, μέσα σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο το οποίο μπορεί να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές με συνολικά οκτώ ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) (Microbiologybytes 2008). Στην πρώιμη περιοχή (Early region) η οποία κωδικοποιεί τα έξι μη δομικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6 και E7. Στην όψιμη περιοχή (Late region) η οποία κωδικοποιεί για δύο δομικές πρωτεΐνες, την L1 και L2 οι οποίες σχηματίζουν το ιϊκό καψίδιο. Τέλος έχουμε την περιοχή LCR που είναι μια μη κωδική περιοχή και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.4 (emedicine 2008).



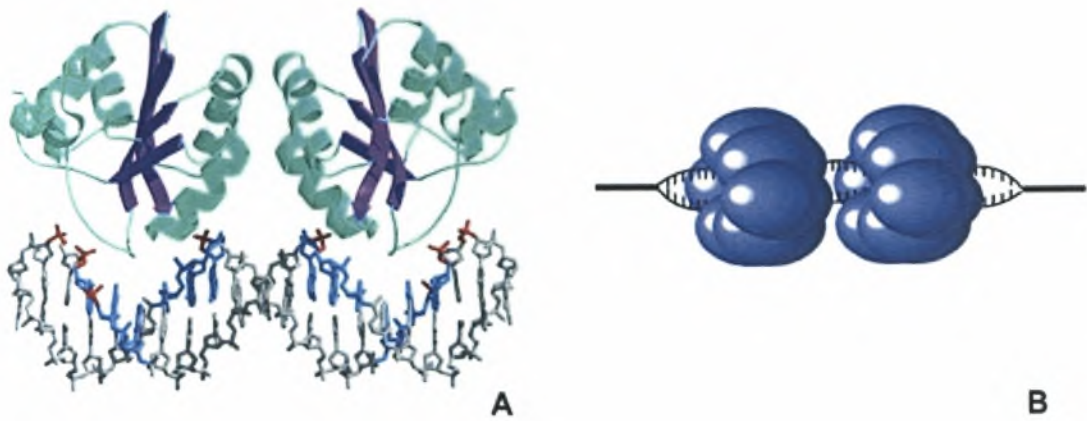
Εικόνα 4.4: Το γένωμα του HPV 16

#### 4.2.1 Πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από το πρώιμο γονίδιο E1 και είναι μια DNA-εξαρτώμενη ATPase καθώς και μια ATP-εξαρτώμενη ελικάση που προσδέεται στο DNA στην αρχή της αντιγραφής (origin of replication) για τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της αντιγραφής οπότε ξετυλίγει το DNA και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης για την αντιγραφή του DNA (Wikipedia 2008, microbiologybytes 2008)

Η E1 αποτελείται από δυο τμήματα, μια σχετικά ανοικτή N-τελική περιοχή (αμινοξέα 1-125) και μια πιο περίπλοκη C-τελική περιοχή (αμινοξέα 170-649) με ένα μικρό κεντρικό τμήμα σύνδεσης των δυο αυτών τμημάτων (αμινοξέα 125-170). Η N-τελική περιοχή χρησιμεύει για την πρόσδεση του DNA ενώ η C-τελική περιοχή των 58kd φαίνεται να έχει ενζυμική δράση (Fiona J.H. and Romanos M.A. 1993). Η E1 μετά την πρόσδεση στο DNA ως διμερές τελικά δημιουργεί ένα εξαμερές σύμπλοκο που ξετυλίγει το DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή της E1 με το DNA φαίνεται στην εικόνα 4.5.

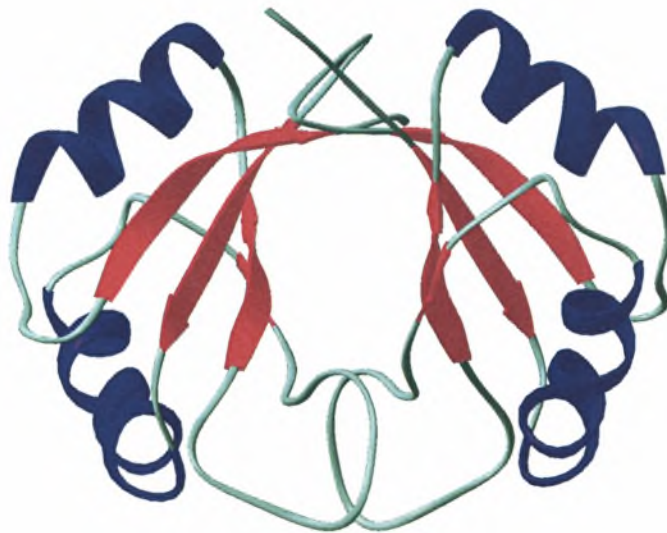




Εικόνα 4.5: Στην εικόνα (Α) φαίνεται η αρχική αλληλεπίδραση της ιικής πρωτεΐνης E1 με το DNA του κυττάρου. Στην εικόνα (Β) φαίνονται τα εξαμερή της E1 πρωτεΐνης να ξετυλίγουν το DNA.

#### 4.2.2 Πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 είναι πολύ σημαντική για την ζωή του ιού μιας και παίζει σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της μόλυνσης και αντιγραφής. Η πρωτεΐνη E2 προσδέεται στο DNA ως διμερές. Κάθε υπομονάδα της αποτελείται από 83 αμινοξέα και η δευτεροταγής δομή του διμερούς αποτελείται από οκτώ b-barrel και δύο ζευγάρια α-έλικας όπως φαίνεται στην εικόνα 4.6.



Εικόνα 4.6: Δομή του διμερούς της E2 Πρωτεΐνης. Φαίνονται τα οκτώ b-barrel (κόκκινο) και οι τέσσερις α έλικες (μπλε).

Η E2 αναγνωρίζει την παλινδρομική αλληλουχία 5'-[AACCGNNGGTT]-3' της LCR (Dell et al. 2003). Ο HPV 16 έχει τέσσερα τέτοια μοτίβα, ένα από τα οποία

βρίσκεται κοντά στην αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής (origin of replication). Η πρόσδεση της E2 στο DNA είναι αναγκαία για την στρατολόγηση της E1 ελικάσης στο σημείο αυτό η οποία με την σειρά της προσδένει πρωτεΐνες αναγκαίες για την αντιγραφή του DNA (Loo et al. 2004, Han et al. 1999). Ακόμα η E2 μπορεί να δράσει ως παράγοντας μεταγραφής ρυθμίζοντας τον πρώιμο προαγωγέα P97 (στον HPV 16) καθώς και την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 δρα σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις καταστέλλει την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών εκτοπίζοντας τον μεταγραφικό παράγοντα SP1(Doorbar J. 2006). Πιστεύεται ότι γενετικές αλλαγές όπως η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή, που έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του E2 γονιδίου, αυξάνεται η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 με επακόλουθο τον μετασχηματισμό των κυττάρων. (Wikipedia 2008).

#### 4.2.3 Πρωτεΐνη E4

Παρόλο που οι πρωτεΐνη E4 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά τα αρχικά στάδια της ιϊκής μόλυνσης, η έκφραση της E4 αυξάνεται δραματικά κατά τα τελικά στάδια της μόλυνσης. Η πρωτεΐνη E4 των περισσότερων τύπων papilloma πιστεύεται ότι διαμεσολαβεί στην έξοδο των ιϊκών καψιδίων στο περιβάλλον των κυττάρων διαταράσσοντας τα ινίδια του κυτταροσκελετού των κερατινοκυττάρων. Επίσης η πρωτεΐνη E4 έχει αποδειχθεί ότι διαταράσσει τα βιοχημικά μονοπάτια της κυτταροδιαίρεσης διατηρώντας τα κύτταρα στην φάση G2 του κύκλου τους (Wikipedia 2008, Microbiologybytes 2008).

#### 4.2.4 Πρωτεΐνη E5

Η E5 είναι μικρή, υδρόφοβος πρωτεΐνη που αποσταθεροποιεί την λειτουργία πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών του προσβεβλημένου κυττάρου (Bravo et al. 2004). Όπως ταιριάζει με το μικρό της μέγεθος, η E5 δεν είναι ένζυμο αλλά φαίνεται να ασκεί τις επιδράσεις της τροποποιώντας αυτές τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του κυττάρου. Η E5 εντοπίζεται κυρίως στις μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου (Congrad et al. 1993). Η πρωτεΐνη E5 μερικών papilloma που προσβάλλουν τα ζώα, λειτουργούν ως ογκογονίδια ενεργοποιώντας το μονοπάτι που προωθεί την κυτταρική διαίρεση μέσω των PDGF (platelet-derived growth factor) υποδοχέων. Οι E5 των ιών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και σχετίζονται με καρκίνο φαίνεται να ενεργοποιούν τον βιοχημικό καταρράκτη που ενεργοποιείται από το EGF

(epidermal growth factor). Επίσης οι E5 των HPV 16 έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την έκφραση πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (major histocompatibility complex, MHC II) το οποίο εμποδίζει τον θάνατο των προσβεβλημένων κυττάρων από τα T λεμφοκύτταρα (Wikipedia 2008).

#### 4.2.5 Πρωτεΐνη E6

Η HPV πρωτεΐνη E6 είναι μια μικρή βασική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 19kd που αποτελείται από περίπου 150 αμινοξέα (158 στο HPV 16) και εντοπίζεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων (P. Tosi et al. 1992). Το γονίδιο E6 κωδικοποιείται από το 5' άκρο του ιϊκού γενώματος και είναι πολύ καλά συντηρημένο μεταξύ όλων των papilloma ιών. Η E6 παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του ιού με το κύτταρο ξενιστή. Είναι αναγκαία για τον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού και έχει ενοχοποιηθεί ότι συμβάλλει στην σταθερή διατήρηση του DNA του ιού σε κερατινοκύτταρα (Park and Androphy 2002, Thomas et al. 1999, Wu et al. 1994). Η κύρια δραστηριότητα των high risk HPV σε καλλιέργειες κυττάρων είναι η δυνατότητά της να προσδίδει αθανασία σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα σε συνεργασία με την E7 (Hawley-Nelson et al. 1989, Hudson et al. 1990, Munger et al 1989a). Επίσης μπορεί να προσδώσει αθανασία σε μερικά είδη επιθηλιακών κυττάρων θηλαστικών (Band et al. 1991). Αυτή η ικανότητα της E6 των high risk επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της και της δυνατότητας της να απενεργοποιεί την λειτουργία της P53. Η E6 πρωτεΐνη περιέχει τέσσερα μοτίβα του Cys-X-X-Cys.

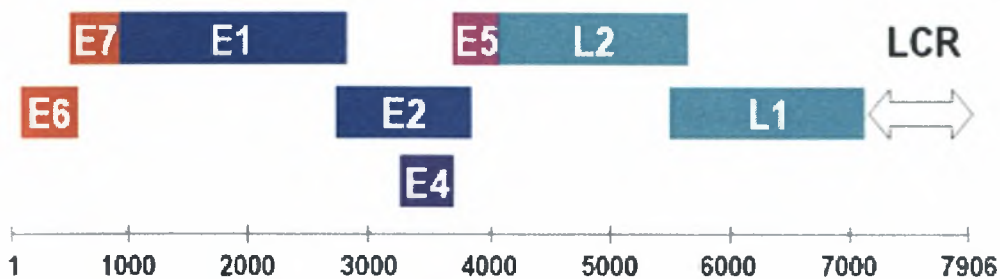
Αυτό το μοτίβο συνήθως συναντάται σε πρωτεΐνες που προσδένονται σε DNA μέσω "δάκτυλων ψευδαργύρου" (zinc fingers) και η E6 όπως και η E7 προσδένουν ψευδάργυρο μέσω αυτών των καταλοίπων κυστεΐνης (Barboa et al. 1989, Grossman and Laimins 1989). Οι E6 των high risk HPV ιών έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με την P53, μια δυνατότητα που δεν συμερίζονται οι E6 των low risk HPV (Werness et al. 1990). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης οι E6 των high risk μπορούν να εμποδίσουν την P53 να ενεργοποιήσει προαγωγείς μέσω της μεταγραφής (Mietz et al 1992).

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E6 των high risk HPV 16 και 18 προωθεί την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης P53 μέσω του μηχανισμού της ουβικτινίωσης (Scheffer et al. 1990), πράγμα το οποίο οδηγεί στην υποψία ότι τα χαμηλά επίπεδα της P53 σε προσβεβλημένα κύτταρα από τους ιούς αυτούς είναι λόγω αυτής της ουβικτινίωσης που προωθείται από την E6 (Scheffer et al.1991). Αρκετές

κυτταρικές πρωτεΐνες που προσδένονται στην E6 των high risk HPV προσδένονται επίσης και στην E6 των low risk, αλλά παρόλα αυτά φαίνεται ότι δεν οδηγούν στην πρωτεόλυση της P53 (Degenhardt and Silverstein 2001b).

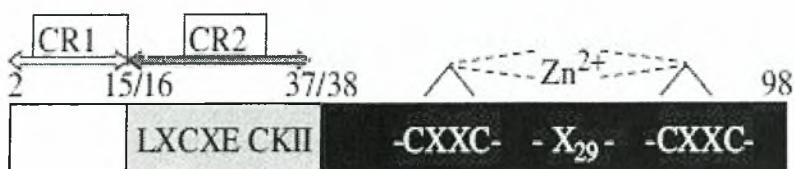
#### 4.2.6 Πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι μια μικρή, αρκετά όξινη πρωτεΐνη περίπου 100 αμινοξέων και κωδικοποιείται από το γονίδιο E7 με ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που βρίσκεται καθοδικά του γονιδίου E6 όπως φαίνεται στην εικόνα 4.7.



**Εικόνα 4.7:** Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται το γονιδίωμα του HPV 16.

Το αμινοτελικό τμήμα της E7 των HPV εμφανίζει ομολογία με τμήμα της συντηρημένης περιοχής (CR1) και ομολογία με όλη την CR2 της πρωτεΐνης E1A του αδενοϊού (Adenovirus, Ad) καθώς και με αλληλουχίες του large tumor antigen (T<sub>ag</sub>) των polyoma ιών και του SV40 (Figge et al. 1988, Phelps et al. 1988, Vousden et al 1988). Το τμήμα των low risk και high risk HPV E7 πρωτεϊνών που παρουσιάζει ομολογία με τη CR1 έχει αποδειχθεί ότι προσδένει το P600 (Huh et al. 2005), μια πρωτεΐνη 5183 αμινοξέων η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης (Nakatani et al. 2005). Η περιοχή που είναι ομόλογη με την CR2 περιλαμβάνει την αλληλουχία με το μοτίβο Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) που προσδένει το pRB (καταστολέα του ρετινοβλαστώματος) (Munger et al. 1989b). Το καρβοξυτελικό τμήμα της E7 περιλαμβάνει μια περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου (zinc binding domain) που περιέχει δύο αλληλουχίες Cys-X-X-Cys (Barbosa et al. 1989, McIntyre et al. 1993). Αυτή η περιοχή που συνήθως αναφέρετε ως “δάκτυλα ψευδαργύρου” (zinc fingers) στην E7, τα δύο μοτίβα έχουν μεταξύ τους μεγαλύτερη απόσταση (29 αμινοξέα) απ’ότι στις συνήθεις πρωτεΐνες δάκτυλων ψευδαργύρου (zinc finger proteins) (Liu et al. 2006) όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8: Σχηματική αναπαράσταση της ογκοπρωτεΐνης E7 όπου φαίνονται τα δυο μοτίβα “δάκτυλα ψευδαργύρου” (zinc fingers).

Παρόλο που η πρωτεΐνη E7 των HPV 16 δεν έχει αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear targeting sequence) μεταφέρεται και εντοπίζεται στον πυρήνα. Η E7 όπως και η E6 δεν χαρακτηρίζεται από καταλυτικές ιδιότητες ενζύμου και δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA. Είναι πλέον αποδεκτό ότι οι βιολογικές ιδιότητες της E7 οφείλονται στην ιδιότητα της να αλληλεπιδρά με συμπλέγματα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου.

Η E7 των HPV 16 είναι η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη μιας και ήταν το πρώτο προϊόν ογκογονιδίου των HR HPV που ανακαλύφθηκε (Kanda et al. 1988, Phelps et al. 1988, Vousden et al. 1988, Yutsudo et al. 1988). Προωθεί τον μετασχηματισμό του κυττάρου απενεργοποιώντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb. Γενικά η E7 αυτών των high risk επιμηκύνει την ζωή των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του ουρογεννητικού και προωθεί την “αθανασία” τους σε συνεργασία με την E6 (Foster and Galloway 1996, Halbert et al. 1991, Hawley-Nelson et al. 1989, Hudson et al. 1990, Munger et al 1989a). Σε αντίθεση, η E7 των low risk HPV έχει πολύ λιγότερη ικανότητα μετασχηματισμού (Halbert et al. 1992).

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι κύριες ιδιότητες των πρωτεϊνών του HPV 16 (Πίνακας 4.1).

