

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»



ΜΠΛΕΤΣΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΤΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ
ΤΟΥ ΗΡV16 ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**« Χαρτογράφηση και ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης του
hpv16 στο κυτταρικό γονιδίωμα »**

**« Genetic mapping and analysis of hpv16 integration sites in the
human genome »**



Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης:

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

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

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

Περίληψη

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPVs) είναι μικροί, δίκλωνοι, κυκλικοί DNA ιοί άνευ εξωτερικού περιβλήματος. Προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος ή του βλεννογόνου και συνδέονται στενά με την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η «επίμονη» μόλυνση από HPV-16 σχετίζεται με την ενσωμάτωση του HPV-16 DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα, που οδηγεί σε γενωμική αστάθεια του κυττάρου ξενιστή και τελικά σε καρκίνο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των θέσεων ενσωμάτωσης του HPV-16 στο DNA του ξενιστή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας που απομονώθηκαν από τον ελληνικό πληθυσμό, θετικά για μόλυνση με τον ιό. Με χρήση της μεθόδου RS-PCR εντοπίστηκαν φαινόμενα αναδιάταξης στην αλληλουχία του HPV-16 σε δείγματα προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων. Οι αναδιαταγμένες αλληλουχίες περιλάμβαναν τη σύνδεση τμημάτων ιικού DNA μη γειτονικών γονιδίων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικά πρότυπα αναδιάταξης μεταξύ των γονιδίων E1 και L1 και των γονιδίων E2 και L1, αντίστοιχα. Τέλος, προτάθηκε ένα πιθανό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο δημιουργούνται αλυσομερή HPV-16 DNA – κυτταρικού DNA κατά την ενσωμάτωση, το οποίο οδηγεί στη συνένωση διαφορετικών τμημάτων του ιικού γονιδιώματος με αντιπαράλληλο προσανατολισμό.

Συμπερασματικά, προτείνεται ότι ο εντοπισμός φαινομένων αναδιάταξης του HPV-16 DNA, ίσως να αποτελέσει ένα σημαντικό μοριακό δείκτη που μπορεί να προβλέψει την παρουσία χρωμοσωμικών αλλαγών και την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από χαμηλού βαθμού σε υψηλού βαθμού και κατ' επέκταση σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Abstract

Human Papillomaviruses (HPVs) are small, non-enveloped, double stranded, circular DNA viruses that infect cutaneous and mucosal epithelia. Persistent HPV-16 infection is associated with HPV-16 DNA integration, which leads in genomic instability of the host cell and eventually in cervical cancer.

The present report investigated the integration sites of HPV-16 and the presence of rearranged sequences of HPV-16 DNA in precancerous and cervical cancer cases through RS-PCR. The rearranged sequences encompass the conjunction of non-contiguous viral fragments with inverted orientation. Two distinct rearranged sequence motifs were identified, which concern the conjunction of E2 and L1 genes and the conjunction of E1 and L1 genes with inverted orientation, respectively. Finally, a model of “loop” was proposed by which viral-host concatemers are generated during HPV-16 integration leading to the conjunction of distinct regions of HPV-16 genome with inverted orientation.

In conclusion, we suggest that the detection of rearranged sequences of HPV-16 genome in clinical samples might constitute significant markers for the presence of chromosomal damages and for the progression of cervical malignancy to cancer.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1.....	8
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	8
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών.....	9
1.3. Δομή των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPVs).....	11
1.3.1. Δομή του καψιδίου.....	11
1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος.....	13
1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1.....	14
1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2.....	15
1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4.....	17
1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5.....	18
1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6.....	19
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7.....	21
1.5. Μορφή του γονιδιώματος.....	24
1.6. Θέσεις ενσωμάτωσης.....	26
1.7. Κύκλος ζωής των HPVs.....	27
1.7.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	27
1.7.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	28
1.7.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	29
1.7.4. Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση.....	30
1.8. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	30

Κεφάλαιο 2	32
2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Κλινικά δείγματα.....	32
2.2. Εκχύλιση DNA.....	34
2.2.1. Εκχύλιση DNA (ThinPrep).....	34
2.2.2. Εκχύλιση DNA (Τραχηλικός ιστός μονιμοποιημένος σε παραφίνη).....	35
2.2.3. Έλεγχος της εκχύλισης.....	35
2.3. Προσδιορισμός της θέσης ενσωμάτωσης του HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα.....	36
2.3.1. RS-PCR.....	36
2.3.2. Nested RS-PCR.....	37
2.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RS-PCR.....	38
2.5. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης.....	38
2.6. Μοριακή κλωνοποίηση.....	39
2.6.1. Αντίδραση της τοποϊσομεράσης.....	39
2.6.2. Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων.....	39
2.6.3. Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.....	40
2.7. Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	41
2.8. Επιβεβαίωση των αναδιατάξεων του HPV-16 DNA.....	41
Κεφάλαιο 3	43
3. Αποτελέσματα	43
3.1. Ανάλυση αλληλουχιών.....	43
3.2. Φαινόμενο αναδιάταξης γονιδίων E2 και L1.....	43
3.3. Φαινόμενα αναδιάταξης γονιδίων E7, E1 και L1.....	44
3.4. Επιβεβαίωση των αναδιαταγμένων αλληλουχιών.....	46

3.5. Φαινόμενο αναδιάταξης γονιδίων E2 και L1 στην καρκινική κυτταρική σειρά CaSki.....	46
3.6. Ανάλυση αποτελεσμάτων ενίσχυσης του D59.....	47
Κεφάλαιο 4.....	48
4. Συζήτηση.....	48
4.1. Ενσωμάτωση του HPV-16 DNA.....	48
4.2. Φαινόμενα αναδιάταξης του HPV-16 DNA.....	48
4.3. Πιθανό μοντέλο δημιουργίας αναδιαταγμένων αλληλουχιών.....	49
Κεφάλαιο 5.....	52
5. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	52

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Οι ιοί των Θηλωμάτων – Papillomaviruses (PVs) συνιστούν μια ομάδα DNA ιών, οι οποίοι προκαλούν καλοήθεις αλλοιώσεις του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών των ανθρώπων και ορισμένων ζώων. Ανήκουν στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV) εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV) και οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι (de Villiers, 2013, Van Doorslaer, 2013).

Η μολυσματική φύση των δερματικών θηλωμάτων ήταν γνωστή στους αρχαίους Έλληνες και στους Ρωμαίους. Μέχρι τον 19^ο αιώνα, θεωρούσαν ότι ήταν μια μορφή σύφιλης ή γονόρροιας. Η ιική φύση των ανθρώπινων θηλωμάτων εξακριβώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1900, όταν οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν από έναν ασθενή σε έναν άλλο (Ciuffo G., 1907).

Στη συνέχεια, οι Papilloma ιοί αναγνωρίστηκαν σε μια ποικιλία σπονδυλωτών, εκτός από τον άνθρωπο. Το πρώτο ζώο – ξενιστής των PVs ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1930 από τον Richard Shope και ήταν το κουνέλι. Ο ιός Shope Papillomavirus, πλέον γνωστός ως CRPV (cottontail rabbit papillomavirus), ήταν ο πρώτος ογκογόνος DNA ιός που απομονώθηκε και προκαλούσε κονδυλώματα στα κουνέλια, που έμοιαζαν με «κέρατα» (Shope and Hurst, 1933).

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και η έλευση της μοριακής κλωνοποίησης τη δεκαετία του 1970, έδωσαν ώθηση για την περαιτέρω μελέτη των Papilloma ιών. Η πιθανή συσχέτιση των κονδυλωμάτων με την ανάπτυξη καρκίνου στα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος υποδείχθηκε το 1972 στην Βαρσοβία από την Stefania Jablonska (Jablonska et al., 1972). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1976, ο ιολόγος Harald zur Hausen πρότεινε ότι η κύρια αιτία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ήταν οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (Human Papillomaviruses, HPVs).

Παράλληλα άλλοι ερευνητές που μελετούσαν διαφορετικούς τύπους των PVs, κατάφεραν να αλληλουχίσουν ολόκληρο το γονιδίωμα ενός βόειου ιού των Θηλωμάτων (BPV-1) το 1982 (Chen et al., 1982). Ακολούθησε η διετία 1983 – 1984 όταν ο zur Hausen, με τη βοήθεια των συνεργατών του, απομόνωσε από καρκινικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας τα πρώτα στελέχη HPV-16 και HPV-18 (Boshart et al., 1984, Gissman et al., 1984). Το 2008 τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής για την έρευνα αυτή.

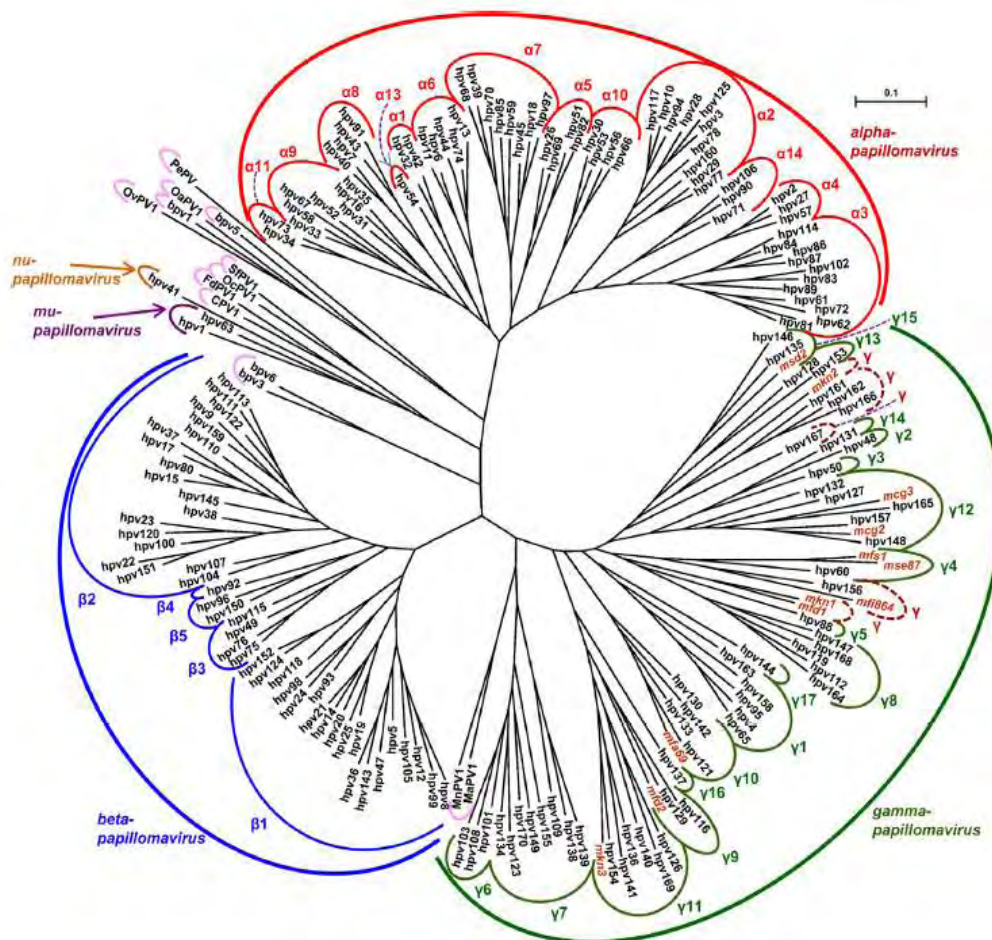
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Οι Papilloma ιοί αποτελούν μια αρκετά ετερογενή ομάδα ιών, οι οποίοι προσβάλλουν κυρίως το επιθήλιο των σπονδυλωτών και διαθέτουν δίκλωνο κυκλικό DNA, μεγέθους περίπου 8000 ζευγών βάσεων. Αρχικά είχαν ομαδοποιηθεί μαζί με τους Polyoma ιούς στην μεγάλη οικογένεια των *Papovaviridae*, λόγω του γεγονότος ότι διαθέτουν όμοια, άνευ περιβλήματος καψίδια και παρόμοιας μορφής γονιδιώματα (κυκλικό, δίκλωνο DNA). Αργότερα, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) αναγνώρισε ότι οι δύο παραπάνω ομάδες ιών έχουν εντελώς διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, εντελώς διαφορετική οργάνωση των γονιδιωμάτων τους και καμία ουσιώδους νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία. Συνεπώς, διαχώρισε την οικογένεια των *Papovaviridae* σε δύο ξεχωριστές οικογένειες, την οικογένεια των *Papillomaviridae* και αυτή των *Polyomaviridae* (de Villiers et al., 2004).

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμες κυτταρικές σειρές διαφοροποιούμενων επιθηλιακών κυττάρων ώστε να καλλιεργηθούν οι Papilloma ιοί, η ταξινόμησή τους βασίστηκε εξ ολοκλήρου στον προσδιορισμό του γενοτύπου και όχι του οροτύπου του ιού. Συγκεκριμένα, η ταξινόμηση των Papilloma ιών βασίζεται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1, διότι είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο. Ένας νέος τύπος PV ορίζεται εφόσον διαφέρει η αλληλουχία του γονιδίου L1 κατά 10% από τους ήδη γνωστούς τύπους των υπόλοιπων PVs, ενώ διαφορές 2%-10% ορίζουν έναν υπότυπο, καθώς και διαφορές μικρότερες από 2% ορίζουν μία παραλλαγή (de Villiers et al., 2004, Bernard et al., 2010).

Η ονοματολογία των ιών αυτών προέρχεται από το ελληνικό αλφάβητο και η οργάνωση των PVs διακρίνεται σε δεκαέξι γένη, από το γράμμα Άλφα (α) μέχρι το γράμμα Πι (π), με βάση την εξελικτική θεώρηση. Όλα τα μέλη ενός γένους εμφανίζουν ομοιότητα 60% στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του L1 γονιδίου. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υποτύπους και παραλλαγές (Εικόνα 1.1.).

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPVs) ομαδοποιούνται σε πέντε γένη (Άλφα-, Βήτα-, Γάμμα-, Μι-, και Νι-PVs) (Εικόνα 1.1.), με βάση το διαφορετικό βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που προκαλούν, καθώς και διαφορετικά χαρακτηριστικά στον κύκλο ζωής τους και την ανάλυση του γονιδιώματός τους (de Villiers et al., 2004, Doorbar et al., 2006, Bernard et al., 2010).



Εικόνα 1.1. Φυλογενετικό δέντρο 170 HPVs και κάποιων PVs που προσβάλλουν τα ζώα. Το δέντρο βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 και κατασκευάστηκε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 5.1 (de Villiers, 2013).

Ανάλογα με τον επιθηλιακό τροπισμό τους, οι HPVs διαχωρίζονται σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δεύτεροι διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk), με βάση το κακοήθες δυναμικό τους (Πίνακας 1.1.) (Bzhalava et al., 2013). Σύμφωνα με την Παγκόσμια Αρχή της Έρευνας στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση καρκινικών αλλοιώσεων. Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι ο HPV-16, ο οποίος είναι ο πιο συχνά ανιχνεύσιμος τύπος σε κάθε βαθμό ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας (Bzhalava et al., 2013).

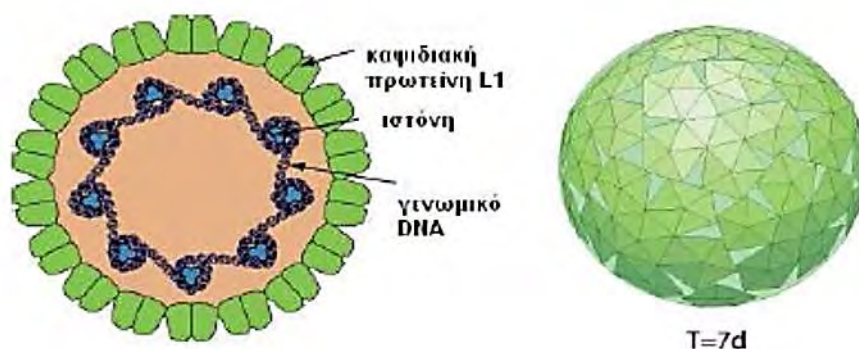
Ομάδες Επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση των HPVs σε ομάδες επικινδυνότητας (Bzhalava et al., 2013) και IARC.

1.3. Δομή των Ανθρώπινων Papilloma ιών (HPVs)

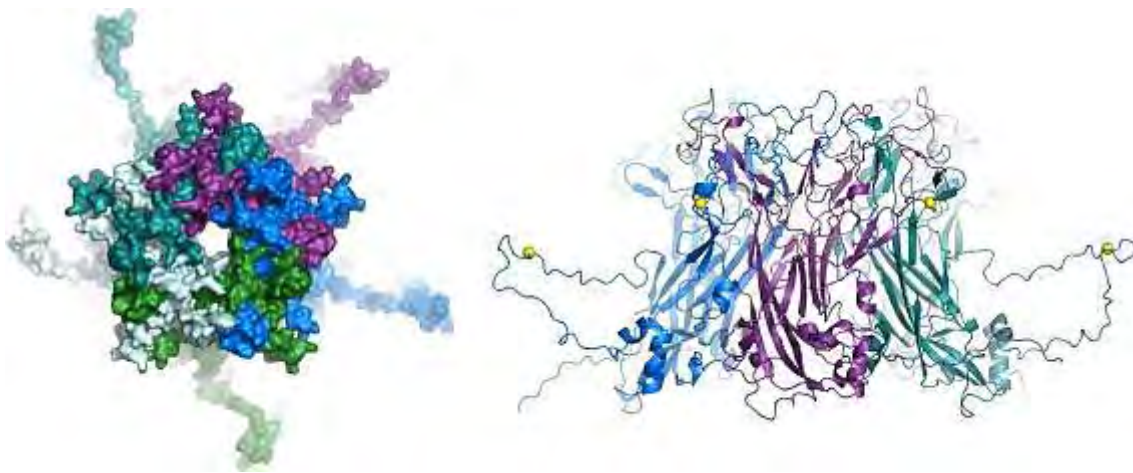
1.3.1. Δομή του καψιδίου

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων είναι μικροί, άνευ περιβλήματος DNA ιοί, διαμέτρου 55-60nm, οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Το γονιδίωμα των HPVs εσωκλείεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο που συντίθεται από τις πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες μεταφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου μόλυνσης του ιού (Doorbar et al., 2012). Η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του ιού αποκάλυψε ότι η εξωτερική επιφάνεια των ιοσωματίων των HPVs αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 και σχηματίζει T=7d εικοσαεδρικά καψίδια (Εικόνα 1.2.) (Baker et al., 1991).