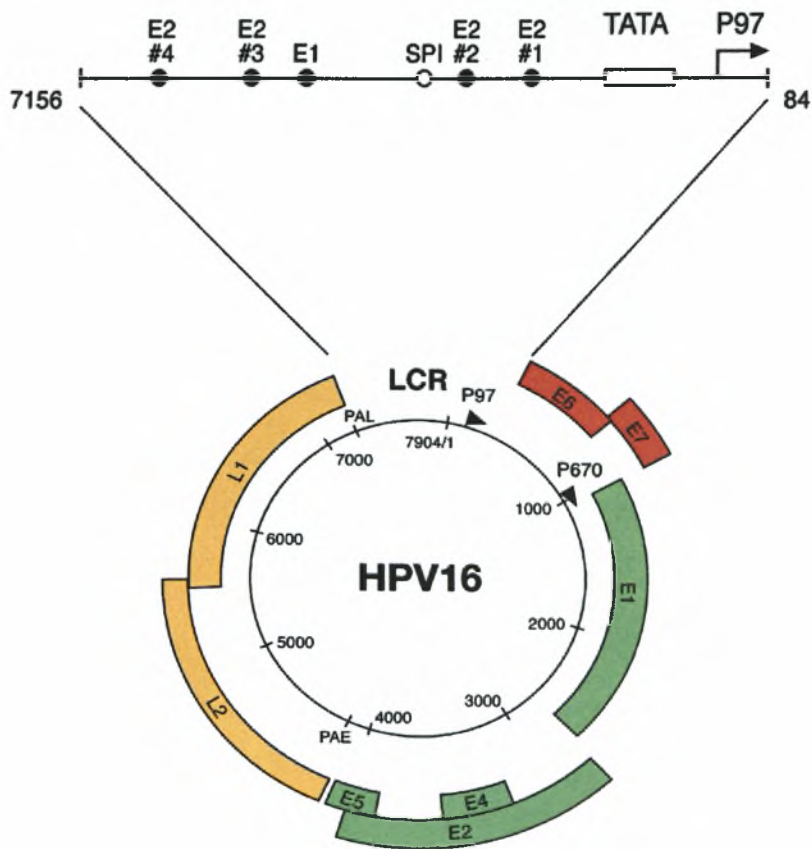


Πίνακας 4.1: Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών του HPV 16.

| Πρωτεΐνη | Λειτουργία   |
|----------|--|
| E1       | DNA-εξαρτώμενη ΑΤΡαση, ΑΤΡ-εξαρτώμενη ελικάση, παράγοντας επιμήκυνσης του ιϊκού γενώματος.   |
| E2       | Αναγνωρίζει και προσδέεται στην αρχή της αντιγραφής (origin of replication). Αναγκαία για την στρατολόγηση της E1. Ρυθμίζει την έκφραση των E6 και E7. |
| E4       | Διαταράσσει τον κυτταροσκελετό επιτρέποντας την έξοδο των ιϊκών σωματίων. Διατηρεί τα κύτταρα στην G2 φάση του κύκλου τους.                            |
| E5       | Διαταράσσει ογκοκατασταλτικά μονοπάτια του κυττάρου.   |
| E6       | Προωθεί τον μετασχηματισμό του κυττάρου απενεργοποιώντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53.  |
| E7       | Προωθεί τον μετασχηματισμό του κυττάρου απενεργοποιώντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb.  |
| L1       | Κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη που σχηματίζει το καψίδιο του ιού.  |
| L2       | Ελάσσων καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς αλληλεπιδρά με το ιϊκό DNA.  |

#### 4.2.7 LCR (Long Control Region)

Το ιϊκό γένωμα περιέχει και μια μη κωδική ρυθμιστική περιοχή μέχρι και περίπου 1000kb η οποία ονομάζεται long control region (LCR). Αυτή η περιοχή περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και την θέση έναρξης της αντιγραφής του ιϊκού DNA. Ρυθμίζει την αντιγραφή και μεταγραφή του ιού και είναι πολύ πιο συντηρημένη σε σχέση με το υπόλοιπο γένωμα (Bornali et al. 2005). Στην LCR δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο κύριο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF). Η LCR ξεκινά από το τέλος του L1 γονιδίου και εκτείνεται μέχρι την αρχή του E6 γονιδίου αποτελώντας το 7-11% του συνολικού γονιδιώματος που στους HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό είναι περίπου 850bp όπως φαίνεται στην εικόνα 4.9 (Mark O'Connor et al. 1995).



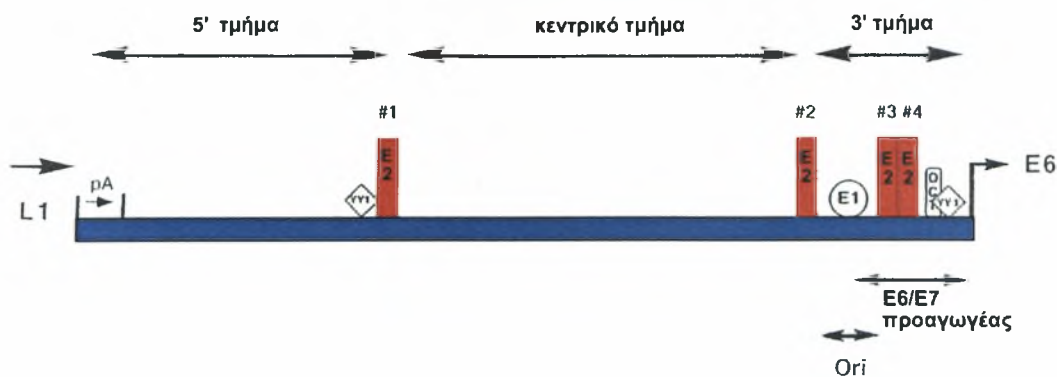
Εικόνα 4.9: Το κυκλικό DNA του HPV 16 όπου φαίνεται σε μεγέθυνση η LCR.

Μέχρι στιγμής στην LCR έχουν βρεθεί τέσσερις αλληλουχίες κοινές σε όλους τους ιούς papilloma και περιλαμβάνουν:

- I) Μια περιοχή πολυαδενυλίωσης (polyadenylation) για όψιμα (late) mRNAs στο 5' άκρο της LCR.
- II) Περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2. Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες περιοχές όσο αφορά τους HPV που προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα , ενώ μέχρι και δέκα όσο αφορά τον BPV 1 (bovine papilloma virus 1).
- III) Μια περιοχή πρόσδεσης της E1 πρωτεΐνης και
- IV) το TATA box του προαγωγέα (promoter) του E6 γονιδίου (Mark O'Connor et al. 1995).

Τα παραπάνω φαίνονται στην εικόνα 4.10.





**Εικόνα 4.10:** Η LCR του HPV 16 όπου φαίνεται η περιοχή πολυαδενυλίωσης (pA), οι θέσεις πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης, η θέση πρόσδεσης της E1 και το TATA Box του προαγωγέα του E6 γονιδίου.

Η ίδια η LCR μπορεί να χωριστεί σε τρία λειτουργικά τμήματα, το 5' τμήμα, το κεντρικό και το 3' τμήμα. Το 5' τμήμα της LCR των HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα έχει μέγεθος περίπου 300bp και οριοθετείται από το κωδικόνιο λήξης της L1 πρωτεΐνης και το πρώτο από τα τέσσερα σημεία πρόσδεσης της E2 όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.10 (Mark O'Connor et al. 1995). Αυτό το 5' τμήμα της LCR έχει υψηλή περιεκτικότητα σε A και T (μέχρι και 85%) (Bornali et al. 2005). Περιέχει παράγοντες τερματισμού της μεταγραφής και περιοχές πολυαδενυλίωσης για τα όψιμα μετάγραφα καθώς και αρνητικούς ρυθμιστικούς παράγοντες για την σταθερότητα των όψιμων mRNAs.

Το κεντρικό τμήμα της LCR των HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα έχει μέγεθος περίπου 400bp και οριοθετείται από τις δύο θέσεις πρόσδεσης της E2, την #1 και #2. Έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί σαν ενισχυτής της μεταγραφής ειδικός για συγκεκριμένα είδη επιθηλίου (epithelial specific transcription enhancer) (Chin M.T. et al 1989, Cid A. et al. 1993, Cripe et al. 1987, Gloss et al 1987). Σ' αυτό το τμήμα της LCR προσδέονται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως NF1, AP1, cEBP, glucocorticoid receptor, progesterone receptor, NF-IL 6, Oct-1, Ref-1, Tef-1, Tef-2, και YY1 (Chan W et al.1989, Chan W et al. 1990, Chin M. et al. 1989, Chong T. et al. 1990, Chong T. et al. 1991, Cuthill S. et al. 1993, Garcia C. et al.1988, Gloss B. et al.1987, Gloss B. et al.1989, Ishiji T. et al. 1992, Kyo S. et al.1993, O'Connor M. et al. 1995, Sibbet G. et al.1990).

Εκτός του ότι προσδίδει ειδικότητα για συγκεκριμένα είδη επιθηλίου, ο ενισχυτής αυτός καθοδηγεί την έκφραση ιϊκών γονιδίων ανταποκρινόμενο στην

βιολογική κατάσταση που βρίσκεται το κερατινοκυττάρο-ξενιστής στα διάφορα επίπεδα του επιθηλίου. Αυτές οι ρυθμίσεις καθοδηγούνται από την πρόσδεση διαφορετικών κάθε φορά μεταγραφικών παραγόντων στα σημεία πρόσδεσης τους μέσα στον ενισχυτή. Αυτό με την σειρά του εξαρτάται από τα διαφορετικά είδη μεταγραφικών παραγόντων καθώς και την παρουσία ή απουσία τέτοιων παραγόντων στο περιβάλλον του ιϊκού DNA που αποτελεί το κύτταρο. Τέλος το 3' άκρο του κεντρικού τμήματος της LCR περιέχει το E2 και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής και ίσως ρυθμίζει την μεταγραφή των E6 και E7 γονιδίων (Chang C.M. et al. 1992, Russel J. and Botchan 1995, Sverdrup F. And Khan S.A. et al. 1995, Romanczuk H. et al.1990).

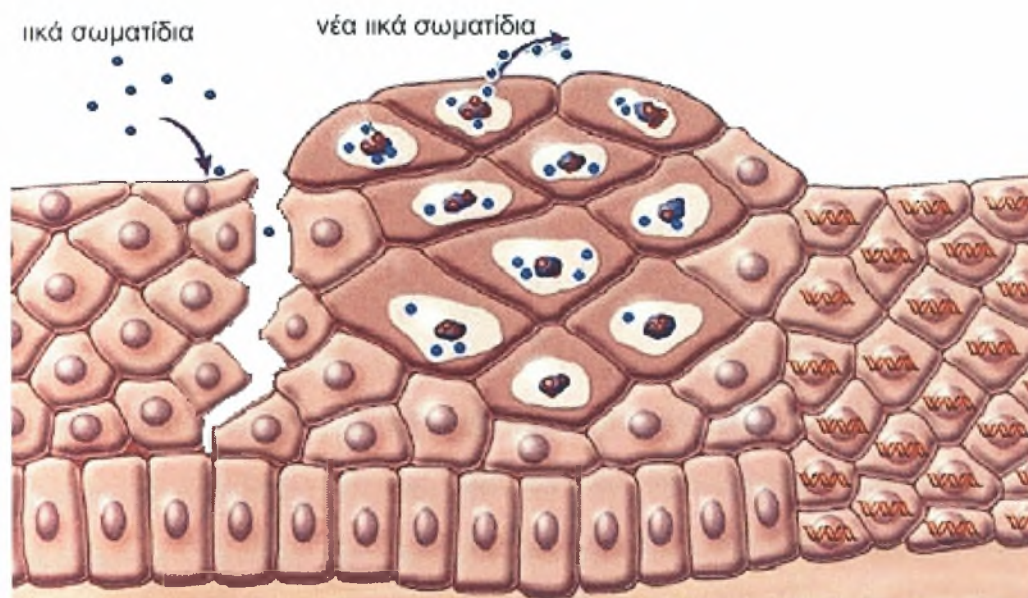
Το 3' τμήμα της LCR των HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα έχει μέγεθος περίπου 140bp και περιέχει το σημείο πρόσδεσης της E1. Περίπου 90bp καθοδικά του E1 είναι το σημείο έναρξης της αντιγραφής και βρίσκεται μόλις 5bp πριν το ATG του E6 γονιδίου. Ένα τμήμα περίπου 45bp μέσα σε αυτά τα 90bp περιλαμβάνει το σημείο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SP1, δύο σημεία πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης καθώς και ένα TATA Box. Αυτές οι τέσσερις αλληλουχίες είναι ένα σύστημα ελέγχου του E6/E7 προαγωγέα.

Το TATA Box χρησιμεύει για την πρόσδεση του TFIID και τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της αντιγραφής και το SP1 για την ρύθμιση της δράσης του ενισχυτή. Τα σημεία πρόσδεσης των E2 αλληλεπικαλύπτονται με το TATABox και με το σημείο πρόσδεσης του SP1 με τέτοιο τρόπο ώστε όταν είναι προσδεμένες οι πρωτεΐνες E2 να εκτοπίζουν το TFIID και το SP1 (Bouvard V. et al. 1994, Demeret C. et al. 1994, Dostatni N. et al. 1991, Gloss B. et al. 1990, Tan S. Et al. 1994).

## 5. Ο κύκλος ζωής των HPV

### 5.1 Είσοδος του ιού

Η προσβολή από ιούς papilloma προϋποθέτει ότι τα ιικά σωματίδια θα βρουν είσοδο προς την βασική στοιβάδα του δέρματος και θα εισβάλουν στα διαιρούμενα κύτταρα της στοιβάδας (Doorbar J. et al. 2006). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω κάποιου μικροτραυματισμού που αφήνει εκτεθειμένα τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας των ιστών στους ιούς (Howley and Lowy 2001) (εικόνα 5.1).

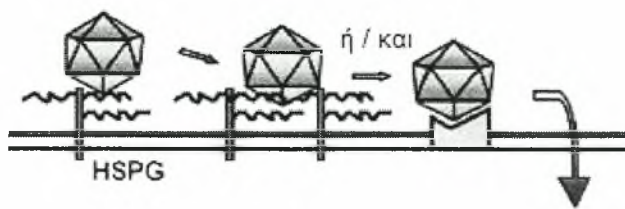


Εικόνα 5.1: Είσοδος του ιού στην βασική στοιβάδα μέσω μικροτραυματισμού του επιθηλίου.

Προς το παρόν υπάρχει κάποια ακόμα ασάφεια ως προς την ακριβή φύση του υποδοχέα για την είσοδο του ιού αλλά πιστεύεται ότι οι πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (heparin sulphate proteoglycans ,HSPGs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρχική πρόσδεση ( Patterson et al. 2005, Doorbar et al. 2006) όπως φαίνεται στην εικόνα 5.2. Οι HSPGs εκφράζονται στην επιφάνεια κυττάρων θηλαστικών καθώς και εξωκυτταρικά, και διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως την πρόσδεση μεταξύ κυττάρων και την εσωτερίκευση προσδετών (Lindahl et al. 1998)

Όπως συναντάται και σε άλλους ιούς, έτσι και οι HPV φαίνεται να χρειάζονται την παρουσία ενός δεύτερου υποδοχέα για αποτελεσματική μόλυνση. Για

αυτό τον ρόλο έχει προταθεί η α6-ιντεγκρίνη (McMillan et al. 1999, Evander M. et al. 1997, Bossis et al. 2005). Στην διαδικασία αυτή της πρόσδεσης των HSPGs φαίνεται να είναι αναγκαία η καρβοξυτελική αλληλουχία της πρωτεΐνης L1 (Joyce et al. 1999). Με πειράματα μετάλλαξης των πρωτεϊνών του καψιδίου του HPV16 έχει αποδειχθεί ότι οι λυσίνες 278, 351 και 361 της L1 είναι αναγκαίες για πρόσδεση στο κύτταρο και την επιτυχή μόλυνση (Knapp et al. 2006).



Εικόνα 5.2: Πρόσδεση του ιϊκού σωματιδίου στις HSPGs στο κύτταρο στόχο.

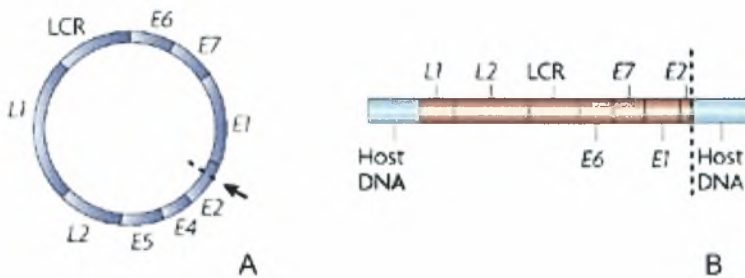
Τέλος έχει αποδειχθεί και η συμμετοχή ορισμένων ειδικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών των κερατινοκυττάρων (keratinocyte specific extracellular matrix, ECM) στις οποίες προσδέονται ορισμένοι τύποι HPV. Μεταξύ αυτών έχει αναγνωριστεί η λαμινίνη-5 (Culp T.D. et al 2006b) με ως ρόλο την μεταφορά των ιϊκών σωματιδίων τα οποία βρίσκονται προσδεμένα με HSPG σε μιτωτικά ενεργά κερατινοκύτταρα.

Τα ιϊκά σωματίδια των papilloma εισέρχονται στο κύτταρο σχετικά αργά μετά την πρόσδεση τους σ'αυτό (Culp T.D. et al. 2004) και για τον HPV16 αυτό επιτυγχάνεται με ενδοκυττάρωση του ιού σε κυστίδια κλαθρίνης (Day P.M. et al. 2003). Αυτός ο τρόπος εισόδου μπορεί να μην συμβαίνει με όλους τους τύπους papilloma. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι ο HPV 31 εισέρχεται στο κύτταρο μέσω κυστιδίων καβεολίνης (Bousarghin L. et al. 2003).

Τα ιϊκά σωματίδια αποδιοργανώνονται στα όψιμα ενδοσωμάτια ή και λυσοσώματα με το ιϊκό DNA να μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (Day P.M. et al. 2003, Day P.M. et al. 2004, Doorbar J. et al. 2006). Τα πρώιμα γονίδια του ιού αρχίζουν να εκφράζονται περίπου μετά την όγδοη ώρα από την μόλυνση (Ozbun M.A. et al. 2002).