Εικόνα 1.2. Δομή του καψιδίου των HPVs.

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1, μοριακού βάρους 55kDa, σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου και μεσολαβεί στην αρχική προσκόλληση του ιού στον ξενιστή. Αμέσως μετά την κυτταρική προσκόλληση, η L1 συμβάλλει στην απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η εξωτερική επιφάνεια των HPV ιοσωματίων φέρει 72 πλαϊνές προεξοχές που συντίθενται από πενταμερή της πρωτεΐνης L1. Το N-τελικό και το C-τελικό άκρο της L1 διευθετούνται ως προεξέχουσες θηλιές, οι οποίες σχηματίζουν τον χώρο μεταξύ των πενταμερών (Εικόνα 1.3.). Μεταξύ των γειτονικών πενταμερών δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός, ο οποίος προσδίδει σταθερότητα στο καψίδιο (Modis et al., 2002, Wolf et al., 2010, Buck et al., 2013).

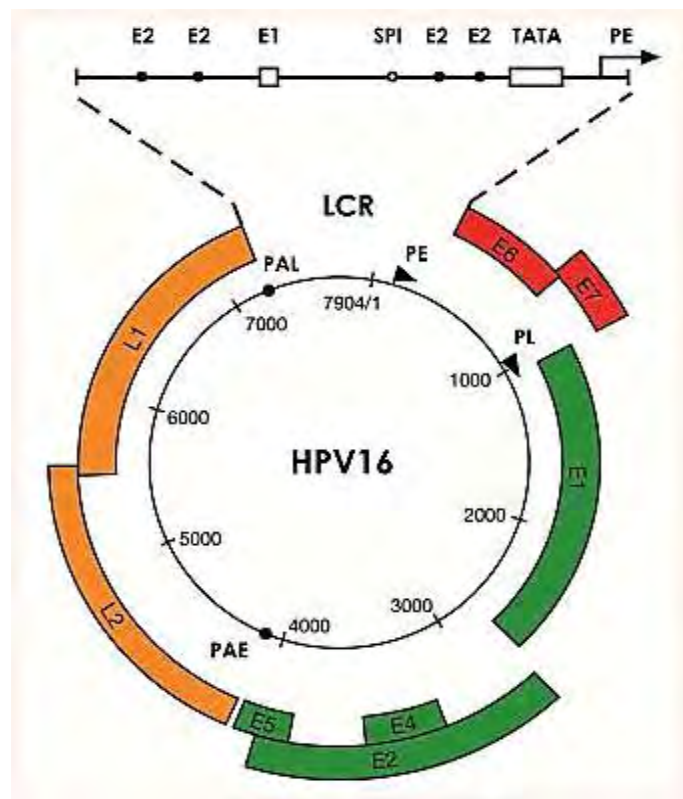


Εικόνα 1.3. Δομή ενός L1 πενταμερούς. Καθεμία L1 αλυσίδα παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η όψη ενός L1 πενταμερούς από την κορυφή. Διακρίνονται ξεκάθαρα οι αλληλοεμπλεκόμενες θηλιές των L1 πενταμερών. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο γειτονικών πενταμερών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί απεικονίζονται ως κίτρινες σφαίρες (Buck et al., 2013).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2, μοριακού βάρους 55kDa, συναντάται εσωτερικά του σκελετού της L1 και εξέρχεται του καψιδίου κατά την διαδικασία της εισόδου του ιού στο κύτταρο (Day et al., 2004, 2008). Σε αντίθεση με την L1, η πρωτεΐνη L2 αδυνατεί να αυτοσυγκροτηθεί ώστε να δημιουργήσει κενά ιοσωμάτια (virus-like particles, VLPs) (Kirnbauer et al., 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται με την L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της. Το αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι να εισέλθει η L2 στο κέντρο του L1 πενταμερούς (Finnen et al., 2003). Η βασικότερη λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις ιικές πρωτεΐνες L1 και E2 κατά τη συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων (Day et al., 1998, Florin et al., 2002, Buck et al., 2004, Wang and Roden, 2013). Συμμετέχει επίσης στη διαδικασία της εισόδου του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, καθώς και στην απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου (Wang and Roden, 2013).

1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονιδίωμα των HPVs είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 8000bp. Η οργάνωση του γονιδιώματος είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Ειδικότερα, το γονιδίωμα του HPV-16 διακρίνεται σε τρεις κύριες περιοχές: την πρώιμη (early, E), την όψιμη (late, L) και την ρυθμιστική περιοχή (long control region, LCR) (Εικόνα 1.4.).



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος του HPV-16 (Doorbar et al., 2012).

Η πρώιμη περιοχή είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του ιού, συμπεριλαμβανομένων των ιικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την έναρξη της ιικής αντιγραφής. Διακρίνεται σε έξι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs): E1, E2, E4, E5, E6 και E7, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η όψιμη περιοχή διακρίνεται σε δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης: L1 και L2, τα οποία κωδικοποιούν τις καψιδιακές πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο στα παραγωγικά μολυσμένα κύτταρα (Baker and Howley, 1987). Η ρυθμιστική περιοχή LCR, μήκους 850bp, δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη. Εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L1 και πριν την αρχή του γονιδίου E6. Η περιοχή αυτή περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και θέσεις πρόσδεσης σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. SP1, AP1, Oct1) (Bernard, 2013).

Στο γονιδίωμα του HPV-16 υπάρχουν δύο κύριοι υποκινητές, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του. Ο υποκινητής PE (early promoter, ή αλλιώς p97), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και ο υποκινητής PL (late promoter, ή αλλιώς p670), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων. Στην εικόνα 1.4. παρουσιάζονται οι ανωτέρω υποκινητές στις θέσεις 97 και 670. Οι περιοχές που επισημαίνονται ως PAE και PAL υποδηλώνουν τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης, αντίστοιχα (Doorbak et al., 2012).

1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

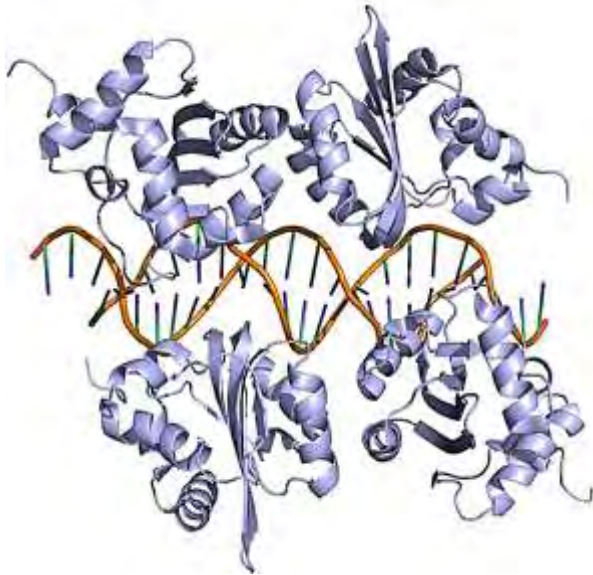
Η πρωτεΐνη E1, μια ATP-εξαρτώμενη DNA ελικάση, αποτελεί το μόνο ένζυμο και την πιο συντηρημένη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τους Papilloma ιούς. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης αντικατοπτρίζει τον βασικό ρόλο που παίζει η πρωτεΐνη E1 στον κύκλο ζωής του ιού. Κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στο γονιδίωμα των PVs και το μέγεθος της πρωτεΐνης κυμαίνεται μεταξύ 600 και 650 αμινοξέων, ανάλογα με τον τύπο του PV.

Δομικά, η E1 μπορεί να διαιρεθεί σε τρία κύρια λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.5.): α) Σε μία N-τελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αντιγραφή του ιού (Amin et al., 2000, Morin et al., 2011). β) Σε μία κεντρική περιοχή που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής (Sun et al., 1998, Titolo et al., 2003, Auster and Joshua-Tor, 2004). γ) Σε μία C-τελική ενζυματική περιοχή, ικανή για αυτοσυγκρότηση σε εξαμερή, η οποία έχει δραστικότητα ATPάσης και βοηθά στο ξετύλιγμα μικρών δίκλωνων τμημάτων DNA (Titolo et al., 2000, White et al., 2001, Castella et al., 2006).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E1 του BPV1, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα (Bergvall et al., 2013).

Βασικός ρόλος της ιικής E1 πρωτεΐνης είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων των ικών επισωμάτων κατά τη μόλυνση των βασικών κερατινοκυττάρων. Με άλλα λόγια, είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του ικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ικό DNA στην επισωματική του μορφή (Bergvall et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ATP, η E1 αναγνωρίζει και προσδένεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία του ιού στη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των



πρώιμων γονιδίων. Στη συνέχεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, συγκροτεί ένα διπλό εξαμερές (Εικόνα 1.6.), το οποίο διαθέτει δραστηριότητα ελικάσης και βοηθά στο ξετύλιγμα του DNA στην θέση ori και στην δημιουργία της αντιγραφικής διχάλας (Lu et al., 1993, Lee et al., 1997, Bergvall et al., 2013).

Εικόνα 1.6. Κρυσταλλική δομή δύο DBD διμερών, προσδεσμένα στο DNA (Enemark et al., 2002). Παρουσιάζεται ο τρόπος συγκρότησης του διμερούς και ο τρόπος πρόσδεσης στο DNA.

1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

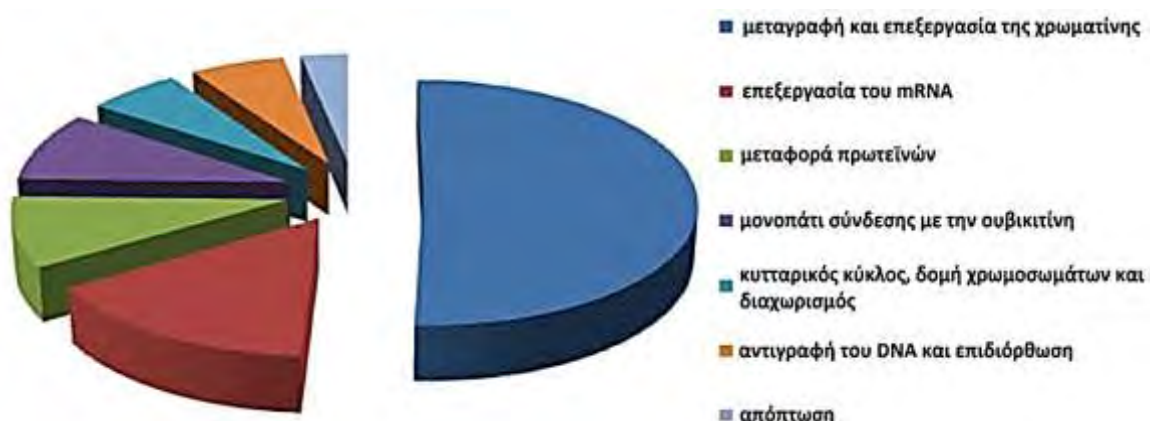
Η E2 αποτελεί μια απαραίτητη ρυθμιστική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς. Προσδένεται σε συγκεκριμένες θέσεις στο ικό γονιδίωμα, μήκους 12bp, οι οποίες τοποθετούνται εντός της ρυθμιστικής περιοχής LCR. Η ιική πρωτεΐνη E2 είναι πολυλειτουργική και εμπλέκεται σε αρκετές διαδικασίες, κυρίως σε όσες σχετίζονται με την μεταγραφή και την αντιγραφή του ικού γονιδιώματος. Η έκφρασή της λαμβάνει χώρα στα πρώιμα και τα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού (McBride, 2013).

Δομικά, η E2 διαιρείται σε δύο κύρια λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 1.7.): α) Σε μία συντηρημένη N-τελική περιοχή διενεργοποίησης (transactivation domain, TAD), η οποία εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής των ικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1, β) και σε μία C-τελική περιοχή, υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ικό DNA και τον διμερισμό της E1 (DNA binding/dimerization domain, DBD). Μεταξύ των ανωτέρω δύο περιοχών παρεμβάλλεται μια εύκαμπτη αλληλουχία σύνδεσης, που ονομάζεται «αρμός» (hinge), η οποία ποικίλλει σε μέγεθος και νουκλεοτιδική σύσταση μεταξύ των διαφορετικών γενών των PVs (Giri and Yanin, 1988, McBride et al., 1988, 2013).



Εικόνα 1.7. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E2, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Η περιοχή μεταξύ των δύο κύριων λειτουργικών τμημάτων ονομάζεται «αρμός» και ποικίλλει σε μήκος μεταξύ των Papilloma ιών (McBride, 2013).

Βασικός ρόλος της ιικής E2 πρωτεΐνης είναι η ρύθμιση της μεταγραφής των Papilloma ιών (Lambert et al., 1987, Chin et al., 1988, Choe et al., 1989). Η E2 δρα στρατολογώντας κυτταρικούς παράγοντες στο ικό γονιδίωμα, οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Προσδένεται ειδικά σε θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (ή ACCN₆GGT) και είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή, ανάλογα με την φύση των σχετιζόμενων κυτταρικών παραγόντων (Bernard et al., 1989, Stubenrauch et al., 1996). Ένας δεύτερος βασικός ρόλος της πρωτεΐνης E2 είναι η συμβολή της στην έναρξη της αντιγραφής του ικού γονιδιώματος, ενισχύοντας την δράση της E1 πρωτεΐνης (Sanders and Stenlund, 2000) (βλέπε εδάφιο 1.4.1.). Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την συμμετοχή της E2 στην κατανομή του επισωμικού γονιδιώματος του ιού στα θυγατρικά κύτταρα στην φάση της μίτωσης (McBride et al., 2008), καθώς και στη διαδικασία της συναρμολόγησης του ικού γονιδιώματος στα ισωμάτια (Zhao et al., 2000).



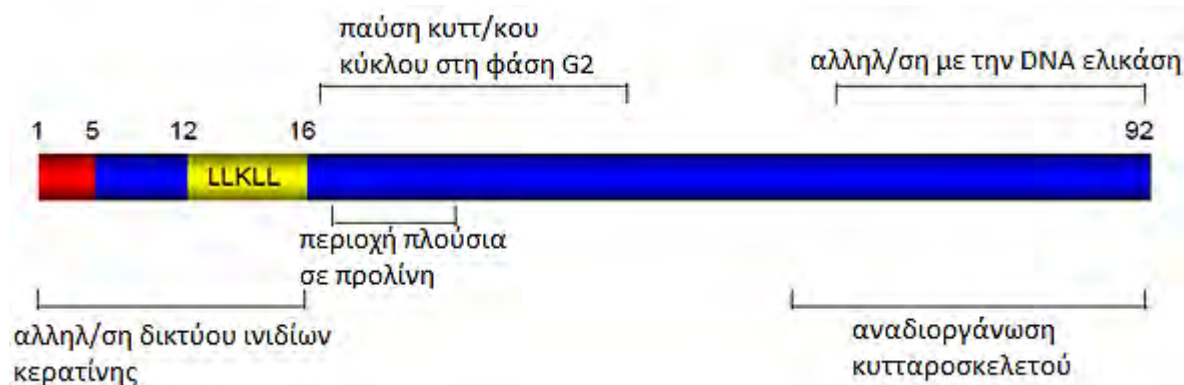
Εικόνα 1.8. Κατηγορίες των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται η πρωτεΐνη E2 (McBride, 2013).

1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) του γονιδίου E4 των Papilloma ιών εμπεριέχεται στο ORF του E2 και ποικίλλει σημαντικά σε μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών τύπων PVs (Doorbar and Myers, 1996). Η πρωτεΐνη E4 μεταφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, του οποίου τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το γονίδιο E1. Η πρωτεΐνη που παράγεται συνήθως αναφέρεται ως E1^{E4} και ανιχνεύεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPVς σε ποσότητες μεγαλύτερες από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού (Wang et al., 2011, Doorbar, 2013).

Η πρωτεΐνη E4 του HPV16 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 1.9.): α) Στο N-τελικό άκρο, όπου συναντάται το συντηρημένο μοτίβο (LLKLL), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης. β) Σε μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. γ) Στην C-τελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης (Roberts et al., 1997).

Η καλύτερα μελετημένη λειτουργία της ικής πρωτεΐνης E4 είναι η συμβολή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Πρόσφατα, προτάθηκε ο ρόλος της E4 στην απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων (McIntosh et al., 2010), στην πιθανή αλληλεπίδρασή της με την ATP-εξαρτώμενη DNA ελικάση (Doorbar et al., 2000), καθώς και στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 (Davy et al., 2002).