## 5.2 Επισωματική και ενσωματωμένη μορφή του ιϊκού γενώματος

Η μόλυνση οδηγεί στην εγκαθίδρυση του ιϊκού γενώματος σε σταθερή επισωματική μορφή, δηλαδή χωρίς ενσωμάτωση στο DNA του κυττάρου ξενιστή στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (Doorbar J. et al. 2006). Παρ'όλα αυτά το γένωμα των HPV πολύ συχνά ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Αυτό συνήθως γίνεται στο σημείο το E2 γονιδίου του ιού και έτσι παύει να εκφράζεται η ιϊκή ρυθμιστική πρωτεΐνη E2 (εικόνα 5.3).



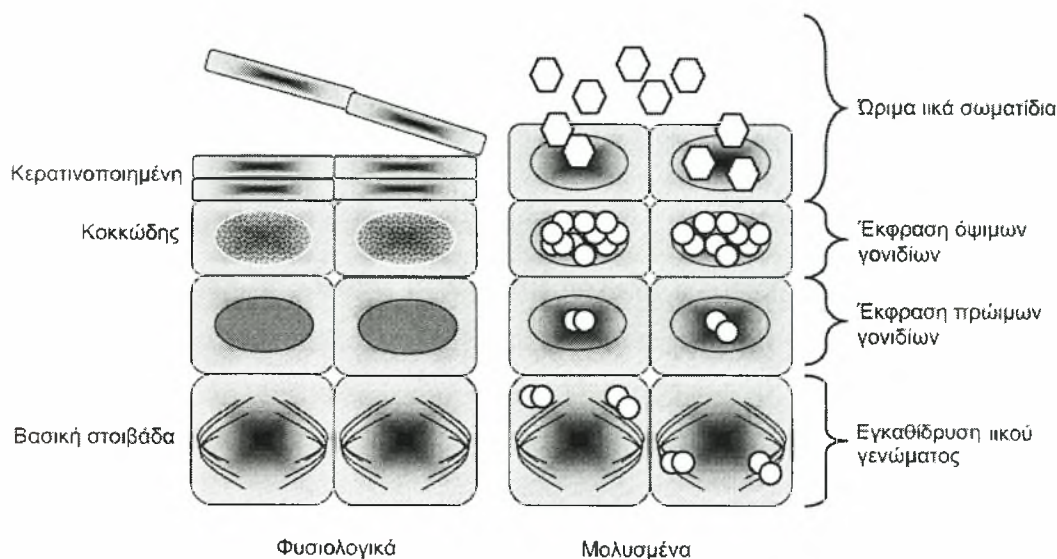
**Εικόνα 5.3:** (A) Το κυκλικό DNA του HPV 16 όπου σημειώνεται με βέλος το σημείο το οποίο ανοίγει και ενσωματώνεται το γένωμα του ιού στο DNA του ξενιστή. (B) Εδώ φαίνεται η ενσωματωμένη μορφή του ιϊκού γενώματος όπου έχει διαταραχθεί η ακαيرهότητα του E2 γονιδίου.

Η απώλεια της ρύθμισης που ασκεί με την δράση της η E2 έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 του HPV (όπως συμβαίνει στον HPV 16) το οποίο έχει ως επακόλουθο την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμό μέσω διάφορων μηχανισμών συμπεριλαμβανομένης και της απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών P53 και pRB (Ciccolini F. Et al. 1994, Scheffner et al. 1993). Αυτό επιτυγχάνεται επειδή η E2 πρωτεΐνη έπειτα από την διακοπή του γονιδίου της δεν παράγεται σωστά και είναι ανίκανη να εκτοπίσει τους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες SP1 και TFIIID από το σημείο πρόσδεσης τους στον προαγωγέα P97 της LCR με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7 (Jeon S. Et al. 1995, Romanczuk H. and Howley P.M. 1992). Αυτό το φαινόμενο πολύ συχνά έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη νεοπλασίας σε καρκίνο του τραχήλου (Cripe T.P. et al. 1987, Gloss B. Et al. 1989, Narayanan S. Et al. 2004).



### 5.3 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Ο όλος κύκλος ζωής των HPV είναι πολύ στενά συνδεδεμένος με τα στάδια διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων όπως φαίνεται στην εικόνα 5.4 (Holey and Lowey 2001).



Εικόνα 5.4: Εδώ φαίνονται τα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων του επιθηλίου. Αριστερά: φυσιολογικά κύτταρα επιθηλίου. Δεξιά: μολυσμένα κύτταρα επιθηλίου.

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο τα ιϊκά σωματίδια αποδιοργανώνονται και το ιϊκό γένωμα μεταναστεύει στον πυρήνα όπου αντιγράφεται και παραμένει σε επισωμική μορφή σε πολλαπλά αντίγραφα ο αριθμός των οποίων διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα των περίπου, 20 - 100 αντιγράφων ανά κύτταρο (Stubenrauch and Laimins 1999).

Η αντιγραφή του ιϊκού DNA εξαρτάται από δυο ιϊκά πολυπεπτίδια που παίζουν άμεσο ρόλο στην αντιγραφή. Αυτά είναι τα προϊόντα των E1 και E2 ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs). Επιπρόσθετα απαιτείται και η παρουσία της ιϊκής αλληλουχίας αντιγραφής (ORI). Αυτά τα τρία "συστατικά" είναι αναγκαία και αρκούν για την αντιγραφή του DNA σε κύτταρα θηλαστικών (Stenlund A., 1991).

Η αντιγραφή των ιϊκών γενωμάτων λαμβάνει μέρος στην φάση S του κυτταρικού κύκλου με την δράση των ιϊκών πρωτεϊνών E1 και E2 σε συνεργασία με τις κυτταρικές πρωτεΐνες αντιγραφής (Lambert et al. 1991, Ustav and Stenlund 1991). Μια μικρή αλληλουχία 60-80bp που εντοπίζεται μεταξύ της LCR και των πρώιμων ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) έχει χαρακτηριστεί ως το σημείο έναρξης της

αντιγραφής (ORI). Αυτό το σημείο του γενώματος φαίνεται να είναι πολύ καλά συντηρημένο σε όλους τους papilloma και περιέχει πλήρως συντηρημένες αλληλουχίες. Τέτοιες αλληλουχίες είναι οι θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 (ACCN<sub>6</sub>GGT), καθώς επίσης και η θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης E1 (TWNTWATWNHW<sub>3</sub>YWAYAAT) (Stenlund A. 1991, O'Connor M. et al 1995). Έπειτα από την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος και διαίρεση του κυττάρου, τα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύουν από την βασική στοιβάδα και ξεκινά ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης (Stubenrauch and Laimins 1999).

#### 5.4 Διέγερση κυττάρων για πολλαπλασιασμό

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της αρχικής μόλυνσης μέχρι την εμφάνιση θηλωμάτων μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το ιϊκό φορτίο του ιού που προκαλεί την μόλυνση καθώς και την φύση του τύπου HPV (Zhang P. et al. 1999, Campo M.S.1995). Σε κονδυλώματα του τραχήλου που προκαλούνται από τον ιό HPV 16 η διαφοροποίηση των κυττάρων του επιθηλίου οφείλεται στην έκφραση των ιϊκών ογκογονιδίων E6 και E7. Τα κύτταρα της ακανθώδους στοιβάδας υπό κανονικές συνθήκες αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο και αρχίζουν την διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης για να δημιουργηθεί το προστατευτικό φράγμα που παρέχει το δέρμα (Madison K.C. 2003). Φυσιολογικά κερατινοκύτταρα εγκαταλείπουν τον κυτταρικό κύκλο απομακρυνόμενα από την βασική στοιβάδα και συνήθως ο πυρήνας εκφυλίζεται. Αντιθέτως σε κύτταρα μολυσμένα από τον ιό παρόλο που διαφοροποιούνται, παραμένουν ενεργά ακολουθώντας τον κυτταρικό κύκλο του ιϊκού γενώματος (Stubenrauch and Laimins 1999).

#### 5.5 Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος

Δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητό το τι εκκινεί τα όψιμα γεγονότα αλλά φαίνεται να εξαρτάται από τις αλλαγές του κυτταρικού περιβάλλοντος καθώς μετακινείται προς την επιφάνεια του επιθηλίου (Doogbar 2006).

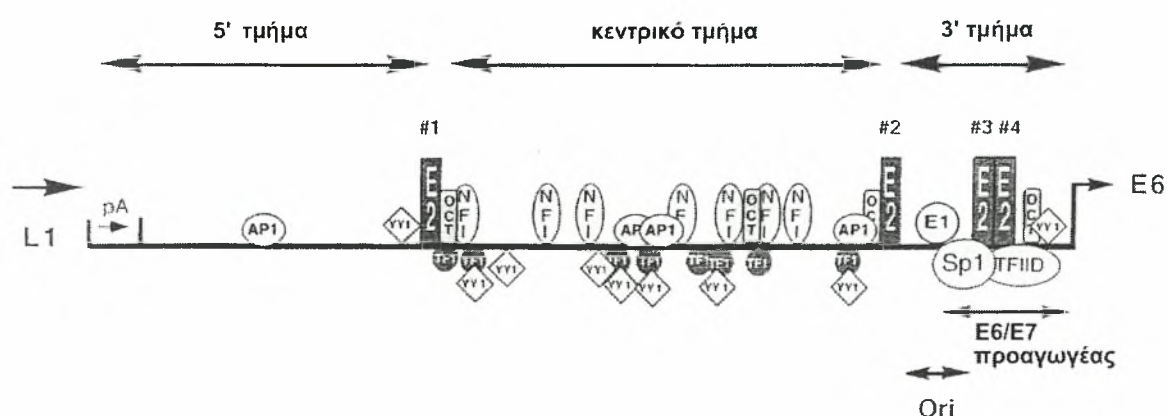
Η έκφραση των ιϊκών γονιδίων στους HR HPV ελέγχεται από δυο κύριους προαγωγείς και μερικούς δευτερεύοντες. Ο κύριος πρώιμος προαγωγέας όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ο P97 στον HPV 16 και κατευθύνει την μεταγραφή των πρώιμων ιϊκών E6, E7, E1, E2, E4 και E5 γονιδίων τερματίζοντας στην πρώιμη θέση πολυαδενυλίωσης (early polyadenylation site, PAE). Με την διαφοροποίηση του κυττάρου ενεργοποιείται ο όψιμος προαγωγέας P670 (στον HPV 16) που βρίσκεται



στο γονίδιο E7 και οδηγεί στην έκφραση των όψιμων γονιδίων (del Mar Pena and Laimins 2001, Grassmann et al. 1996, Hummel et al. 1992) με κύρια τα γονίδια L1 και L2 τερματίζοντας στην όψιμη θέση πολυαδενυλίωσης (late polyadenylation site, PAL) (Doorbar J. 2006).

Η παραγωγή ιϊκών σωματιδίων απαιτεί τελική διαφοροποίηση του κυττάρου ξενιστή κατά την οποία ο ιός πολλαπλασιάζει το γένωμα του και παράγει τις καψιδιακές πρωτεΐνες και τελικά ώριμα σωματίδια (Dell G. and Gaston K. 2001, Flores E.R. and Lambert P.F. 1997, Hebner C. and Laimins L. 2005). Η όλη διαδικασία της μεταγραφής ελέγχεται από την LCR του ιού που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων και θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες-προαγωγείς και την περιοχή ORI του ιϊκού DNA (Louise T. and Thomas R.).

Οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της περιοχής είναι ο nuclear factor 1 (NF-1), τα “activation protein” (ετεροδιμερή jun-fos AP-1, AP-2), transcriptional enhancer factor 1 (Tef-1), octamer 1 (Oct-1), Yin Yang 1 (YY1), TFIID και SP1 (Chan W. et al. 1990, Ishiji T. et al. 1992, Khare S. et al.1997, O’Connor M. and Bernard H-U 1995, O’Connor M. et al. 1996, O’Connor M. et al. 1998) (εικόνα 5.5). Η αναλογία αυτών των κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στην LCR αλλάζει κατά τα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του HPV (Sen E. et al. 2004).



Εικόνα 5.5: Εδώ παρουσιάζεται η LCR του HPV 16 με τις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων NF-1, AP1, Tef-1, Oct-1, YY1, TFIID και SP1.

## 5.6 Σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων

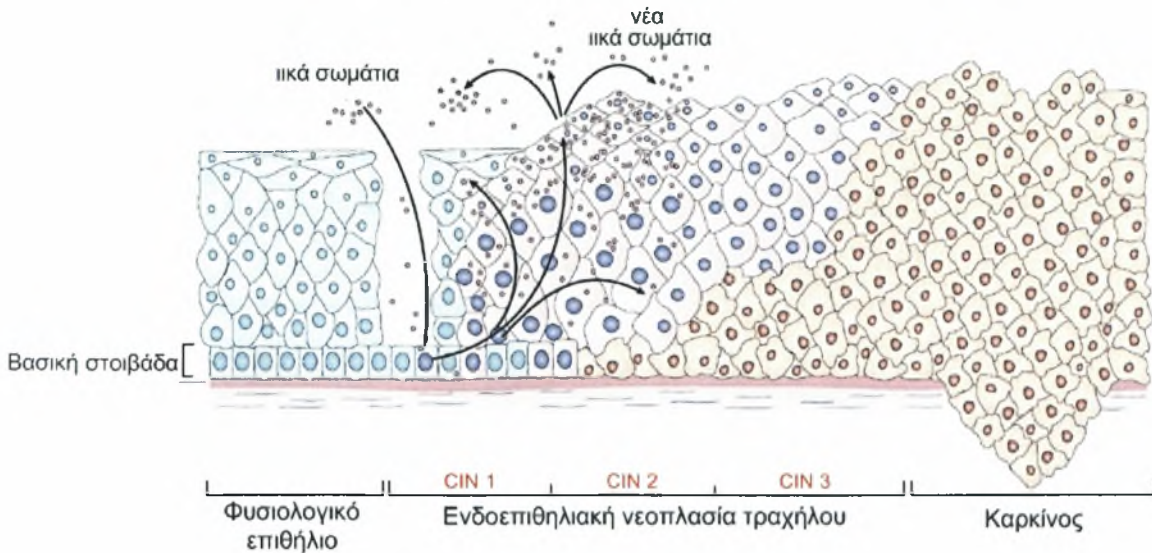
Το τελικό στάδιο του παραγωγικού κύκλου ζωής του ιού papilloma απαιτεί το “πακετάρισμα” των αντιγράφων του γενώματος σε ιϊκά σωματίδια. Αυτό γίνεται με τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες έχουν συσσωρευτεί από την ενίσχυση του ιϊκού γενώματος που προηγήθηκε, με την έκφραση του γονιδίου L2 να προηγείται του L1 (Florin L. et al. 2002, Doorbar J. And Gallimore P. 1987). Η σύνθεση των ιϊκών σωματιδίων στην επιφάνεια του επιθηλίου πιστεύεται ότι απαιτεί εκτός από τις L1 και L2 και την δράση της E2 (Day P. et al. 1998, Zhao K. et al. 2000). Η L2 που εντοπίζεται στον πυρήνα αλληλεπιδρά είτε άμεσα με το DNA είτε με πρόσδεση με την βοήθεια της E2 (Fay A. et al. 2004). Η L1 σχηματίζει καψομερή στο κυτταρόπλασμα πριν μεταφερθεί στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με την L2 για τον σχηματισμό των καψιδίων (Florin L. et al. 2002). Η παρουσία της L2 σ’ αυτή την αλληλεπίδραση έχει αποδειχτεί ότι δεν είναι απαραίτητη αλλά χωρίς αυτή η ικανότητα σχηματισμού των ιϊκών σωματιδίων μειώνεται δραματικά (Stauffer Y. et al. 1998). Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από την επιφάνεια του κερατινοποιημένου κυττάρου όπου πιστεύεται ότι συμμετέχει και η πρωτεΐνη E4 η οποία αποδιοργανώνει το πλέγμα κερατίνης του κυττάρου (Doorbar J et al. 1991, Wang Q. et al. 2004).

## 6. HPV στους ανθρώπους

### 6.1 Η ανεπιτυχής μόλυνση ως πρόδρομος του καρκίνου

Ο καρκίνος που προκαλείται από ιούς συνήθως εμφανίζεται σε σημεία όπου η μόλυνση δεν μπορεί να υποστηριχτεί (διατηρηθεί). Έχει παρατηρηθεί ότι μόλυνση με κάποιο ογκογόνο ιό σε ακατάλληλο ξενιστή οδηγεί σε καρκίνο πολύ πιο συχνά απ’ ότι συνήθως. Οι papilloma ιοί που προκαλούν συνήθως καλοήθης θηλώματα θεωρούνται χαμηλού κινδύνου ενώ οι υψηλού κινδύνου συνδέονται με καρκίνο με επικρατέστερους τους HPV 16 και 18 (Lorincz A.T. 1992). Ανάπτυξη νεοπλασίας παρατηρείται σε γυναίκες στις οποίες δεν ελέγχεται η λοίμωξη, η οποία διατηρείται για χρόνια ή και δεκαετίες. Λόγω αυτής της συνεχούς διέγερσης των κυττάρων για πολλαπλασιασμό καθώς και λόγω της απενεργοποίησης των αποπτωτικών μηχανισμών, συσσωρεύονται μεταλλάξεις που οδηγούν τελικά σε καρκίνο. Ανάλογα με τον βαθμό των αλλοιώσεων χωρίζονται σε CIN 1 (ή LSIL) που είναι χαμηλού

βαθμού αλλοιώσεις, μέχρι και CIN 3 των οποίων το 40% συνήθως οδηγεί σε καρκίνο (Peto et al. 2004). Μια τέτοια περίπτωση φαίνεται στην εικόνα 6.1.



**Εικόνα 6.1: Εξέλιξη της μόλυνσης από HPV σε καρκίνο του τραχήλου. Εδώ φαίνονται και τα προκαρκινικά στάδια CIN 1-3.**

## 6.2 Ανοσολογική απόκριση

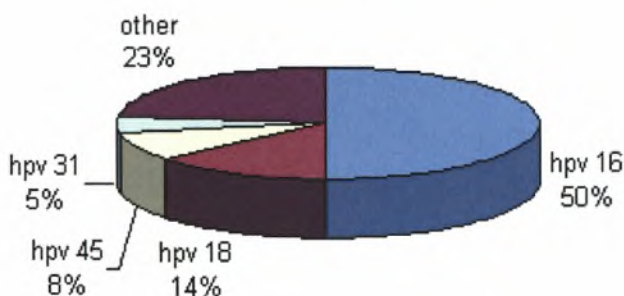
Οι ιοί HPV μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής μολύνοντας ένα μεγάλο αριθμό ατόμων ανά έτος. Παρόλα αυτά, το 95% αυτών των μολύνσεων θα επιλυθούν σε μια περίοδο 3-5 χρόνων, ενώ ανάπτυξη καρκίνου θα εμφανιστεί σε λιγότερο από 0,1% αυτών των ατόμων (Ho et al. 1998, Schlecht et al. 2003). Αυτό το μικρό ποσοστό των ατόμων που τελικά θα αναπτύξουν καρκίνο τονίζει τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα για την καταπολέμηση της μόλυνσης από HPV. Δηλαδή θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι τα καρκινώματα που προκαλούνται από τους ιούς HPV είναι απλά περιπτώσεις που ξέφυγαν από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Βέβαια ο ιός από μόνος του δεν είναι άμεσα καρκινογόνος. Είναι απαραίτητος αλλά όχι ικανός από μόνος του να προκαλέσει κακοήθειες (Gretchen E.L. et al.). Η κυτταρική ανοσολογική απόκριση, ιδίως μέσω των T λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι ο κυριότερος μηχανισμός έναντι των κυττάρων με HPV. Παρόλα αυτά οι HPV φαίνεται να είναι ικανοί να αποφεύγουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις κυρίως επειδή μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας ελάχιστη αντιφλεγμονώδη αντίδραση, καθώς επίσης, λόγω του μη λυτικού τους κύκλου, δεν παρουσιάζουν αντιγόνα στο ανοσολογικό σύστημα και

στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC). Τέλος οι HPV κωδικοποιούν συνήθως για μη εκκρινόμενες πρωτεΐνες οι οποίες δεν είναι ανιχνεύσιμες εξωκυτταρικά ενώ οι μη δομικές τους πρωτεΐνες εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Gretchen et al.).

### 6.3 Εκδηλώσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ιός HPV 16 είναι ένας από τους πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενους ιούς με περίπου 630 εκατομμύρια άτομα να έχουν μολυνθεί από τον ιό παγκοσμίως ενώ 510.000 από αυτές τις περιπτώσεις θα εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου κάθε χρόνο (World Health Organization 2004). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέραν των 100 διαφορετικών τύπων HPV εκ των οποίων περίπου το ένα τρίτο μολύνει το ουρογεννητικό σύστημα και χαρακτηρίζονται είτε ως υψηλού είτε ως χαμηλού κινδύνου ανάλογα με την εξέλιξη της αλλοίωσης που προκαλούν. Οι χαμηλού κινδύνου HPV όπως οι τύποι 6, 11, 42, 43 και 44 συσχετίζονται συχνά με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (intraepithelial neoplasia, CIN) και καλοήγη θηλώματα (Stone et al. 1995). Οι υψηλού κινδύνου τύποι όπως οι 16, 18, 31, 33 και 45 συσχετίζονται με προκαρκινικές δυσπλασίες και καρκίνο (Munoz et al. 2003, Remmink et al. 1995, Schiffman et al. 1993). Το DNA των HPV ανιχνεύεται στο 99,7% του καρκίνου του τραχήλου και ιδιαίτερα οι τύποι HPV 16 και 18 ενοχοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό (Walboomer et al. 1999). Στο 50% αυτών των περιπτώσεων ανιχνεύεται το DNA του HPV 16 όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.2 (Bosh F.X. et al. 1995, Das B.C. et al. 1992, Londesborough P. Et al. 1996).

#### HPV σε καρκίνο του τραχήλου



Bosh et al, from *The J Nat Cancer Inst* 1995; 87:796-802

Εικόνα 6.2: Ποσοστά των τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου.

#### 6.4 Τρόποι μετάδοσης

Οι HPV μεταδίδονται κυρίως μέσω δερματικής επαφής. Τα υϊκά σωματίδια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των ιστών που έχουν μολυνθεί και με την σειρά τους μολύνουν άλλα κύτταρα του ίδιου οργανισμού ή κάποιου άλλου που έρχεται σε επαφή με αυτόν μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι μετάδοσης του ιού όπως και παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από αυτόν.

Αυτοί οι τρόποι περιλαμβάνουν :

α) Την σεξουαλική επαφή.

Το 95% των ατόμων με HPV μολύνθηκε μέσω σεξουαλικής επαφής (Fairlay 1993). Γυναίκες με πολλαπλούς συντρόφους έχουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης μόλυνσης από HPV.

β) Κατακόρυφη μετάδοση.

Μετάδοση από μολυσμένη με τον ιό μητέρα στο νεογέννητο. Αυτού του είδους η μετάδοση είναι λιγότερο συνηθισμένη.

γ) Οριζόντια μετάδοση.

Αυτού του είδους η μετάδοση συμβαίνει σε περιπτώσεις παιδεραστίας (Fraiser 1994).

δ) Μετάδοση χωρίς σεξουαλική επαφή.

Αυτό μπορεί να συμβεί με επαφή με ουρογεννητικά υγρά (Fraiser 1994).

Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης είναι η σεξουαλική συμπεριφορά του ατόμου, π.χ. γυναίκες με πολλαπλούς συντρόφους παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης. Γυναίκες με ηλικία από 15 έως 25 ετών έχουν διπλάσια πιθανότητα να μολυνθούν από HPV (American Journal of Medical Science, AJMS, Lippincott Williams and Wilkins), καθώς και άτομα που είναι ανοσοκατεσταλμένα ή με αδύναμα ανοσοποιητικά συστήματα.



## 6.5 Εμβόλιο

Η ανάπτυξη εμβολίου έναντι του HPV ξεκίνησε το 1991. Αρχικά πειράματα περιλάμβαναν την απομόνωση ιϊκών σωματιδίων από τον ιό papilloma, τα οποία όταν εισήχθησαν σε πειραματικά ζώα ανέπτυξαν ανθεκτικότητα έναντι των θηλωμάτων (Megan B. 2003). Στις 8 Ιουνίου του 2006 εγκρίθηκε η χορήγηση του εμβολίου Gardasil. Το εμβόλιο προστατεύει από τους τύπους 6, 11, 16 και 18. Προς το παρόν το εμβόλιο χορηγείται μόνο σε γυναίκες αλλά και οι άνδρες είναι φορείς του HPV. Το Σεπτέμβριο του 2007 εγκρίθηκε στην Ευρώπη η χορήγηση του εμβολίου Cervarix, το οποίο φαίνεται να παρέχει υψηλή προστασία έναντι των τύπων HPV 16 και 18, δηλαδή των πιο επικίνδυνων για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο συνδυασμός εμβολιασμού και τακτικού προληπτικού ελέγχου με την εξέταση Παπ (τεστ Παπανικολάου, Pap Test) μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά 94% (Wikipedia 2008).

## 6.6 Διάγνωση HPV μόλυνσης

### 6.6.1 Pap test

Το Pap test (τεστ Παπανικολάου) είναι ένα τραχηλικό τεστ που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό κυτταρικών ανωμαλιών και την ύπαρξη του ιού papilloma σε επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου που παρατηρούνται μικροσκοπικά για τυχών αλλοιώσεις.

Οι αρχικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση του HPV ήταν η υβριδοποίηση ανιχνευτών, όπως αυτή του Dot blot και Southern blot. Αυτές οι μέθοδοι ήταν χρονοβόρες, είχαν χαμηλή ευαισθησία και απαιτούσαν πολύ DNA στα κλινικά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι αντικαταστάθηκαν από άλλες που βασίζονται στην ενίσχυση του DNA, και επιτρέπουν την ανίχνευση πολύ χαμηλού αριθμού αντιγράφων του ιϊκού DNA στα κλινικά δείγματα. Δύο τέτοιες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για διάγνωση περιλαμβάνουν την PCR και το Hybrid Capture II (HCII) (Suzanne M. et al. 2006).

### 6.6.2 Hybrid Capture II

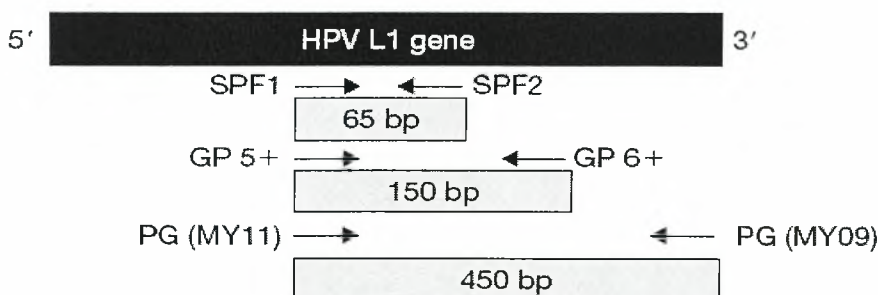
Το Hybrid Capture II (HCII) είναι προς το παρόν η μόνη εγκεκριμένη από το FDA (Food and Drugs Administration) μέθοδος για την ανίχνευση του HPV. Σ' αυτή

την μέθοδο το DNA του HPV υβριδοποιείται με RNA ανιχνευτές (probes). Τα υβρίδια RNA-ανιχνευτής ανιχνεύονται από ένα σύστημα μέτρησης χημιφωταύγειας. Το HCII έχει την ευαισθησία να ανιχνεύει 1pg HPV (50,000 αντίγραφα) ανά ml δείγματος, και μπορεί να διακρίνει μεταξύ υψηλού και χαμηλού κινδύνου HPV αλλά απαιτεί σωστή προετοιμασία των δειγμάτων (Washington University 2009).

### 6.6.3 PCR

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια μέθοδος ενίσχυσης αλληλουχιών DNA (όπως και του HPV) σε βιολογικά δείγματα με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η διαδικασία της PCR θεωρητικά παράγει μέχρι και ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα από ένα τμήμα DNA μετά από 30 κύκλους ενίσχυσης (Suzanne M. et al. 2006). Η PCR χαρακτηρίζεται τόσο από υψηλή ευαισθησία όσο και από υψηλή εξειδίκευση. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου μπορεί να ανιχνεύσει 10 αντίγραφα ιικού γενώματος HPV σε βιολογικό δείγμα 100ng κυτταρικού DNA. Η PCR μπορεί να εφαρμοστεί σε πολύ μικρή ποσότητα DNA από 1-100ng (Washington University 2009).

Τα περισσότερα ερευνητικά εργαστήρια χρησιμοποιούν την PCR με την αξιοποίηση συνδυασμών από εκκινητικά μόρια (primers) που ενισχύουν την πολύ συντηρημένη περιοχή του γονιδίου L1 του HPV γενώματος. Τέτοια εκκινητικά συστήματα είναι το GP5/6 (ή το τροποποιημένο GP5+/6+), το MY09/11 (ή το τροποποιημένο PGMY09/11) και το SPF. Ενίσχυση με το κάθε σύστημα θα δώσει και διαφορετικό μέγεθος προϊόν όπως φαίνεται στην εικόνα 6.3 (Suzanne M. et al. 2006, Kornegay J. et al. 2001).



Εικόνα 6.3:Τμήματα ενίσχυσης του γονιδίου L1 με διαφορετικά συστήματα εκκινητικών μορίων.

#### 6.6.4 Nested PCR

Η Nested PCR είναι μια παραλλαγή της απλής PCR όπου χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων (primers). Ένα ζεύγος χρησιμοποιείται στην αρχική PCR για ενίσχυση ενός τμήματος του γενώματος και έπειτα χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητικών μορίων (Nested primers) σε μια δεύτερη PCR ενισχύοντας ένα τμήμα εσωτερικά των σημείων ενίσχυσης των πρώτων δίνοντας έτσι ένα τμήμα μικρότερο από το πρώτο. Η Nested PCR μ' αυτό τον τρόπο μειώνει την πιθανότητα να ενισχυθεί ξανά ένα λάθος τμήμα το οποίο ενισχύθηκε λανθασμένα με το πρώτο ζεύγος μορίων. Επίσης ο αριθμός των ενισχυμένων τμημάτων αυξάνεται κατακόρυφα.

## 7. Υλικά και μέθοδοι

### 7.1 Δείγματα

Στην εργασία αυτή εξετάστηκαν κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα τα οποία παραχωρήθηκαν για ερευνητικούς σκοπούς από το αντικαρκινικό νοσοκομείο Άγιος Σάββας. Συνολικά εξετάστηκαν δέκα δείγματα στα οποία είχε ανιχνευτεί ο HPV 16 σε προηγούμενη μελέτη που είχε διεξαχθεί στο εργαστήριο αυτό. Τα δείγματα είχαν διατηρηθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε υγρό μέσο thin prep. Τα επτά δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Τα δείγματα με τον HPV 16.

| Δείγματα |
|----------|
| 710      |
| 739      |
| 793      |
| 796      |
| 825      |
| 858      |
| 868      |

### 7.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

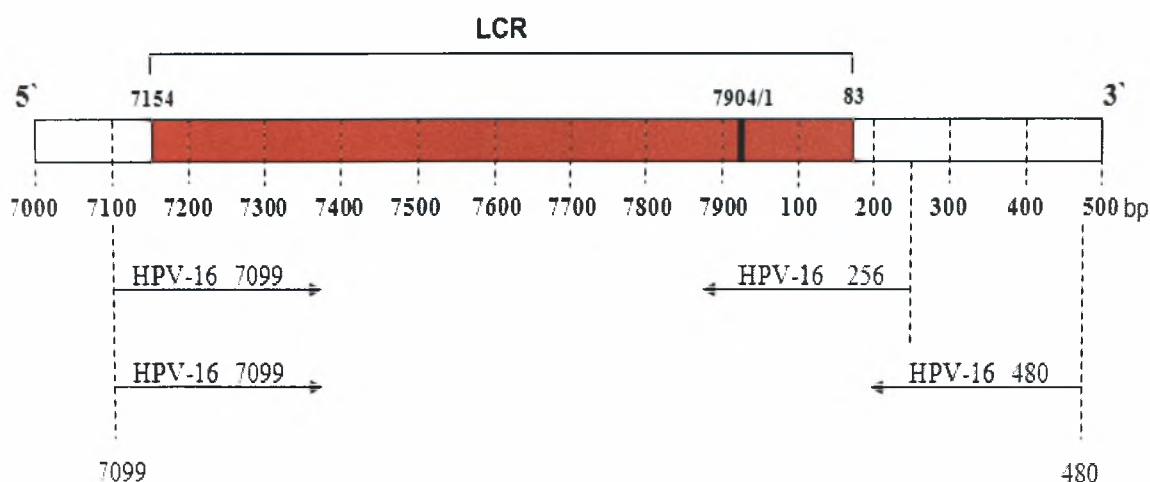
Πρώτο βήμα για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν η απομόνωση του DNA των κυττάρων από τα κλινικά δείγματα το οποίο έγινε εφαρμόζοντας την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουαδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I et al. 1996. Χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα των 100μl από κάθε δείγμα η οποία αναμίχθηκε με 20μl γλυκογόνου και 600μl Lysis Buffer το οποίο περιέχει GuSCN 4M, N-lauroyl Sacrosine 0,5%, Dithiotreitol 1mM, Sodium citrate 25mM. Στην συνέχεια επωαστήκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 14.000 gfc στους  $4^{\circ}\text{C}$  και μετά ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης. Στην συνέχεια έγινε καλή

ανάδευση και φυγοκέντρηση για άλλα 10 λεπτά στις 14,000 rcf στους 4°C. Με το τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH<sub>2</sub>O (RNase, DNase free, Sigma Aldrich Inc. St. Louis, USA). Το διάλυμα αυτό με το DNA που περιείχε τα κύτταρα (κυτταρικό και ιϊκό) αποθηκεύθηκε στους -20°C.

### 7.3 Εκκινητές

Για την πραγματοποίηση των PCR και Nested PCR σε αυτή την ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη εκκινητικών μορίων (primers) σε όλα τα κλινικά δείγματα. Τα εκκινητικά αυτά μόρια σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της LCR των HPV 16 και αποτελούνται από ένα forward primer το HPV7099 (5'-CACCCACCACCTCATCTACC-3') και δύο back primers, το HPV256 (5'-GCA TAA ATC CCG AAA AGC AA-3') και HPV480 (5'-TGG AAT CTT TGC TTT TTG TCC-3').

Τα εκκινητικά αυτά μόρια ενισχύουν μια περιοχή λίγο μεγαλύτερη από την LCR ξεκινώντας την ενίσχυση από τις 7099bp (forward primer) μέχρι τις 480bp (back primer) στην απλή PCR και μέχρι τα 256bp (back primer) στο δεύτερο μέρος της Nested PCR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός τμήματος 1285bp στην PCR με τα HPV7099+480 ενώ ενισχύει ένα τμήμα 1061bp με τα HPV7099+256 όπως φαίνεται στην εικόνα 7.1.



Εικόνα 7.1: Η LCR και οι θέσεις που πιάνουν οι primers.