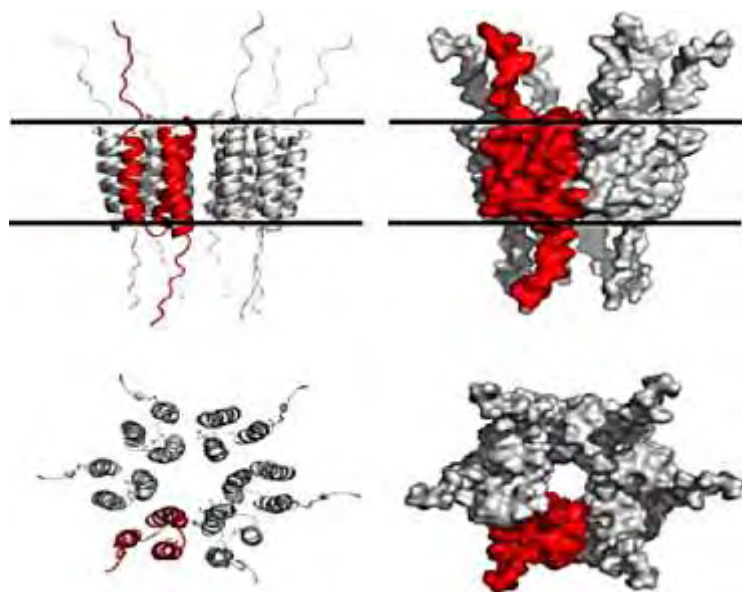


Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E4 (E1^{E4}), όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα.

1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη των HPVs είναι μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη μήκους 83 αμινοξέων. Εκφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, το οποίο ξεκινά να μεταγράφεται ανοδικά του γονιδίου E2. Είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία συγκεντρώνονται σε μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, δίνοντας στην E5 τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών (DiMaio and Petti, 2013).

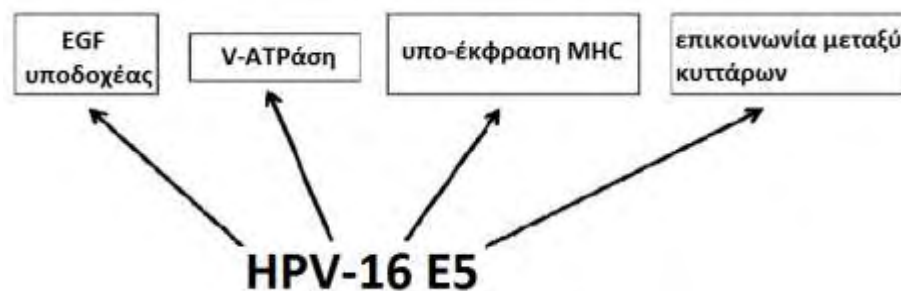
Όσον αφορά τη δομή της, η E5 διαθέτει τρεις υδροφοβικές περιοχές, οι οποίες έχουν προβλεφθεί ότι λειτουργούν ως μεμβρανικοί πόροι (Bubb et al., 1988, Halbert and Galloway, 1988). Με χρήση προγραμμάτων δομικής βιοπληροφορικής, βρέθηκε ότι αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο, η οποία διαπερνά την μεμβράνη τρεις φορές (Nath et al., 2006, Wetherill et al., 2012). Ολιγομερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα εξαμερές, σχηματίζοντας μια δομή «δαχτυλιδιού» (Yang et al., 2003, Wetherill et al., 2012) (Εικόνα 1.10.). Κάτω από φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, η E5 εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης είναι παρούσα και στις μεμβράνες της συσκευής Golgi, στην πλασματική μεμβράνη και στον πυρηνικό φάκελο (Oetke et al., 2000, Disbrow et al., 2005, DiMaio and Petti, 2013).



Εικόνα 1.10. Μοντέλο ενός εξαμερούς καναλιού ιόντων που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη E5 in vitro. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η πλευρική όψη ενός μονομερούς της E5 με τρία διαμεμβρανικά τμήματα (κόκκινο χρώμα), ενώ στο κάτω μέρος η κάτοψη της ίδιας αναπαράστασης. Η θέση της μεμβράνης ορίζεται με τις οριζόντιες γραμμές (Wetherill et al., 2012).

Η ιική πρωτεΐνη E5 έχει ένα ευρύ φάσμα δράσεων, περισσότερες από τις οποίες οδηγούν στον πρώιμο μετασχηματισμό των κερατινοκυττάρων, ενισχύοντας έτσι το ογκογονικό δυναμικό των HPVs. Συγκεκριμένα, στον ιό HPV-16 έχει βρεθεί ότι η E5 δρα συνεργατικά με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) επάγοντας την μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την ικανότητα διήθησής τους (Kivi et al., 2008, Barbaresi et al., 2010, DiMaio and Petti, 2013). Μελέτες έχουν δείξει ότι η E5 μερικών PVs μπορεί να αλληλεπιδράσει με την V-ATPάση των χυμοτοπίων οδηγώντας σε αλλαγές στην οξύνιση των ενδοσωμάτων και σε

αποικοδόμηση του υποδοχέα του EGF (Straight et al., 1995, DiMaio and Mattoon, 2001). Μια ακόμη δράση της πρωτεΐνης E5 είναι η ικανότητά της να μειώνει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (cyclin-dependent protein kinase inhibitors, CKIs) p21 και p27, προκαλώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη σύνθεση του DNA (φάση S) (Venuti et al., 2011). Τέλος, η ιική πρωτεΐνη E5 εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση, αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του ανθρώπινου MHC τύπου I, οδηγώντας στην μείωση του επιπέδου έκφρασης κυτταρικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση (Ashrafi et al., 2005, DiMaio and Petti, 2013).

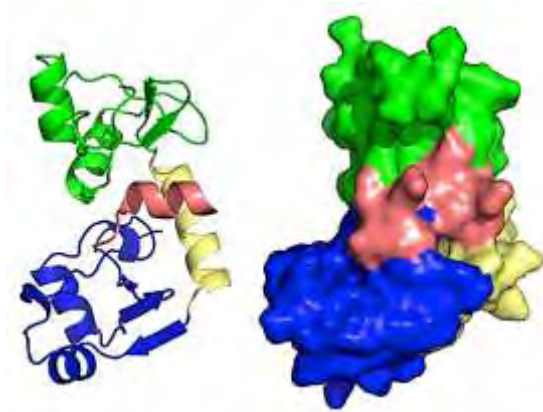


Εικόνα 1.11. Διάγραμμα των κυριότερων στόχων και δράσεων της πρωτεΐνης E5 του HPV-16 (DiMaio and Petti, 2013).

1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 αποτελεί μία πρώιμη ιική ογκοπρωτεΐνη, η οποία συμβάλλει στην αθανατοποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV ιό. Είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την διάρκεια της HPV λοίμωξης (Kajitani, 2012) και παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, διότι εμπλέκεται σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου-ξενιστή.

Πρόσφατα, διευκρινίστηκε η κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6 και χαρακτηρίστηκαν οι λειτουργικές περιοχές της (Εικόνες 1.12. και 1.13.). Συγκεκριμένα, η E6 περιέχει στο N-τελικό και στο C-τελικό της άκρο από μία δομική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου. Οι δύο αυτές περιοχές είναι πολύ καλά συντηρημένες και με την βοήθεια μιας συνδετικής αλληλουχίας με δομή α-έλικας, που τις ενώνει, δημιουργούν μία κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το συντηρημένο πεπτίδιο LXXLL. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες και δημιουργεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η αποφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης (Vande Pol and Klingelutz, 2013, Zanier et al., 2013).



Εικόνα 1.12. Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο φαίνεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία με κίτρινο και η συντηρημένη αλληλουχία LXXLL με ροζ χρώμα (Vande Pol and Klingelutz, 2013).

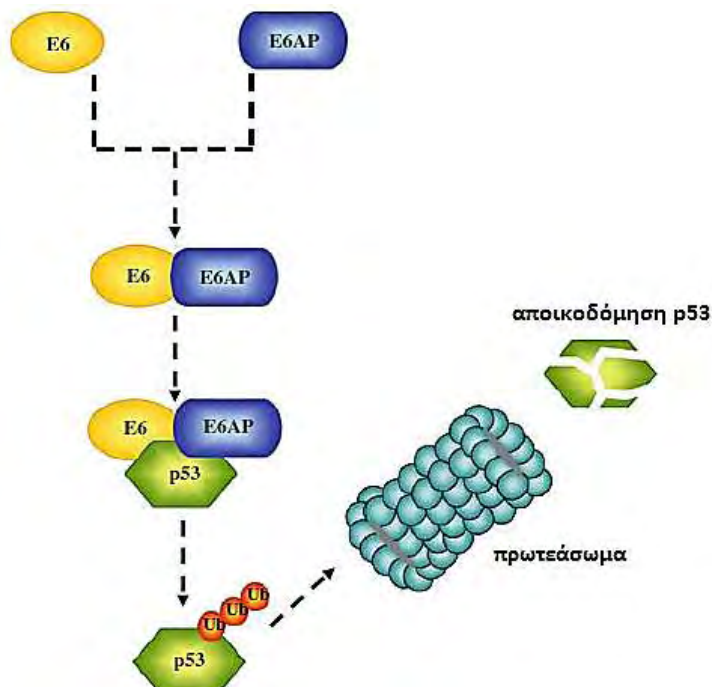


Εικόνα 1.13. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E6, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Περιλαμβάνει δύο δομικές περιοχές δακτύλου ψευδαργύρου (μπλε χρώμα) και ένα μοτίβο πρόσδεσης κυτταρικών πρωτεϊνών που διαθέτουν PDZ περιοχές (πράσινο χρώμα) (Boulet et al., 2007).