Μετά από την απλή PCR με τους εκκινητές HPV7099+480 κρίθηκε αναγκαίο να διεξάγεται και Nested PCR με τους εκκινητές HPV7099+480 και HPV7099+256. Οι εκκινητές HPV7099+256 ενισχύουν μια περιοχή εσωτερικά των ήδη ενισχυμένων τμημάτων της πρώτης PCR (με τους HPV7099+480) αυξάνοντας κατά πολύ τα αντίγραφα και την ευαισθησία της διαδικασίας.

#### 7.4 Μάρτυρες

Σε όλες τις PCR και Nested PCR που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας νερό δις απιονισμένο και ελεύθερο νουκλεασών (ddH<sub>2</sub>O RNase και DNase free) για να αποφευχθούν τυχόν θετικά αποτελέσματα λόγω επιμολύνσεων.

#### 7.5 Επιβεβαίωση της επιτυχίας της εκχύλισης

Μετά την εκχύλιση του DNA (ϊικό και κυτταρικό) από τα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR με τα εκκινητικά μόρια GH20 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') και PC04 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'). Η PCR αυτή ενισχύει το γονίδιο της β-γλοβουλίνης που είναι ένα “housekeeping” γονίδιο, δηλαδή γονίδιο το οποίο εκφράζεται συνεχώς σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και κωδικοποιεί για πρωτεΐνες πρωταρχικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου.

Η PCR της β-γλοβουλίνης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Στο κάθε σωληνάριο προστέθηκαν τα παρακάτω: 3μl DNA από το κάθε δείγμα, 5μl ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Paq reaction buffer), 2μl εκκινητικών μορίων (PC04 και GH20) με συγκέντρωση 25pmol, 6μl μείγμα από τα τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5u Paq DNA πολυμεράση και τέλος απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Στην PCR αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός μάρτυρας όπου αντί DNA από τα δείγματα προστέθηκε DNA κυττάρων MRC5 και Rd. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας με ddH<sub>2</sub>O (DNase και RNase free).

Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler και ακολούθησαν οι παρακάτω διαδικασίες και θερμοκρασίες όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Συνθήκες της PCR της β-γλοβουλίνης.

| Εκκινητικά μόρια | Διαδικασία            | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|------------------|-----------------------|-------------|--------|
| PC04 και GH20    | Αρχική αποδιάταξη DNA | 95°C        | 2 min  |
|                  | Αποδιάταξη DNA        | 94 °C       | 30 sec |
|                  | Υβριδοποίηση          | 40 °C       | 30 sec |
|                  | Επιμήκυνση            | 72 °C       | 1 min  |
|                  | Επώαση                | 72 °C       | 5 min  |

} 35 cycles

Τα πιο πάνω προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel, Invitrogen Life Technology, Paisley, UK). Για την ηλεκτροφόρηση αυτή παρασκευάστηκε πήκτωμα 2% με 1,2g αγαρόζη σε 60ml TBE 1x (Tris,Boric acid,EDTA) τα οποία θερμάνθηκαν μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και αφέθηκε να κρυσώσει λίγο μέχρι τους 60 °C περίπου πριν προστεθούν σ'αυτό 75μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 1μg/ml). Το υγρό χύθηκε σε plate πηκτωμάτων, τοποθετήθηκαν χτένες και έμεινε για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να πήξει. Όταν στερεοποιήθηκε αφαιρέθηκαν οι χτένες δημιουργώντας πηγαδάκια για φόρτωση του προϊόντος της PCR. Για την φόρτωση αναμίχθηκαν 10μl προϊόντος με 2μl χρωστικής για το κάθε δείγμα και έπειτα φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Σε ένα πηγαδάκι προστέθηκαν 4μl μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 90-100 volts. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (με το Foto/Phoresis I, Fotodyne).

### 7.6 PCR των δειγμάτων με primers για την ενίσχυση της LCR

Εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι τα δείγματα όντως περιείχαν DNA προχωρήσαμε στο επόμενο βήμα που είναι η χρήση των εκκινητικών μορίων HPV7099 και HPV480 για την ενίσχυση της LCR των HPV.

Σ'αυτό το σημείο χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν αρκετές PCR σε διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά τις θερμοκρασίες και τον αριθμό κύκλων μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα για την ανίχνευση των HPV. Παρ'όλα αυτά η απλή PCR δεν ήταν αρκετή για να δώσει ανιχνεύσιμες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης, έτσι έπρεπε να διεξαχθούν και Nested PCR για ακόμα μεγαλύτερη ενίσχυση του DNA.

Η αντίδραση αυτή της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl με τα παρακάτω αντιδραστήρια:

| Ποσότητα               | Αντιδραστήρια                                      |
|------------------------|--|
| 3μl                    | DNA από κάθε δείγμα                                |
| 1μl                    | Εκκινητικά μόρια (HPV7099, HPV480) των 25pmol each |
| 5μl                    | Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Paq buffer 10x)            |
| 6μl                    | Μείγμα νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs)                  |
| 0,5                    | Paq DNA Πολυμεράση (5u/μl)(2,5u/tube)              |
| μέχρι τελικό όγκο 50μl | ddH <sub>2</sub> O (ελεύθερο νουκλεασών)           |

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler και οι συνθήκες της PCR φαίνονται στον πίνακα 7.3. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNase και RNase.

Πίνακας 7.3: Συνθήκες της απλής PCR.

| Εκκινητικά μόρια       | Διαδικασία            | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|------------------------|-----------------------|-------------|--------|
| HPV7099<br>+<br>HPV480 | Αρχική αποδιάταξη DNA | 95°C        | 2 min  |
|                        | Αποδιάταξη DNA        | 94 °C       | 30 sec |
|                        | Υβριδοποίηση          | 55 °C       | 10 sec |
|                        | Επιμήκυνση            | 72 °C       | 10 sec |
|                        | Επώαση                | 72 °C       | 5 min  |

} 35 cycles

Από την PCR αυτή τα περισσότερα δείγματα δεν ενισχύθηκαν αρκετά για να φαίνονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Έτσι κρίθηκε αναγκαίο να διεξαχθεί Nested PCR (NPCR). Εδώ πραγματοποιήσαμε κάποιο αριθμό δοκιμών στους κύκλους που χρειάζεται η πρώτη ενίσχυση για να έχει την μεγαλύτερη αποδοτικότητα στο δεύτερο κύκλο ενίσχυσης της NPCR. Έτσι βρέθηκε ότι στην πρώτη ενίσχυση οι συνθήκες της προηγούμενης απλής PCR (ορισμένα δείγματα έδιναν καλύτερα αποτελέσματα στους 25 κύκλους) είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα όταν συνδυαζόταν με την δεύτερη ενίσχυση της NPCR στους 30 κύκλους.

Διεξήχθησαν και οι δύο συνδυασμοί της NPCR α) πρώτη ενίσχυση 35 cycles με δεύτερη ενίσχυση στο 30 cycles και β) πρώτη ενίσχυση 25 cycles με δεύτερη ενίσχυση 30 cycles.

## 7.7 Nested PCR

Τα προϊόντα των πρώτων κύκλων ενίσχυσης (35 cycles και 25cycles) ενισχύθηκαν ξανά με το δεύτερο κύκλο ενίσχυσης της NPCR χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά τους εκκινητές HPV7099 και HPV256 οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα εσωτερικά από αυτό που ενίσχυσαν οι εκκινητές του πρώτου κύκλου ενίσχυσης (βλ. εικόνα 7.1).

Η αντίδραση της Nested PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl με τα παρακάτω αντιδραστήρια:

| Ποσότητα               | Αντιδραστήρια                                      |
|------------------------|--|
| 3μl                    | DNA δειγμάτων του πρώτου κύκλου ενίσχυσης          |
| 1μl                    | Εκκινητικά μόρια (HPV7099, HPV256) των 25pmol each |
| 5μl                    | Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Paq buffer 10x)            |
| 6μl                    | Μείγμα νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs)                  |
| 0,5                    | Paq DNA Πολυμεράση (5u/μl)(2,5u/tube)              |
| μέχρι τελικό όγκο 50μl | ddH <sub>2</sub> O (ελεύθερο νουκλεασών)           |

Η αντίδραση της NestedPCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler και οι συνθήκες φαίνονται στον πίνακα 7.4. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNase και RNase.

Πίνακας 7.4: Συνθήκες δεύτερου κύκλου ενίσχυσης της Nested PCR.

| Εκκινητικά μόρια       | Διαδικασία            | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|------------------------|-----------------------|-------------|--------|
| HPV7099<br>+<br>HPV256 | Αρχική αποδιάταξη DNA | 95°C        | 2 min  |
|                        | Αποδιάταξη DNA        | 94 °C       | 30 sec |
|                        | Υβριδοποίηση          | 55 °C       | 10 sec |
|                        | Επιμήκυνση            | 72 °C       | 10 sec |
|                        | Επώαση                | 72 °C       | 5 min  |

} 30 cycles

Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της NestedPCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Invitrogen Life Technology, Pairsley, UK) όπως έχει ήδη περιγραφεί.

Από την Nested PCR υπήρχαν δυο δείγματα που δεν ενισχύθηκαν ικανοποιητικά. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε μια Nested PCR σε αυτά τα δείγματα με GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) για να προχωρήσουμε στην διαδικασία της κλωνοποίησης (cloning) κυττάρων E. Coli με τον ιό για ενίσχυση του DNA με την χρήση του pGEM-T Easy Vector Systems (Promega).

### 7.8 Nested PCR με GoTaq Flexi DNA Polymerase

Στα προϊόντα της PCR των δύο αυτών δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος cloning κατά την οποία εισάγονται τα υπό εξέταση τμήματα DNA σε κύτταρα E. Coli rec A+. Πριν γίνει αυτό όμως πραγματοποιήθηκε μια Nested PCR με GoTaq Flexi DNA Polymerase σε τελικό όγκο 50μl με τα παρακάτω αντιδραστήρια:

| Ποσότητα                  | Αντιδραστήρια   |
|---------------------------|---|
| 3μl                       | DNA προϊόντων της PCR                                   |
| 1μl                       | Εκκινητικά μόρια (HPV7099, HPV256) των 25pmol each      |
| 10μl                      | Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Colorless GoTaq Flexi buffer 5x) |
| 1μl                       | Μείγμα νουκλεοτιδίων 40mM (dNTPs)                       |
| 4μl                       | MgCl <sub>2</sub> Solution 25mM                         |
| 0,25                      | GoTaq DNA Πολυμεράση (5u/μl)(1,25u/tube)                |
| μέχρι τελικό<br>όγκο 50μl | ddH <sub>2</sub> O (ελεύθερο νουκλεασών)                |

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler και οι συνθήκες φαίνονται στον πίνακα 7.5. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O ελεύθερο από DNase και RNase.

**Πίνακας 7.5: Συνθήκες της Nested PCR με GoTaq Flexi.**

| Εκκινητικά μόρια       | Διαδικασία            | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|------------------------|-----------------------|-------------|--------|
| HPV7099<br>+<br>HPV256 | Αρχική αποδιάταξη DNA | 95°C        | 2 min  |
|                        | Αποδιάταξη DNA        | 95 °C       | 30 sec |
|                        | Υβριδοποίηση          | 55 °C       | 30 sec |
|                        | Επιμήκυνση            | 72 °C       | 1 min  |
|                        | Επώαση                | 72 °C       | 5 min  |

} 30 cycles



## 7.9 Κλωνοποίηση (Cloning)

Για την κλωνοποίηση προσθέσαμε 1ml υγρής καλλιέργειας LB σε falcon στους 37°C χωρίς αμπικιλίνη σε επωαστήρα στις 210 στροφές/λεπτό overnight. Ξεκινήσαμε με 1ml υγρής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με 50ml LB (αποστειρωμένο) το οποίο τοποθετήσαμε στον επωαστήρα για 2 ώρες στις 210 στροφές/λεπτό και 37°C. Με το τέλος των 2 ωρών επιβεβαιώσαμε την πυκνότητα του υγρού σε κύτταρα με την φωτομέτρηση της καλλιέργειας σε OD 600 για τιμή 0,45-0,55 ενώ χρησιμοποιήθηκε καθαρό LB ως τυφλό. Σε όσο το δυνατό πιο αποστειρωμένο χώρο τοποθετήσαμε την καλλιέργεια σε πάγο για 10 λεπτά, κάναμε μια φυγοκέντηση στις 4000 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά. Κρατήσαμε το υποκείμενο και ενώ ήταν στον πάγο προσθέσαμε 10ml CaCl<sub>2</sub> (για ποσότητα 50ml LB). Επαναλάβαμε το στάδιο αυτό της φυγοκέντησης και CaCl<sub>2</sub> (2ml αυτή τη φορά) και προσθέσαμε το υγρό της λιγάσης που είχε προετοιμαστεί νωρίτερα με 10-15μl λιγάση με 50 ng φορέα για τα 250ng DNA (αναλογία 1 προς 5). Επώαστηκε για 30 λεπτά σε πάγο και ακολούθησε επώαση στους 42°C για 90sec, έπειτα από 2 λεπτά στον πάγο προσθέσαμε 800μl LB σε κάθε tube. Προσθέσαμε από 15ml σε κάθε falcon tube και επώασαμε για μία ώρα στις 210 στροφές στους 37 °C. Τέλος σε 300μl από το κάθε falcon προστέθηκαν 30μl X-Gal (20μg/ml) και τα επιστρώσαμε σε τριβλία ενώ προσθέσαμε και 300μl αμπικιλίνη (6,6mg/ml) για κάθε 200ml LB άγαρ. Επώασαμε overnight και πήραμε 5 άσπρες αποικίες (που περιέχουν τον φορέα) από κάθε δείγμα.

## 7.10 RFLP

Από το κάθε δείγμα πήραμε 10μl τα οποία προσθέσαμε σε tubes και έπειτα πραγματοποιήθηκε RFLP με EcoRI ένζυμο περιορισμού με τα πιο κάτω:

| Ποσότητα    | Αντιδραστήρια                            |
|-------------|--|
| 2μl/tube    | Buffer 10x                               |
| 6,5 μl/tube | ddH <sub>2</sub> O (ελεύθερο νουκλεασών) |
| 1,5μl/tube  | Ένζυμο περιορισμού EcoRI                 |

Επώαστηκε για 2 ώρες στους 37°C. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκαν 3μl loading buffer. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα

αγαρόζης 2% και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία οι ζώνες στο πήκτωμα για να επιβεβαιώσουμε την ενίσχυση της LCR στην κλωνοποίηση.

## 8. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

### 8.1 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR

Από τα προϊόντα της Nested PCR και κλωνοποίησης ηλεκτροφορήθηκαν 40μl-50μl σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Από το πήκτωμα αυτό κόπηκαν οι ζώνες που έδωσαν ενίσχυση στο ύψος των περίπου 1000bp που αναμέναμε τα προϊόντα μας της LCR. Τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε σωλήνες Eppendorf των 1,5ml και ακολούθησε καθαρισμός των κομματιών του πηκτώματος με το QIAquick Gel extraction Kit τη Qiagen βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Τα προϊόντα αυτά στάλθηκαν στην Macrogen Inc (Seoul, Korea) όπου έγινε η αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής τους ακολουθίας .

### 8.2 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

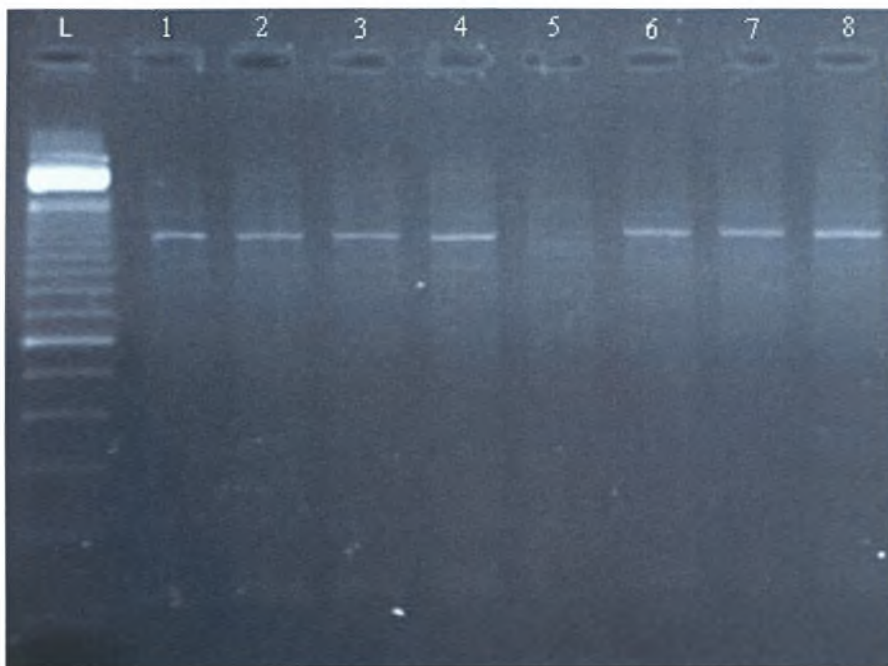
Η μελέτη αυτών των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με την χρήση διαφόρων προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Για την εύρεση προτύπων αλληλουχιών που βρίσκονται καταχωρημένες στις παγκόσμιες γονιδιακές τράπεζες δεδομένων όπως το Genbank του NCBI, χρησιμοποιήθηκε το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Για την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το Gene Runner και Chromas 2.01 ( Technelysium Pty Ltd). Τέλος για την οργάνωση, στοίχιση, σύγκριση και εύρεση αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε το MEGA 3.1.

## 9. Αποτελέσματα

### 9.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης

Στην εικόνα 9.1 φαίνεται το πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR της β-γλοβουλίνης (πίνακας 7.2) εννέα κλινικών δειγμάτων από τις αρχικές εκχυλίσσεις του DNA. Τα δείγματα αυτά μετά από την εκχύλιση υποβλήθηκαν σε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία

DNA και απουσία αναστολέων της PCR απαραίτητο βήμα για την διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων.

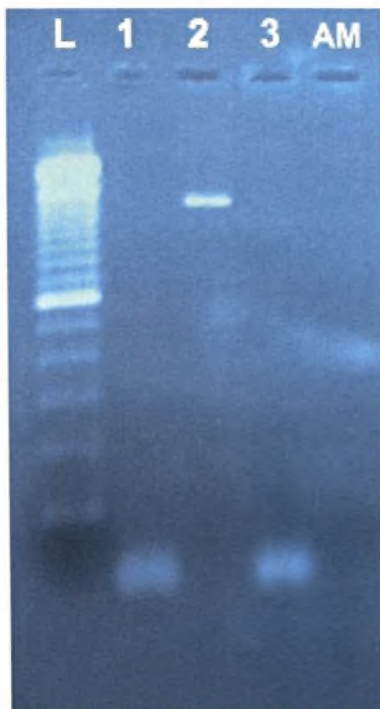


**Εικόνα 9.1:** Αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (Ladder, L) ενώ στη θέση 5 βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας. Στις θέσεις 1, 2, 3, 4, 6, και 7 τα κλινικά δείγματα 710, 747, 793, 796, 858 και 868 αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 9.1) συμπεραίνουμε ότι στα κλινικά αυτά δείγματα έχει γίνει σωστά η εκχύλιση καθώς φαίνονται όλες οι ζώνες των προϊόντων και βρίσκονται στο σωστό ύψος σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους (Ladder, L) που βρίσκεται στην πρώτη στήλη. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L) της Invitrogen διαχωρίζεται ανά 100bp με την πρώτη ζώνη στα 600bp να φαίνεται πιο έντονα ενώ η δεύτερη στα 1500bp. Η χρήση του μάρτυρα μοριακού βάρους (L) χρησιμεύει για να υπολογίζουμε το μοριακό βάρος των ζωνών των δειγμάτων που βρίσκονται στις δίπλα στήλες. Στη θέση 5 φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας όπου δεν έχει δώσει σήμα αποδεικνύοντας ότι στην διαδικασία δεν έχουμε επιμολύνσεις.

### 9.1 Αποτελέσματα της ενίσχυσης της LCR με PCR (HPV7099 και HPV480)

Από την αρχική αυτή PCR (πίνακας 7.3) που διεξήχθη με την χρήση των εκκινητών που φτιάξαμε για την LCR (HPV7099 και HPV480), πήραμε μόνο μια ζώνη ενίσχυσης στη θέση 2 που αντιστοιχεί στο δείγμα 796, όπως φαίνεται στην εικόνα 9.2.

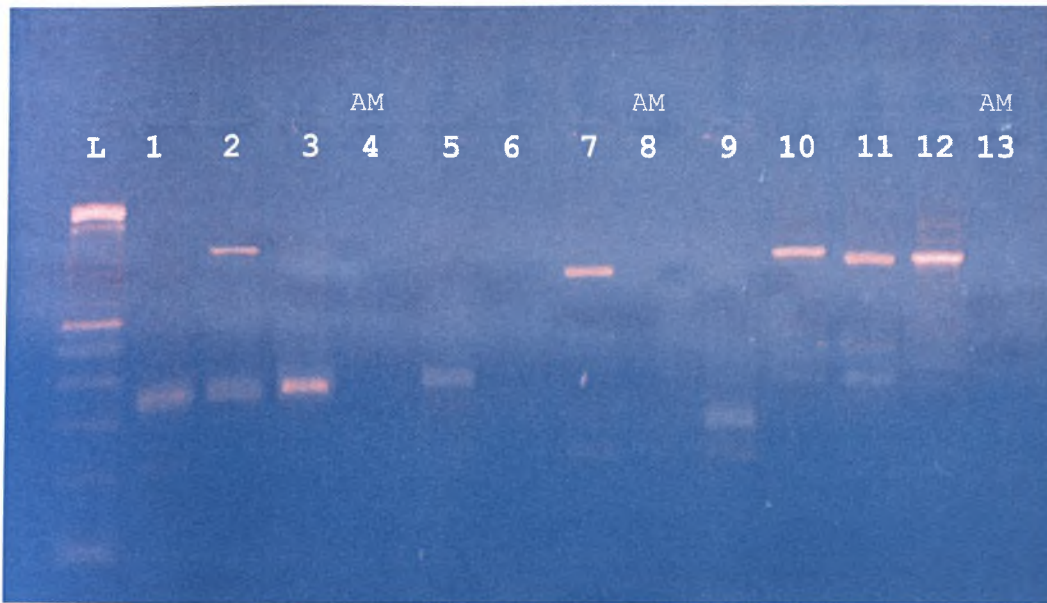


Εικόνα 9.2: Αποτελέσματα απλής PCR με εκκινητές HPV7099 και HPV480. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L), στις θέσεις 1, 2, και 3 βρίσκονται τα δείγματα 795, 796 και 858 αντίστοιχα. Στην στήλη 4 είναι ο αρνητικός μάρτυρας ddH<sub>2</sub>O (AM).

Από την εικόνα αυτή βλέπουμε ότι η ενίσχυση της LCR με PCR στις συνθήκες που φαίνονται στον πίνακα 7.3, δεν ήταν αρκετά ικανοποιητική. Βλέπουμε ότι μόνο το δείγμα 796 στη θέση 2 έδωσε ζώνη ενίσχυσης ενώ τα δείγματα 795 (θέση 1) και 858 (θέση 3) δεν έδωσαν. Στην θέση 4 είναι ο αρνητικός μάρτυρας που επιβεβαιώνει ότι η διαδικασία πραγματοποιήθηκε χωρίς επιμολύνσεις.

### 9.2 Nested PCR

Στην εικόνα 9.3 φαίνονται τα προϊόντα ενίσχυσης της Nested PCR με το ζεύγος εκκινητών HPV7099 και HPV256 στον δεύτερο κύκλο ενίσχυσης της.



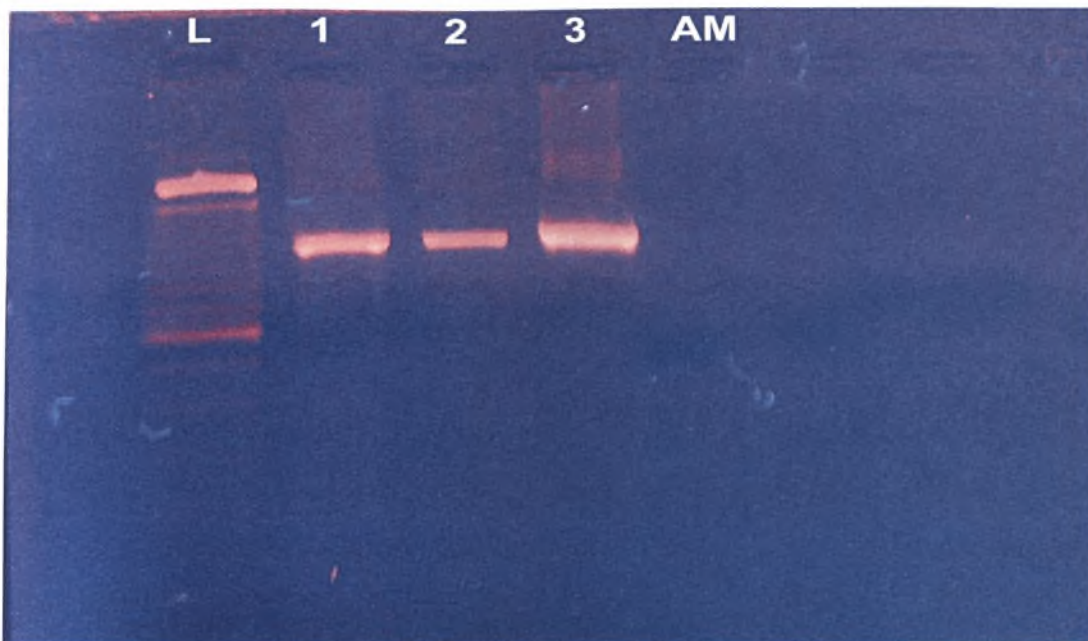
**Εικόνα 9.3:** Αποτελέσματα της Nested PCR. Στην πρώτη στήλη βρίσκεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L). Στις θέσεις 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 είναι τα δείγματα 795, 796, 858, 659, 710, 739, 747, 793, 825, 868 αντίστοιχα. Στις θέσεις 4, 8 και 13 βρίσκονται οι αρνητικοί μάρτυρες (AM).

Στην εικόνα αυτή παρατηρούμε ότι τα δείγματα στις θέσεις 2, 3, 7, 10, 11 και 12 παρουσιάζουν ζώνη ενίσχυσης που αντιστοιχεί σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους (L) σε τμήματα με περίπου 1100bp που είναι περίπου το μέγεθος για το οποίο έχουν σχεδιαστεί οι εκκινητές να ενισχύσουν. Στη θέση 3 (δείγμα 858) βλέπουμε ελάχιστη ενίσχυση που όμως αντιστοιχεί στο μέγεθος που περιμένουμε. Τα δείγματα 1, 5, 6 και 9 δεν ενισχύθηκαν καθόλου. Στις θέσεις 4, 8 και 13 βρίσκονται οι αρνητικοί μάρτυρες (AM) όπου έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O και δεν έχουν δώσει ζώνη ενίσχυσης, επιβεβαιώνοντας ότι δεν έχει γίνει επιμόλυνση στην Nested PCR.

### 9.3 Nested PCR με GoTaq Flexi Πολυμεράση

Λόγω της χαμηλής ενίσχυσης αποφασίστηκε στα δείγματα 793 και 858 να γίνει Nested PCR με GoTaq Flexi Πολυμεράση και μετά cloning. Στην εικόνα 9.4 βλέπουμε τα προϊόντα ενίσχυσης των τριών κλινικών δειγμάτων 793, 825 και 858.



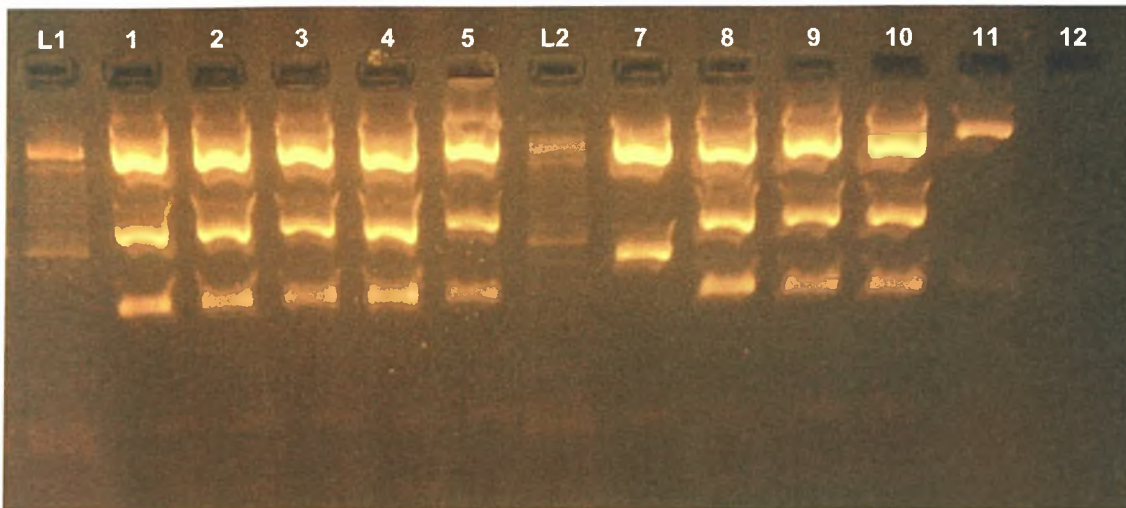


Εικόνα 9.4: Τα προϊόντα της Nested PCR με GoTaq Flexi. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L). Στις θέσεις 1, 2 και 3 αντιστοιχούν τα δείγματα 793, 825 και 858 αντίστοιχα.

Στην εικόνα αυτή παρατηρούμε ότι ενισχύθηκαν και τα τρία δείγματα και έχουν δώσει ζώνες ενίσχυσης περίπου 1100bp σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους (L). Αυτές οι ζώνες αντιστοιχούν στο μέγεθος που περιμένουμε από τους εκκινητές.

#### 9.4 RFLP με *EcoRI*

Στην εικόνα 9.5 παρατηρούμε τα προϊόντα της RFLP όπου στις θέσεις 1-5 βρίσκεται το δείγμα 793 ενώ στις θέσεις 7-11 το δείγμα 858. Στις θέσεις 0 (L1) και 6 (L2) φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους και στην θέση 12 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας το ddH<sub>2</sub>O. Βλέπουμε τρεις ζώνες ενίσχυσης περίπου στα 400bp, 700bp και 1400bp.

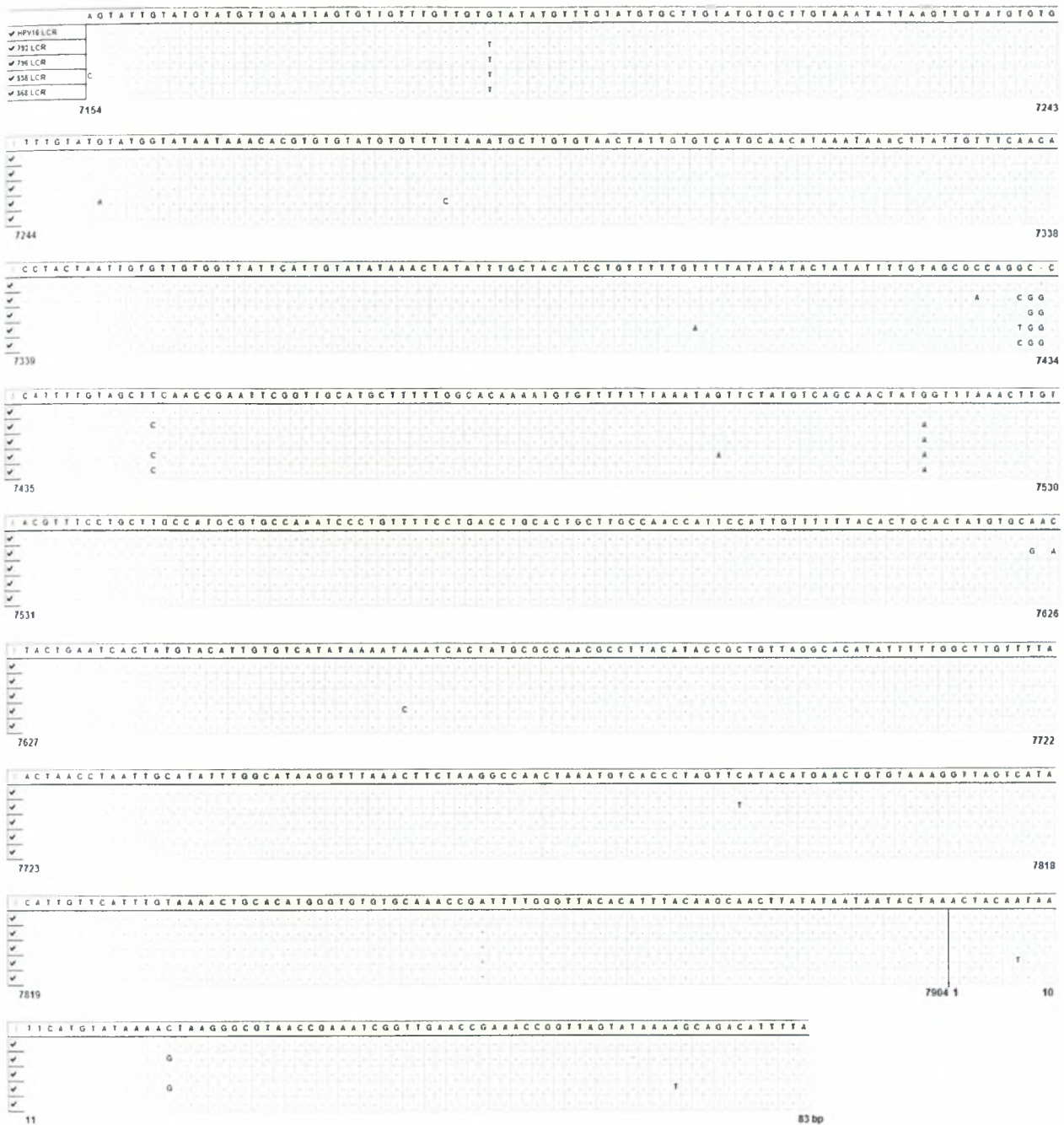


Εικόνα 9.5: Τα προϊόντα της RFLP με EcoRI. Στις θέσεις L1 και L2 βρίσκονται οι μάρτυρες μοριακού βάρους. Στις θέσεις 1-5 βρίσκεται το δείγμα 793 και στις θέσεις 7-11 το 858. Στη θέση 12 είναι ο αρνητικός μάρτυρας.

### 9.5 Αποτελέσματα από την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Όλες οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν με τις προηγούμενες PCR, Nested PCR και μετά από κλωνοποίηση που περιλαμβάνουν τα δείγματα 793, 796, 858 και 868, επεξεργάστηκαν με το Chromas v2.01 (1998-2005). Έπειτα συγκρίθηκαν μεταξύ τους καθώς και με την πρότυπη αλληλουχία της LCR του HPV 16 (αριθμός καταχώρησης: NC\_001526) με την χρήση του προγράμματος MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Δυστυχώς τα δείγματα 710, 739 και 825 μετά την αλληλούχιση τους δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα για να μπορεί να ολοκληρωθεί η μελέτη τους.