Η διεξοδικότερα μελετημένη λειτουργία της ιικής πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδρασή της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την ρύθμιση της μεταγραφής και την επαγωγή της απόπτωσης, σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η E6 προσδένεται στην ουβικιτινική λιγάση E6AP μέσω της συντηρημένης αλληλουχίας LXXLL. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο E6/E6AP προσδένεται στην p53, η οποία άμεσα ουβικιτινιλιώνεται και οδηγείται στο 26S πρωτεάσωμα για την αποικοδόμησή της (Huibregtse et al., 1991, Scheffner et al., 1993, Zanier et al., 2012, Vande Pol and Klingelutz, 2013). Δεδομένου ότι η p53 ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου, η αποικοδόμησή της έχει σαν αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα ανωτέρω σημεία ελέγχου με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 1.14.).

Μία ακόμα σημαντική λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης, ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο που διατηρεί τις τελομερικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Klingelutz et al., 1996). Συγκεκριμένα, η ογκοπρωτεΐνη E6 ενεργοποιεί, μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT (Gewin and Galloway, 2001, Oh et al., 2001, Veldman et al., 2001). Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και συνεπώς στην

αθανатоποίηση των κυττάρων. Η ογκοπρωτεΐνη E6 παρεμβαίνει, επίσης, στις διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης. Έχει βρεθεί ότι μερικοί HPVs προσδένονται στους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP και p300 και καταστέλλουν την μεταγραφική τους δραστηριότητα (Patel et al., 1999).



Εικόνα 1.14. Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την ουβικιτινική λιγάση E6AP. Το διμερές σύμπλοκο, στη συνέχεια, στρατολογεί την p53 και την οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Ghittoni et al., 2010).

1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 αποτελεί την δεύτερη ιική ογκοπρωτεΐνη, η οποία συμβάλλει στην δημιουργία αθάνατων κυττάρων και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου HPV ιό. Κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς και παίζει κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής τους, επαναπρογραμματίζοντας τις λειτουργίες του κυττάρου ώστε να ευνοούν την αναπαραγωγή του ιού. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E6, επάγει την έναρξη της ογκογένεσης καθώς και την γενωμική αστάθεια (Roman and Munger, 2013).

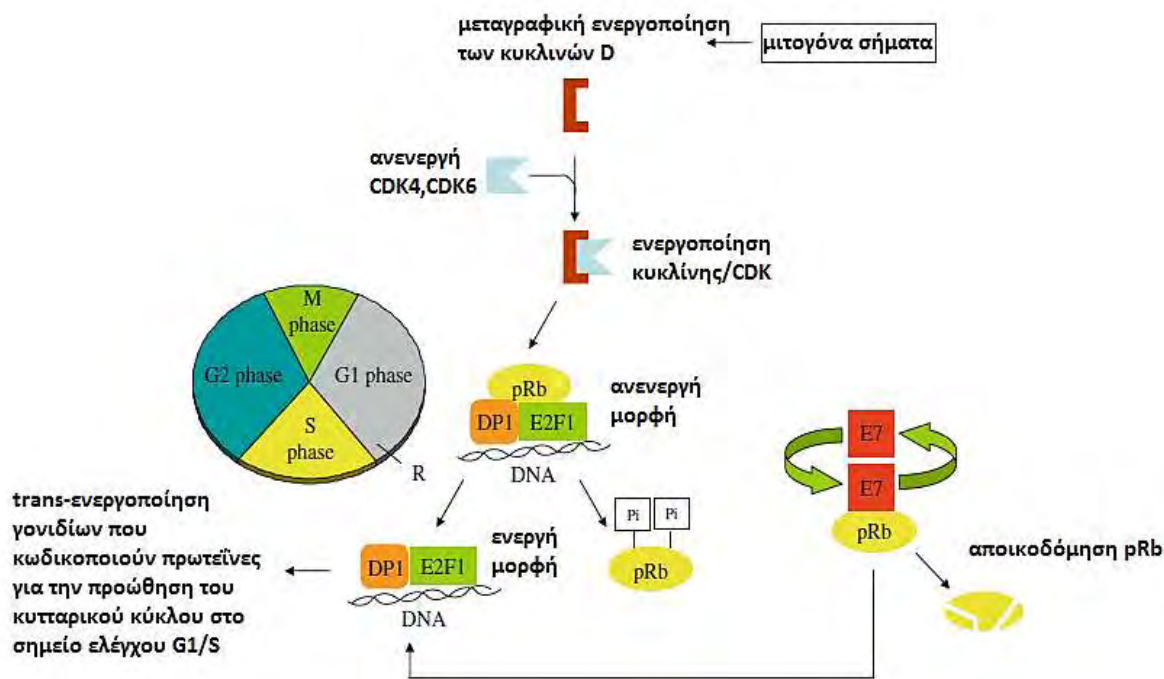
Η E7 αποτελεί μια χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη με περίπου 100 αμινοξέα. Περιέχει τρεις συντηρημένες περιοχές (conserved regions, CR), την N-τελική CR1 περιοχή, την CR2 και την C-τελική CR3 περιοχή (Εικόνα 1.15.). α) Η N-τελική περιοχή CR1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb. β) Η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb, ενώ γ) η C-τελική CR3 περιοχή περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (Munger et al., 2004, Hebner and Laimins, 2006, Boulet et al., 2007).



Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E7, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Χωρίζεται σε τρεις περιοχές: α) η CR1 (γκρίζο ανοιχτό χρώμα) που περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, β) η CR2 (κόκκινο χρώμα) που περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία LXCXE και γ) η CR3 (μπλε χρώμα) που περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (Boulet et al., 2007).

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107). Στα φυσιολογικά κύτταρα, απουσία μιτογόνου σήματος, η pRb βρίσκεται στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή και δημιουργεί σύμπλοκο με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή E2F. Μετά την σύνδεση της E7 με την pRb, η δεύτερη φωσφορυλιώνεται και συνεπώς καθίσταται ενεργός ο μεταγραφικός παράγοντας E2F, ο οποίος με την σειρά του διεγείρει την μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στην φάση S (Ghittoni et al., 2010). Εκτός από την pRb, η ογκοπρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F (Boulet et al., 2007, Roman and Munger, 2013). Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω δράσεων της E7 είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Εικόνα 1.16.)

Επιπλέον, η ιική πρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά με τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs) p21 και p27, έχοντας σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των γονιδίων των κυκλινών E και A της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διέγερση της ανάπτυξης των μολυσμένων κυττάρων και συνεισφέρει στην έναρξη της ογκογένεσης (Boulet et al., 2007, Wise-Draper and Wells, 2008). Μια τρίτη ομάδα πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται η E7 είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακετυλομάδων από τις ιστόνες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η pRb δημιουργεί σύμπλοκο με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές των E2F γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό, καταστέλλεται η μεταγραφή του παράγοντα E2F και αναστέλλεται η λειτουργία του. Μετά από μόλυνση με HPV ιό, η E7 συνδέεται στις HDACs, παρεμποδίζοντας την σύνδεσή τους με την pRb, με αποτέλεσμα να μεταγράφεται ο E2F και να διεγείρει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, απουσία μιτογόνου σήματος (Longworth, 2005).



Εικόνα 1.16. Η πρωτεΐνη E7 απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο ελέγχου G1/S. Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με μέλη της οικογένειας DP και έτσι ρυθμίζει την μεταγραφή αρκετών γονιδίων, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο ηρεμίας, η pRb βρίσκεται σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή και συνδέεται με τα μόρια E2F, αναστέλλοντας την λειτουργία τους. Η E7 μιμείται την φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς, τα κύτταρα εισέρχονται στην φάση S, απουσία μιτογόνων σημάτων (Ghittoni et al., 2010).