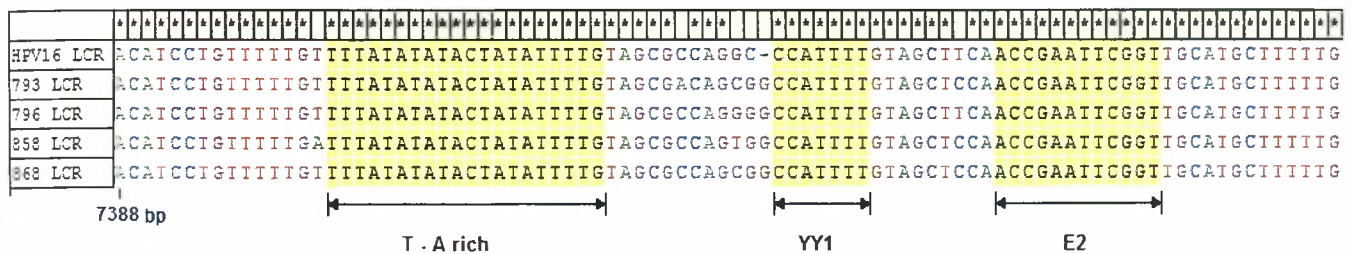
Από τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής σύγκρισης της LCR των κλινικών αυτών δειγμάτων με την LCR του πρότυπου στελέχους του HPV 16 βλέπουμε ότι είναι πάρα πολύ καλά συντηρημένη και υπάρχουν ελάχιστες αλλαγές μεταξύ των δειγμάτων όπως μπορεί να δει κανείς στην εικόνα 9.6. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης των δειγμάτων 793, 796, 858 και 868 σε σύγκριση με την πρότυπη αλληλουχία του HPV 16 όπως επεξεργάστηκαν με το MEGA 3.1.



**Εικόνα 9.6:** Η LCR (Long Control Region) της πρότυπης αλληλουχίας και των δειγμάτων 793, 796, 858 και 868.

Από την εικόνα αυτή μπορούμε να παρατηρήσουμε το πόσο συντηρημένη είναι γενικά η LCR και συγκεκριμένα το κεντρικό τμήμα της LCR που έχει μήκος περίπου 400bp (από ~7440bp μέχρι περίπου 7850bp). Αυτό το τμήμα λειτουργεί ως ενισχυτής (enhancer) και προσδίδει τον τροπισμό του HPV 16 όσο αφορά το είδος του ιστού που προσβάλλει. Επίσης περιέχει τις περισσότερες θέσεις πρόσδεσης των

μεταγραφικών παραγόντων όπως Oct-1, NF-1, AP-1, TF-1, E2 και YY1. Σ'αυτή την περιοχή της LCR του HPV16 βρίσκεται και ένα τμήμα 35bp με θέσεις πρόσδεσης για το YY1 και E2 που είναι πολύ συντηρημένο ανάμεσα σε όλους τους τύπους HPV που προσβάλλουν το ουρογεννητικό σύστημα. Στην εικόνα 9.7 παρουσιάζεται αυτή η περιοχή η οποία και στα δείγματα μας φαίνεται να είναι συντηρημένη 100%. Λίγες βάσεις ανοδικά της θέσης πρόσδεσης του YY1 εντοπίζεται μια περιοχή πλούσια σε θυαμίνη (T) και αδερίνη (A) (T-A rich domain) η οποία είναι επίσης κατά 100% συντηρημένη στα δείγματα μας.



Εικόνα 9.7: Οι συντηρημένες αλληλουχίες YY1, E2 και T-A rich των HPV 16 ιών των δειγμάτων.

Με την χρήση του MEGA εξετάστηκαν επίσης οι αλληλουχίες πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Μ.Π.) όπως φαίνονται στον πίνακα 9.1 για να διαπιστωθεί αν είναι συντηρημένες στα δείγματα μας.

Πίνακας 9.1: Μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στην LCR και οι αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης.

| Ονομασία Μ.Π.                            | Μεταγραφικός παράγοντας | Αλληλουχία πρόσδεσης |
|--|-------------------------|----------------------|
| <b>Nuclear Factor 1</b>                  | NF1                     | TTGGC                |
| <b>Activator Protein 1</b>               | AP1                     | TKWNTMA              |
| <b>Octamer 1</b>                         | Oct-1                   | AANWGYAB             |
| <b>Transcriptional Enhancer Factor 1</b> | Tef-1                   | YRCATDBYDB           |
| <b>Yin Yang 1</b>                        | YY1                     | MCATNKT              |
| <b>Πρωτεΐνη E2</b>                       | E2                      | ACCNNNNNNGGT         |

Όπου **K** = G ή T, **W** = A ή T, **M** = A ή C, **R** = G ή A, **Y** = T ή C, **B** = G, T ή C, **D** = G, A ή T.

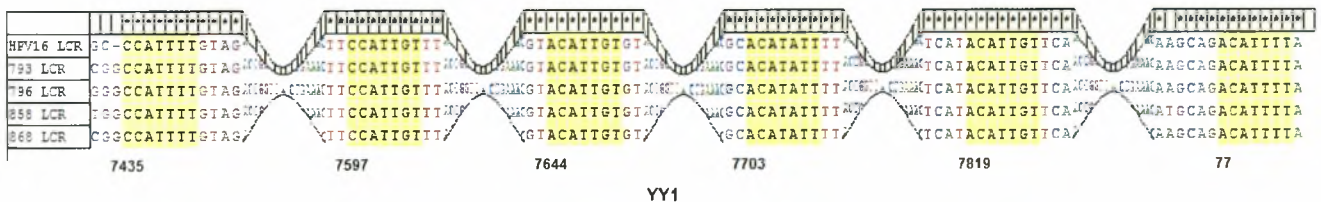


Από την εξέταση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δειγμάτων για τις αλληλουχίες των μεταγραφικών παραγόντων αξιοσημείωτο είναι η συντήρηση των τεσσάρων θέσεων πρόσδεσης των πρωτεϊνών E2 ( #1, #2, #3 και #4). Επίσης αξιοσημείωτο είναι η ακριβής απόσταση των θέσεων πρόσδεσης E2 #3 και E2#4 με απόσταση μονάχα 3bp που είναι συντηρημένη στους ιούς HPV που μολύνουν το ουρογεννητικό σύστημα όπως επιβεβαιώνεται και στα δείγματα μας και παρουσιάζονται στην εικόνα 9.8.



**Εικόνα 9.8: Οι συντηρημένες αλληλουχίες πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2.**

Η αλληλουχία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα YY1 στην LCR είναι επίσης πολύ συντηρημένη στα δείγματα μας. Στα δείγματα αυτά βρέθηκαν έξι τέτοιες αλληλουχίες με ομολογία 100% όπως φαίνεται στην εικόνα 9.9.



**Εικόνα 9.9. Οι αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα YY1 στα δείγματα μας. Βρέθηκαν έξι τέτοιες θέσεις.**

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι για αυτές τις θέσεις του YY1 δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι προσδένουν μόνο τον παράγοντα YY1 γιατί υπάρχει πολύ μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των αλληλουχιών στις οποίες προσδένεται ο YY1 και ο Tef-1 όπως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα (εικόνα 9.10).





Εικόνα 9.10: Οι αλληλουχίες πρόσδεσης των YY1 και Tef-1 στην LCR, όπου φαίνεται η αλληλοεπικάλυψη.

Γενικότερα από την ανάλυση των αλληλουχιών βρέθηκαν εκτός του YY1 και Tef-1, τρεις θέσεις πρόσδεσης του NF1, δώδεκα του AP1, έξι του Tef-1 και τρεις του Oct-1.

## 10. Συζήτηση

Μερικοί ιοί που περιέχουν είτε RNA είτε DNA γενώματα μπορούν να προκαλέσουν όγκους και η μελέτη αυτών των ιών έχει προσφέρει πολύτιμες γνώσεις για τις βασικές κυτταρικές και μοριακές διεργασίες. Η ταυτοποίηση τέτοιων ογκογόνων ιών που προσβάλλουν τον άνθρωπο έχει αυξήσει την πεποίθηση πολλών ανθρώπων ότι θα καταστεί δυνατή η αποτελεσματική θεραπεία ορισμένων καρκίνων που οφείλονται σ'αυτούς. Μια τέτοια μορφή καρκίνου είναι αναμφίβολα ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας που σκοτώνει χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο και έχει συσχετιστεί άμεσα με την προσβολή από τους ιούς HPV (Human papilloma virus), κυρίως με papilloma που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι HPV 16, 18, 45 και 31.

Σε αυτή την εργασία επικεντρωθήκαμε στον HPV 16, την κύρια αιτία πρόκλησης καρκίνου του τραχήλου. Η ογκογόνος δράση του ασκείται κυρίως από τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 οι οποίες ρυθμίζονται άμεσα από την LCR, έτσι είναι ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη της περιοχής. Ο ιός HPV μπορεί να βρίσκεται στο κύτταρο ξενιστή είτε σε επισωματική είτε σε ενσωματωμένη μορφή μαζί με το DNA του ξενιστή. Στην τελευταία περίπτωση, η ενσωμάτωση συμβαίνει συνήθως στην περιοχή του γονιδίου E2 έπειτα από θραύση του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μη φυσιολογική παραγωγή της E2 πρωτεΐνης η οποία είναι ένας πολύ σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας των E6 και E7 που ασκεί την δράση της μέσω της πρόσδεσης της στην LCR. Εκτός από την πρωτεΐνη E2, στην LCR προσδέονται μια μυριάδα από ρυθμιστικούς και μεταγραφικούς παράγοντες που διαφέρουν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά ανάλογα σε ποιο στάδιο του κύκλου βρίσκεται το κύτταρο ξενιστής.

Στην εργασία αυτή αρχικά πραγματοποιήθηκαν PCR στα δείγματα για επιβεβαίωση της ύπαρξης DNA έπειτα από την εκχύλιση. Η ενίσχυση της περιοχής LCR του ιού HPV 16 έγινε με την χρήση των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν για το σκοπό αυτό από το εργαστήριο μας. Αυτά τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν για να πιάνουν σωστά πάνω στο HPV 16 γένωμα για την ενίσχυση της LCR βάση της πρότυπης αλληλουχίας από το Genbank.

Έπειτα από την πραγματοποίηση μιας σειράς από PCR με διαφορετικές συνθήκες καταλήξαμε στις συνθήκες αυτές που έδιναν τα καλύτερα αποτελέσματα.

Κρίθηκε όμως αναγκαίο η διεξαγωγή Nested PCR στα προϊόντα αυτά καθώς και κλωνοποίηση σε ορισμένα δείγματα για να μπορέσουμε να ενισχύσουμε ικανοποιητικά την LCR. Παρόλα αυτά, παρατηρήσαμε ότι ορισμένες PCR δεν έδωσαν αποτέλεσμα για κάποια δείγματα. Έτσι δεν κατέστη δυνατό να πάρουμε ικανοποιητική ποσότητα DNA για την διαδικασία της εύρεσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να στείλουμε τα δείγματα αυτά για αλληλούχιση.

Μετά την εύρεση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της LCR των δειγμάτων, έγινε σύγκριση με το πρόγραμμα MEGA. Εδώ διαπιστώθηκε ότι η LCR των HPV 16 είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, με κάποια τμήματα να είναι πλήρως συντηρημένα μεταξύ όλων των δειγμάτων καθώς και με την πρότυπη αλληλουχία από το Genbank. Οι αλληλουχίες της LCR που παρουσιάζουν ομοιότητα 100% και πλήρη συντήρηση σε όλα τα δείγματα είναι αυτές των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2, YY1 και Tef-1. Οι αλληλουχίες πάνω στην LCR για την E2 είναι τέσσερις, πολύ συντηρημένες. Επίσης υπάρχουν έξι θέσεις πρόσδεσης του YY1 όπως και του Tef-1 αλλά δεν είμαστε σε θέση να προβλέψουμε ποιές από αυτές τις θέσεις προσδέουν τον ένα και ποιες τον άλλο παράγοντα μιας και υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των αλληλουχιών αυτών.

Γενικά από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, επιβεβαιώθηκαν ήδη προϋπάρχοντες παρατηρήσεις για τους HPV 16 παρόλο που φαίνεται να υπάρχουν μερικές διακυμάνσεις στον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης μερικών παραγόντων. Εδώ μπορούμε να σημειώσουμε την απόκλιση στην συχνότητα εμφάνισης ορισμένων θέσεων πρόσδεσης σε σχέση με κάποιες προηγούμενες μελέτες, παρόλο που τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμφωνούν με τη πρότυπη αλληλουχία.

Η παρούσα εργασία αποτελεί ένα μέρος μιας προσπάθειας κατανόησης του γενώματος καθώς και της δράσης των HPV 16 στην ανάπτυξη όγκων μέσω της χαρτογράφησης των πολλαπλών ρυθμιστών μεταγραφής στην LCR που αποτελεί το κέντρο ρύθμισης όλων των λειτουργιών του HPV. Με την κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας της LCR με την δράση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων σ' αυτή θα μπορούσε να καταστεί δυνατή η εύρεση τρόπων για την αποφυγή, καταστολή ή και θεραπεία των μορφών καρκίνου που οφείλονται στον ιό αυτό, επεμβαίνοντας στους μηχανισμούς που ευθύνονται για αυτό. Έτσι τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έρχονται να προστεθούν σε αυτά παρόμοιων εργασιών για να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τους HPV. Αυτό με

την σειρά του θα ενισχύσει την γνώση μας για καλύτερη αντιμετώπιση των ιών αυτών.

## 11. Βιβλιογραφία

1. Antonsson, A., and Hansson, B.G. (2002). Healthy skin of many species harbours papillomaviruses, which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76:12537-12542.
2. Antonsson, A., Erfurt, C., Hazard, K., Holmgren, V., Simon, M., Kataoka, A., Hossain, S., Hakangard., C, and Hansson, B.G. (2003). Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J. Gen. Virol.* 84:1881-1886.
3. Antonsson, A., Forslund, O., Ekberg, H., Sterner, G, and Hansson, B.G. (2000). The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomavirus suggest a commensalic nature of these viruses. *J. Virol.* 74:11636-11641.
4. Baker, T.S., Drak, J., and Bina, M. (1989). The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryo-electron-microscopy of simian virus 40. *Biophys. J.* 55:243-253.
5. Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson., and Brown, J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses: analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60:1445-1456.
6. Band, V., DeCaprio, J.A., Delmolino, L., Kulesa, V., and Sager, R. (1991). Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J. Virol.* 65:6671-6676.
7. Barbosa, M.S., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc binding proteins. *J. Virol.* 63:1404-1407.
8. Belnap, D.M., Olson, N.H., Cladel, N.M., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Kreider, J.W., Christensen, N.D., and Baker, T.S. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J. Mol. Bio.* 259:249-263.
9. Bornali B. and Sharmila S. (2005). HPV E2 gene disruption and polymorphism of E2 and LCR: Some significant associations with cervical cancer in Indian women.



10. Bosch F.X., Manos M.M., Munoz N., et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world wide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-36.
11. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3(5):1151–1157.
12. Bossis, I., Roden, R. B., Gambhira, R. et al. (2005) Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J. Virol.* 79, 6723–6731.
13. Bouvard V. Storey A., Pim D., and Banks L.: Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 1994;13:5451-5459.
14. Bravo IG, Alonso A (2004). "Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth". *J. Virol.* 78 (24): 13613–26.
15. Campo, M. S. (1995) Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends Microbiol.* 3, 92–97
16. Caspar, D.L.D., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 27:1-24.
17. Chan W.K., Chong T., Bernard H-U, Klock G., Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus type 16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 1990;18:763-9.
18. Chan W.K., Klock G, Bernard H-U: Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* 1989; 63:3261-3269.
19. Chan, S. Y., Bernard, H.U., Ong, C.K., Chan S.P, Hofmann, B., and Delius H. (1992). Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a show case for the molecular evolution of DNA vruses. *J. Virol.* 66:5714-5725.

20. Chan, S.Y., Delius, H., Halpern, A.L., and Bernard, H.U. (1995). Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 69:3074-3083.
21. Chang C.M., Dong G., Broker T.R., and Chow L.T. : Control of the human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J. Virol.* 1992; 66:5224-5231.
22. Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D., and Seeburg, P.H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299(5883):529–534.
23. Chen, X.S., Casini, G., Harisson, S.C., and Garcea R.L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: Purification and assembly of HPV11 and Hpv16 L1. *J. Nol. Biol.* 307:173-182.
24. Chin M. T., Broker T.R., and chow L.T.: Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for the human papilloma virus type 11 enhancer regulation. *J. Virol.* 1989; 63:2967-2977.
25. Chong T., Apt D., Gloss B., Isa M. and Bernard H-U: The enhancer of human papillomavirus 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol* 1991; 65:5933-5943.
26. Chong T., Chan W.K. and Bernard H-U: Transcriptional activation of human papillomavirus type 16 by nuclear factor 1, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF:a model for the composition of genital papillomaviruw enchancers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18:465-470.
27. Ciccolini, F., G. Di Pasquale, F. Carlotti, L. Crawford, and M. Tommasino. 1994. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 9:2633-2638.
28. Cid A. Auewarakul P. Garcia-Garranca A., Ovseiovich. R. Gaissert H., and Gissmann L.: Cell-tyoe-specific activity of the human papilloma virus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J. Virol.* 1993;67:6742-6752.