1.5. Μορφή του γονιδιώματος

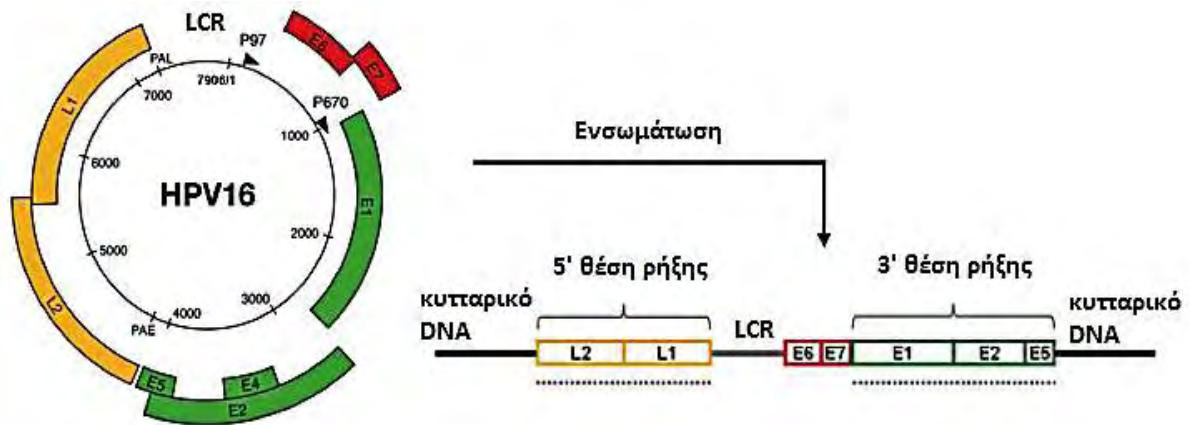
Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, ή ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου-ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο 90% των μολύνσεων από υψηλού κινδύνου HPV ιό, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Ωστόσο, στο υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε χρωμοσωμική αστάθεια (Schmitz et al., 2012).

Οι γενεσιουργοί μηχανισμοί για την απορρύθμιση αυτή είναι πολλαπλοί. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV στο DNA του κυττάρου-ξενιστή αποτελεί ένα καθοριστικό βήμα για την τραχηλική καρκινογένεση και η εμφάνισή της σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από CIN II/III σε διηθητικό καρκίνο

(Durst et al., 1985, Klaes et al., 1999, Kalantari et al., 2001, Wentzensen et al., 2004, Pett and Coleman, 2007, Schmitz et al., 2012). Παρόλα αυτά, η ενσωμάτωση δεν είναι αναγκαία για την δημιουργία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκληθεί και από κύτταρα που περιέχουν τον ιό μόνο υπό την επισωματική του μορφή (Vinokurova et al., 2008). Όσον αφορά τον HPV-16, περίπου το 30% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φέρουν τον ιό υπό την επισωματική του μορφή (Matsukura et al., 1989, Pett and Coleman, 2007, Vinokurova et al., 2008, Doorbar et al., 2012), ενώ στο υπόλοιπο 70% των περιπτώσεων ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο DNA του κυττάρου-ξενιστή (Cullen et al., 1991, Badaracco et al., 2002, Fehrman and Laimins, 2003, Doorbar et al., 2012).

Η ενσωμάτωση του ιού πραγματοποιείται κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των ασταθών χρωμοσωμικά κυττάρων και θεωρητικά συμβαίνει παράλληλα σε πολλούς κυτταρικούς κλώνους σε ασταθείς περιοχές του γονιδιώματος. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδικασίες επιλογής των κυτταρικών κλώνων με αποτέλεσμα την επιλεκτική ανάπτυξη ενός ή μερικών κλώνων με την υψηλότερη έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7, οι οποίοι στη συνέχεια μπορεί να εξελιχθούν σε όγκο (Ziegert et al., 2003, Wentzensen et al., 2004).

Κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης του ιού, το κυκλικό HPV γονιδίωμα υφίσταται ρήξη και μετατρέπεται σε ένα περικομμένο γραμμικό DNA (Εικόνα 1.17.). Τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα κατά την ενσωμάτωση (Schwarz et al., 1985, Wagatsuma et al., 1990, Xu et al., 2013). Οι συνηθέστερες θέσεις ρήξης του γονιδιώματος του ιού εντοπίζονται στα ρυθμιστικά γονίδια E1 και E2 (Chen et al., 1994, Kalantari et al., 1998, Lukaszuk et al., 2003, Arias Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009), ενώ ρήξη έχει παρατηρηθεί και στα γονίδια L1 και L2, με πολύ μικρότερη συχνότητα (Li et al., 2013, Xu et al., 2013, Akagi et al., 2014). Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μέρους του ιικού γονιδίου E2, το προϊόν του οποίου λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων. Η υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 συμβάλλει καθοριστικά στη συσσώρευση γενετικών λαθών, η οποία οδηγεί στον κακοήθη φαινότυπο (Ham et al., 1991, Yu et al., 2005). Επομένως, ο έλεγχος της μορφής του γονιδιώματος του HPV αποτελεί έναν χρήσιμο βιο-δείκτη για την πρόβλεψη της εξέλιξης της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και την ανάπτυξη καρκίνου (Gradissimo Oliveira et al., 2013).



Εικόνα 1.17. Σχηματική αναπαράσταση της ευθυγράμμισης του γονιδιώματος του HPV-16. Οι θέσεις ρήξης του ενσωματωμένου HPV-16 DNA μπορεί να εντοπίζονται οπουδήποτε στα γονίδια L2, L1 (5' θέση ρήξης) και στα γονίδια E1, E2, E5 (3' θέση ρήξης) (Xu et al., 2013).

Μια εξήγηση σχετικά με την αιτία της ιικής ενσωμάτωσης αποτελεί το γεγονός ότι τα χιμαιρικά HPV μετάγραφα παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής στο κυτταρόπλασμα, σε σχέση με αυτά που εκφράζονται από την επισωματική μορφή του ιού (Jeon and Lambert, 1995). Έτσι, δίνεται η δυνατότητα στον ιό να διεγείρει έντονα τον κυτταρικό κύκλο και την διαρκή είσοδο του κυττάρου στην φάση της μίτωσης, δίνοντας στα μολυσμένα κύτταρα ένα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα (Doorbar et al., 2012).

Έχει βρεθεί ότι η ενσωμάτωση του ιού συχνά σχετίζεται με γεγονότα αναδιοργάνωσης, όχι μόνο στο γονιδίωμα του HPV, αλλά και στην περιοχή του κυτταρικού DNA γύρω από την οποία γίνεται η ένθεση. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν φαινόμενα χρωμοσωμικού αναδιπλασιασμού, αναδιατάξεων, ελλείψεων και μετατοπίσεων. Οι γενωμικές αυτές αλλαγές συνήθως οδηγούν σε αποσταθεροποίηση της δομής του DNA, γεγονός που πιθανότατα ενισχύει την ογκογένεση (Peter et al., 2010, Akagi et al., 2014). Άγνωστο παραμένει ακόμη εάν η ενσωμάτωση της αλληλουχίας του HPV είναι η αιτία που δημιουργεί αυτές τις δομικές χρωμοσωμικές αλλαγές ή η συνέπεια μιας γενικότερης χρωμοσωμικής αστάθειας.

1.6. Θέσεις ενσωμάτωσης

Εκτός από τη μορφή του γονιδιώματος και τις θέσεις ρήξης του ιού, σημαντική είναι και η γνώση των θέσεων ενσωμάτωσης στο χρωμοσωμικό DNA. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 250 θέσεις ενσωμάτωσης του HPV. Ο μηχανισμός της ενσωμάτωσης περιλαμβάνει το σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA του ιού και του χρωμοσώματος και την συνένωσή τους μέσω κυτταρικών πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως (Winder et al., 2007).

Αν και θεωρητικά ο HPV ενσωματώνεται σε διάφορες θέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα, έχει παρατηρηθεί ότι προτιμά μεταγραφικά ενεργές περιοχές και κοινές εύθραυστες θέσεις (Common Fragile Sites, CFS) (Popescu and DiPaolo, 1989, Thorland et al., 2000, 2003, Wentzensen et al., 2004, Xu et al., 2013). Οι CFS αποτελούν χρωμοσωμικούς τόπους γενωμικής αστάθειας, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από εκατοντάδες kb έως 9 Mb (Richards, 2001, Yu et al., 2005). Αυτές οι περιοχές είναι επιρρεπείς σε δίκλωνες ρήξεις και συνεπώς σε φαινόμενα χρωμοσωμικών ελλείψεων, μετατοπίσεων και αναδιπλασιασμών, επειδή περιέχουν DNA με μεγάλη ελαστικότητα (Glover and Stein 1987, 1988). Η πιο κοινή εύθραυστη θέση είναι η FRA3B (3p14.2), η οποία εντοπίζεται σε μια περιοχή που υφίσταται τροποποιήσεις σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το μέγεθος της περιοχής είναι 4 Mb και στο κέντρο της τοποθετείται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο FHIT. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η ενσωμάτωση στη θέση 8q24.21 όπου εντοπίζεται το ογκογονίδιο MYC. Έχει παρατηρηθεί ότι η ενσωμάτωση αυτή σχετίζεται άμεσα με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του ογκογονιδίου, υποδηλώνοντας cis ρυθμιστικές επιδράσεις που ασκούνται από την ιική ένθεση (Schmitz et al., 2012).