29. Clertant, P. and Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 311:276-279.
30. Conrad, M., Bubb, V.J., and Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67:6170–6178.
31. Crawford, L.V. (1969). Nucleic acids of tumor viruses. *Adv Virus Res* 14:89–152.
32. Cripe T.P., Haugen T.H., Turk J.P., Tabatabai F, Schmid P.G., Durst M., Gissmann L., Roman A. and Turek L.: Transcriptional regulation of the human papilloma virus 16 E6-E7 promoter by a keratinocyte dependent enhancer, and by viral E2 transactivator and repressor gene products: implications for carcinogenesis. *EMBO J.* 1987;6:3745-3753.
33. Culp, T.D., and Christensen, N.D. (2004). Kinetics of *in vitro* adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319:152–161.
34. Culp, T.D., Budgeon, L.R., Marinkovich, M.P., Meneguzzi, G., and Christensen, N.D. (2006b). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J. Virol.* 80:8940–8950.
35. Cuthill S. Sibbet GJ and Campo MS: Characterization of a nuclear factor , papillomavirus enhancer binding factor-1, that binds the long control region of human papillomavirus type 16 and contributes to enhancer activity. *Mol. CCarcinog.* 1993; 8:96-104.
36. Danos, O., Engel, L.W., Chen, E.Y., Yaniv, M., and Howley, P.M. (1983). Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J. Virol.* 46(2):557–566.
37. Danos, O., Katinka, M., and Yaniv, M. (1982). Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *Embo. J.* 1(2):231–236.
38. Das B.C, Sharma J.K., Gopalkrishna V, Luthra U.K. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992;73:2327-36.

39. Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1998) The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1 and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**, 142–150.
40. Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101:14252–14257.
41. Day, P.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307:1–11.
42. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004, 324(1):17-27.
43. Degenhardt, Y.Y., and Silverstein, S.J. (2001b). Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **75**:151–160.
44. del Mar Pena, L.M., and Laimins, L.A. (2001). Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J. Virol.* **75**:10005–10013.
45. Dell, G., and K. Gaston. 2001. Contributions in the domain of cancer research: review of human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:803-808.
46. Dell, G., Wilkinson, K. W., Tranter, R., Parish, J., Leo Brady, R. and Gaston, K. (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol.Biol.* **334**, 979-991.
47. Demeret C., Yaniv M., and Thierry F.: The E2 transcriptional repressor can compensate for SP1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* 1994;**68**:7075-7082.
48. Doorbar John, (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science.* **110**. 525-541.

49. Doorbar, J. and Gallimore, P. H. (1987) Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus type 1a. *J. Virol.* **61**, 2793–2799.
50. Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. and Crawford, L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature (London)* **352**, 824–827.
51. Dostatni N., Lambert P.F., Sousa R., Ham J., Howley P.M., and Yaniv M. The functional BPV-1 E2 tansactivating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 1991;5:1657-1671.
52. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**(12):3812–3815.
53. emedicine (www.emedicine.com).
54. Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Mei Qi, Y., Hengst, K. and McMillan, N. A. J. (1997) Identification of the  $\alpha 6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**, 2449–2456.
55. Farmer, A.D., Calef, C.E., Millman, K., and Myers, G.L. (1995). The human papillomavirus database. *J. Biomed. Sci.* **2**:90-104.
56. Fay, A., Yutzy, W. H. T., Roden, R. B. and Moroianu, J. (2004) The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J. Virol.* **78**, 13447–13454.
57. Figge, J., Webster, T., Smith, T.F., and Paucha, E. (1988). Prediction of similar transforming regions in Simian virus 40 large T, adenovirus E1A and myc oncoproteins. *J. Virol.* **62**:1814–1818.
58. Fiona J., Hughes and Michael A., Romanos(1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research.* **25** 5817-5823.



59. Flores, E. R., and P.F. Lambert. 1997. Evidence for a switch in the mode of human papilloma virus 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* 71:7167-7179.
60. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. and Sapp, M. (2002) Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 76, 10009–10014.
61. Foster, S.A., and Galloway, D.A. (1996). Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene* 12:1773–1779.
62. Fraiser, LD *et al* (1994) "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360.
63. Garcea, L. Robert, and Xiaojiang Chen, 2007. Papillomavirus structure and assembly.
64. Garcia-Carranca A., Thierry F. and Yaniv M: Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 1988;62: 4321-4330.
65. Gloss B. and Bernard H.U.: The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J. Virol.* 1990;64:5577-5584.
66. Gloss B., Bernard H-U, Seedorf K and Klock G:Th e upstream regulatory region of human papillomavirus-16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987; 6:3735-3743.
67. Gloss B., Chong T., and Bernard H.U.: Numerous nuclear proteins bind to the long control region of human papilloma virus type 16: A subset of 6 of 23 DNaseI-protected segments coincides with the location of the cell-type-specific enhancer. *J. Virol.* 1989; 63:1142-1152.
68. Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K.U., and Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line

- containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J. Virol.* 70:2339–2349.
69. Gretchen Eiben Lyons, Michael I. Nishimura, and W. Martin Kastl. Cell-Mediated Immune Responses to Human Papillomavirus.
70. Grossman, S.R., and Laimins, L.A. (1989). E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 4:1089–1093.
71. Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65:473–478.
72. Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A. (1992). The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J. Virol.* 66:2125–2134.
73. Han, Y., Loo, Y.M., Militello, K.T. and Melendy, T. (1999). Interactions of the papillomavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J. Virol.* 73, 4899-4907.
74. Hans Ulrich Bernard. Phylogeny and Typing of Papillomaviruses.
75. Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8:3905–3910.
76. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2005. Human papilloma viruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16:83-97.
77. Ho, G.Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J., and Burk, R.D. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 338:423–428.
78. Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Icenogle, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara, P., Labropoulou, V., Mitrani-Rosenbaum, S., Norrild, B., Pillai, M.R., Stoerker, J., Syrjaenen, K., Syrjaenen, S., Tay, S.K., Villa, L.L., Wheeler, C.M., Williamson, A.L., and Bernard, H.U. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of

- reconstructing prehistoric viral spread and movement of ancient human populations. *J. Virol.* 67:6413-6414.
79. Howley, P.M., Lowy, D.R. (2001). Papillomaviruses and their replication. In P.M. Howley (ed.): *Virology*, vol. 2. Philadelphia, PA: Lippincott/The Williams & Wilkins Co, pp. 2197–2229.
80. Hudson, J.B., Bedell, M.A., McCance, D.J., and Laimins, L.A. (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes *in vitro* by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 64:519–526.
81. Huh, K.W., DeMasi, J., Ogawa, H., Nakatani, Y., Howley, P.M., and Munger, K. (2005). Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:11492–11497.
82. Hummel, M., Hudson, J.B., and Laimins, L.A. (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070–6080.
83. Ishiji T., Lace M., Parkkinen S., et al. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J* 1992;11:2271081.
84. Jeon S, Allen-Hoffmann B.L., Lambert P.F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with selective growth advantage of cells. *J. Virol.* 1995;69:2989-97.
85. Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T. et al. (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 5810–5822.
86. Kanda, T., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1988). Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol.* 62:610–613.

87. Khare S., Pater M.M., Tang S.C., Pater A. Effect of glucocorticoid hormones on viral gene expression, growth, and dysplastic differentiation in HPV 16-immortalized ectocervical cells. *Exp Cell Res* 1997;232:353-60.
88. Knappe, M., Selinka, H.-C., Bodevin, S., Spillman, D., Streeck, R.E., Chen, X.S., Lindahl, U., and Sapp, M. (2006). Surface-exposed amino acids of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. (submitted for publication).
89. Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Richardson H, Coutlee F, Canadian Women's HIV Study Group: Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol* 2001;39:3530–3536.
90. Kyo S., Inoue M., Nishio Y., Nakanishe K., Akira S., Inoue H., Yutsudo M., Tanizawa O. and Hakura A: NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the non coding region. *J. Virol.* 1993; 67:1058-1066.
91. Lambert, P.F. (1991). Papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* 65:3417–3420.
92. Laura Sichero, Silvaneide Ferreira, Helen Trottier, Elian Duarte-Franco, Alex Ferenczy, Eduardo Luis Franco and Luisa Lina Villa. *Int. J. Cancer*: 120, 1763-1768 (2007) High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18.
93. Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L, and Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.4- Å resolution. *Nature* 354:278-284.
94. Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparin sulfate. *J. Biol. Chem.* 273:24979–24982.
95. Liu, X., Clements, A., Zhao, K., and Marmorstein, R. (2006). Structure of the human papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 281:578–586. Xi L. F., Demers, G. W., Koutsky, L.A. et al. (1995) Analysis of human papillomavirus type 16 variantw indicate establishment of persistent infection. *J. Infect. Dis.* 172, 747-755.

96. Londesborough P, Ho L, Terry G., Cuzick J., Wheeler C.M., Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996;69:364-8.
97. Loo, Y.M. and Melendy, T. (2004) Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* 78, 1605-1615.
98. Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. D. and Kurman, R. J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.* 79, 328–337.
99. Louise T. Chow and Thomas R. Broker. Human Papillomavirus Transcription.
100. Madison, K. C. (2003) Barrier function of the skin: ‘la raison d’etre’ of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 231–241.
101. Mark O’Connor, Shih-Yen Chan, and Hans-Ulrich Bernard (1995). Transcriptional factor binding sites into the Long Control Region of HPVs.
102. Matsukura, T., and Sugase, M. (2001). Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology* 283:139-147.
103. McIntyre, M.C., Frattini, M.G., Grossman, S.R., and Laimins, L.A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* 67:3142–3150.
104. McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H. and Evander, M. (1999) Expression of the  $\alpha 6$  integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**, 271–279.
105. Megan B. Bestul (2003). New advances in the prevention of cervical cancer: HPV type 16 vaccine. *PharmD Special to Infectious Disease News*.
106. Meisels, A. and Morin, C. (1981). Human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 12:S111–S123.
107. microbiologybytes (www.microbiologybytes.com).



108. Mietz, J.A., Unger, T., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M. (1992). The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 oncoprotein. *EMBO J.* 11:5013–5020.
109. Modis, Y., Trus, B.L., and Harisson, S.C., (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21:4754-4762.
110. Muller, M., Zhou, J., Reed, T.D., Rittmuller, C., Burger, A., Gabelsberger, J., Braspenning, J., and Gissmann, L., (1997). Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* 234:93-111.
111. Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., and Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4417–4421.
112. Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., and Howley, P.M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099–4105.
113. Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, C.J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:518–527.
114. Nakatani, Y., Konishi, H., Vassilev, A., Kurooka, H., Ishiguro, K., Sawada, J., Ikura, T., Korsmeyer, S.J., Qin, J., and Herlitz, A.M. (2005). p600, a unique protein required for membrane morphogenesis and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:15093–15098.
115. Narayanan S., Abraham P., Peedicayil A, et al. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. *Gynecol Oncol* 2004;95:363-9.
116. O'Connor M.J., Bernard H-U. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element. *Virology* 1995;207:77-88.

117. O'Connor M.J., Stunkel W., Zimmerman H., Koh C.H., Bernard H-U. A novel YY1-independent silencer represses the activity of human papillomavirus type 16 enhancer. *J. Virol* 1998;72:10083-92.
118. O'Connor M.J., Tan S.H., Tan C.H., Bernard H-U. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol* 1996;70:6529-39.
119. Ong, C.K., Chan, S.Y., Campo, M.S., Fujinaga, K., Mavromara, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S.K., ter Meuler, J., Villa, L.L., and Bernard, H.U. (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* 67:6424-6431.
120. Ozbun, M. A. (2002). Infectious human papillomavirus type 31b: Purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *J. Gen. Virol.* 83:2753–2763.
121. P. Tosi , V. Pallini, M. Contorino , M. Bugnoli, A. Covacci, R. Petracca, S. Syrjanen, M. T. Del Vecchio , R. Mantyjarvi , P. Ruggiero, D. Armellini, F. Chang, K. Syrjanen (1992). Use of Antibodies Against A Synthetic Peptide of the E6 Protein of Human Papillomavirus (Hpv) Type 16 For the Diagnosis of Genital Hpv Lesions.
122. Paintsil, J., Muller, M., Picken, M., Gissmann, L., and Zhou, J. (1996). C-terminal terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology* 223:238-244.
123. Park, R.B., and Androphy, E.J. (2002). Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J. Virol.* 76:11359–11364.
124. Patterson, N. A., Smith, J. L. and Ozbun, M. A. (2005). Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol.* 79, 6838–6847.
125. Peto J., Gilham C., Fletcher O. and Matthews F.E. (2004). The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 364, 249-256.

126. Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K., and Howley, P.M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a. *Cell* 53:539–547.
127. Remmink, A.J., Walboomers, J.M., Helmerhorst, T.J., Voorhorst, F.J., Rozendaal, L., Risse, E.K., Meijer, C.J., and Kenemans, P. (1995). The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int. J. Cancer* 61:306–311.
128. Romanczuk H., Howley P.M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3159-63.
129. Romanczuk H., Thierry F., and Howley P.M.: Mutationnal analysis of cis-responsive elements involved in E2 modulation of the human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* 1990;64:2849-2859.
130. Rous, P., and Beard, J. (1935). The progression to carcinoma of virus induced rabbit papillomas (Shope). *J. Exp. Med.* 2:523–545.
131. Russel J. and Botchan M.R.: Cis-acting components of human papilloma virus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J. Virol.* 1995;69:651-660.
132. Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Viestra, and P. M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase In the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
133. Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C., and Howley, P.M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5523–5527.
134. Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129–1136.
135. Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., Glass, A.G., Cadell, D.M., Rush, B.B., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J., and Wacholder, S., (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:958–964.

136. Schlecht, N.F., Platt, R.W., Negassa, A., Duarte-Franco, E., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L., and Franco, E.L. (2003). Modeling the time dependence of the association between human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions. *Am. J. Epidemiol.* 158:878–886.
137. Schwarz, E., Durst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfsperger, E., Suhai, S., and zur Hausen, H. (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.* 2(12):2341–2348.
138. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314(6006):111–114.
139. Sen, E., Alam, S., and Meyers, C. (2004). Genetic and biochemical analysis of cis regulatory elements within the keratinocyte enhancer region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle. *J. Virol.* 78:612–629.
140. Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K. and Kirnbauer, R. (2003) Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol.* 77, 13125–13135
141. Shope, R.E. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits (with a note on the histopathology by E. W. Hurst). *J. Exp. Med.* 58:607–624.
142. Sibbet G.J. and Campo M.S: Multiple interactions between cellular factors and the non coding region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 1990; 71:2699-2707.
143. Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. and Beard, P. (1998) Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J. Mol. Biol.* 283, 529–536.
144. Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y., and Harrison, S.C. (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4:165-182.
145. Stenlund A. (1991). DNA of Papillomaviruses Springer US.
146. Stewart, A.C., Eriksson, A.M., Manos, M.M., Munoz, N., Bosch, F.X., Peto, J., and Wheeler, C.M. (1996). Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J. Virol.* 70:3127-3136.

147. Stone, K.M. (1995). Human papillomavirus infection and genital warts: update on epidemiology and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 20(Suppl. 1):S91–S97.
148. Stone, R.S., Shope, R.E., and Moore, D.H. (1959). Electron microscope study of the development of the papilloma virus in the skin of the rabbit. *J. Exp. Med.* 110:543-546.
149. Stubenrauch, F., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 9:379–386.
150. Suzanne M. Garland, Sepehr Tabrizia (2006). Methods for HPV Detection: Polymerase Chain Reaction Assays. Monsonego J. Science to Practice pp 63-72.
151. Sverdrup F. and S.A. Khan: Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J. Virol.* 1995;69:1319-1323.
152. Syverton, J.T. (1952). The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence. *Ann. N Y Acad. Sci.* 54(6):1126–1140.
153. Syverton, J.T., and Berry, G.P. (1935). Carcinoma in the cottontail rabbit following spontaneous virus papilloma (Shope). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 33:399–400.
154. Tan S.H., Leong L.E.C., Walker P.A., and Bernard H.U., The human papillomavirus type 16 transcription factor E2 binds with low cooperativity to two flanking binding sites and represses the E6 promoter by displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 1994;68:6411-6420.
155. The American Journal of The Medical Sciences (AJMS), Lippincott Williams and Wilkins.
156. Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:8449–8454.
157. University of Cambridge ([www.cam.ac.uk](http://www.cam.ac.uk)).
158. Ustav, M., and Stenlund, A. (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* 10:449–457.



159. van Ranst, M., Kaplan, J.B., and Burk, R.D. (1992). Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J. Gen. Virol.* 73:2653-2660.
160. Vousden, K.H., Doninger, J., DiPaolo, J.A., and Lowy, D.R. (1988). The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res.* 3:167–175.
161. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12–19.
162. Wang, Q., Griffin, H., Southern, S. et al. (2004) Functional Analysis of the human papillomavirus type 16 E1<sup>E4</sup> protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament re-organisation. *J. Virol.* 78, 821–833.
163. Washington University, 2009 ([www.pathology.washington.edu](http://www.pathology.washington.edu)).
164. Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76–79.
165. Wikipedia, 2008 ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).
166. Williams, M.G., Howatson, A.F., and Almeida, J.D. (1961). Morphological characterization of the virus of the human common wart (verruca vulgaris). *Nature* 189:895–897.
167. World Health Organization (2004). Incidence of HPV 2004. [who.int/vaccines](http://who.int/vaccines) Immunization, Vaccine and Biologicals.
168. Wu, X., Xiao, W., and Brandsma, J.L. (1994). Papilloma formation by cottontail rabbit papillomavirus requires E1 and E2 regulatory genes in addition to E6 and E7 transforming genes. *J. Virol.* 68:6097–6102.
169. Yutsudo, M., Okamoto, Y., and Hakura, A. (1988). Functional dissociation of transforming genes of human papillomavirus type 16. *Virology* 166:594–597.
170. Zhang, P., Nouri, M., Brandsma, J. L., Ifner, T. and Steinberg, B. M. (1999) Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 263, 388–394.

171. Zhao, K. N., Hengst, K., Liu, W. J. et al. (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* **272**, 382–393.
172. zur Hausen, H. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* **78**, 1-30 (1977).
173. zur Hausen, H., de Villiers, E.M., and Gissmann, L. (1981). Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol. Oncol.* **12**:S124–S128.
174. zur Hausen: Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1288**(2):F55-78.