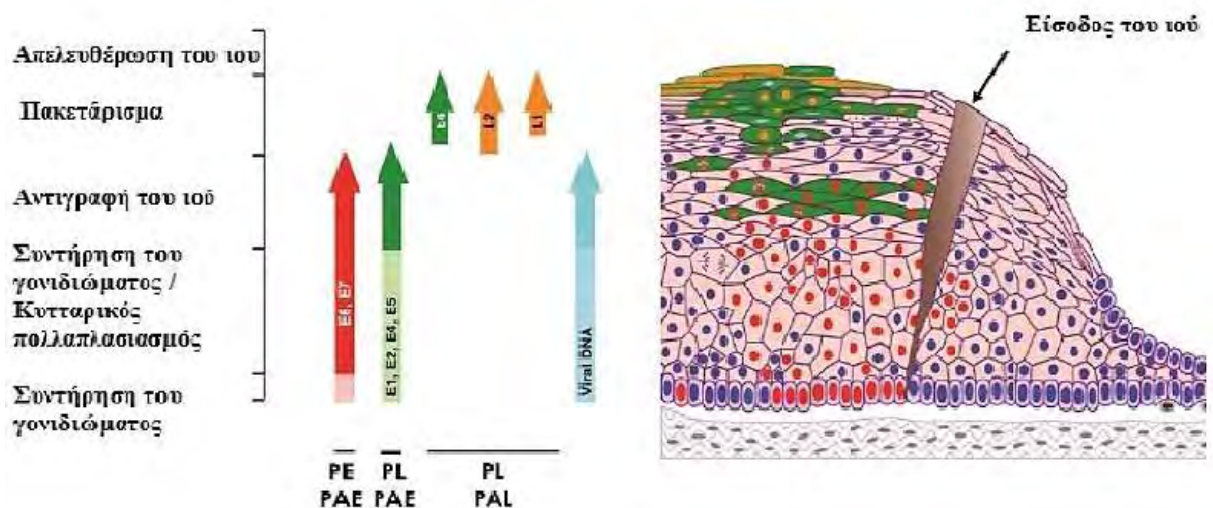
Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ενσωμάτωση του ιού δεν συμβαίνει εντελώς τυχαία και ότι οι θέσεις ενσωμάτωσης τείνουν να εντοπίζονται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές του κυτταρικού γονιδιώματος και δίπλα σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο (Li et al., 2013). Η απενεργοποίηση ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή η ενεργοποίηση ογκογονιδίων πιθανόν να είναι άμεσες επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του ιικού DNA (Kraus et al., 2008). Το φαινόμενο της μη τυχαίας ενσωμάτωσης του HPV DNA είναι ενδιαφέρον και ίσως προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό ενσωμάτωσης του ιού. Ο Schmitz και οι συνεργάτες του εντόπισαν αρκετές περιοχές στο γονιδίωμα του ανθρώπου που διαθέτουν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία με το HPV DNA. Η πιο κοινή περιοχή ομολογίας είναι μεταξύ των γονιδίων E5 και L2 (νουκλεοτιδικές θέσεις 4100-4240). Υποθέσεις γίνονται για την πιθανή εμπλοκή των περιοχών αυτών στην διαδικασία της ενσωμάτωσης (Schmitz et al., 2012).

Η ανάλυση περισσότερων θέσεων ενσωμάτωσης του HPV-16 θα συντελέσει στον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο ο ιός επιλέγει τις θέσεις ενσωμάτωσης και τον μοριακό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο ο ιός ενσωματώνεται εντός του κυττάρου-ξενιστή. Γνωρίζοντας τις θέσεις ενσωμάτωσης του HPV-16, κάποιος θα μπορούσε να προσδιορίσει εάν συγκεκριμένες ενθέσεις σχετίζονται με καλή ή άσχημη πρόγνωση, γεγονός το οποίο μπορεί να παίξει ρόλο στον προσδιορισμό του φαινοτύπου του δημιουργηθέντος τραχηλικού όγκου καθώς και να δώσει καθοριστικές πληροφορίες για την θεραπεία του ασθενούς (Yu et al., 2005, Matovina et al., 2009).

1.7. Κύκλος ζωής των HPVs

1.7.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων μολύνουν το πολύστιβο επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου. Η μόλυνση ξεκινάει όταν ο ιός εισβάλλει στο επιθήλιο μέσω μικροτραυματισμών και μολύνει τα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Ο κύκλος ζωής των HPVs είναι στενά συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Μετά την είσοδο του ιού στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί ο κύκλος ζωής του, εκφράζοντας διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται (Εικόνα 1.18.) (Schmitt et al., 1996, Egawa, 2003).

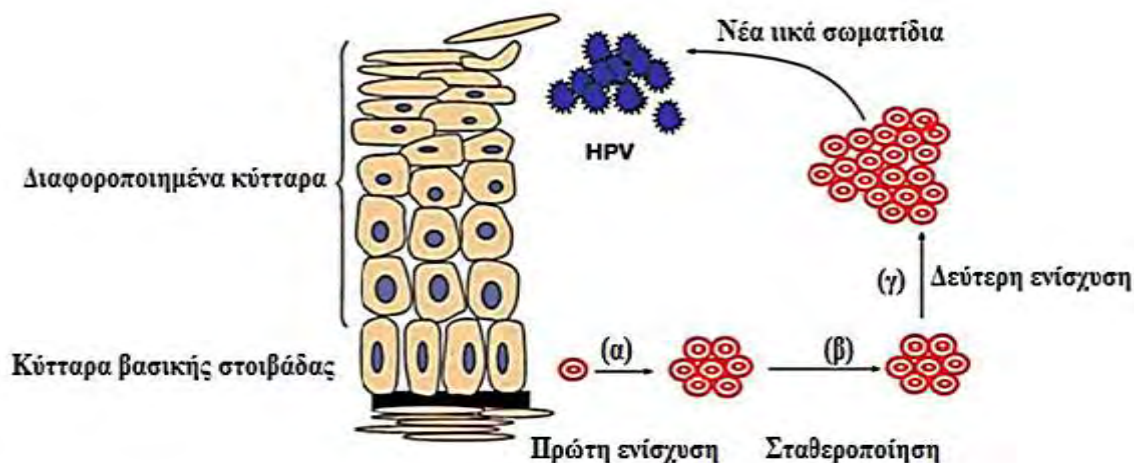


Εικόνα 1.18. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων του HPV-16. Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου υποκινητή PE ή p97 (κόκκινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και την ενίσχυση του ιικού DNA, καθώς και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα όψιμα ιικά γονίδια L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του όψιμου υποκινητή PL ή p670 (πράσινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στη δημιουργία του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιού (Doorbar et al., 2012).

Αν και η φύση του υποδοχέα της μόλυνσης με HPV δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί, οι περισσότερες μελέτες προτείνουν ότι ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω σύνδεσής του με την θειική ηπαρίνη (HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Kines et al., 2009). Δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο καψίδιο οδηγούν στη μεταφορά του ιού σε έναν δευτερεύοντα υποδοχέα των κερατινοκυττάρων, ο οποίος απαιτείται για την διείσδυση του ιού και τη μεταφορά του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα (Richards et al., 2006, Schiller et al., 2010). Μετά την διείσδυση, τα καψίδια μεταφέρονται στα ενδοσώματα, όπου υπόκεινται σε απέκδυση και κυτταρική διαλογή. Το σύμπλοκο L2 πρωτεΐνης-DNA ελέγχει την σωστή είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα, ενώ η L1 παραμένει στα ενδοσώματα έως ότου αποικοδομηθεί πλήρως (Bergant Marusic et al., 2012).

1.7.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Ο κύκλος ζωής των HPVs συνεχίζει με μια αρχική φάση ενίσχυσης του ιικού γονιδιώματος σε περίπου 200 αντίγραφα ανά κύτταρο (Pyeon et al., 2009). Σε αυτό το σημείο, το DNA του HPV παραμένει εντός του πυρήνα των κυττάρων σε επισωμική μορφή, γεγονός που είναι σημαντικό για την εγκατάσταση του ιού (McBride, 2008). Οι ικές πρωτεΐνες E1 και E2 θεωρούνται απαραίτητες στην αρχική φάση ενίσχυσης, αλλά πιθανόν να χρησιμεύουν και στην διατήρηση του ιικού γονιδιώματος στην επισωμική μορφή, εφόσον ο αριθμός των αντιγράφων σταθεροποιηθεί (Egawa et al., 2012). Η επόμενη φάση αντιγραφής του ιικού DNA συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας, στην φάση S. Στην φάση αυτή, το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται παράλληλα με το DNA του κυττάρου-ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα (ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο), οδηγώντας στη σταθεροποίηση του ιικού DNA (McBride, 2008, Pyeon et al., 2009). Στα ανώτερα στρώματα του πολύστιβου επιθηλίου η έκφραση των ιικών γονιδίων που απαιτούνται για την αντιγραφή του HPV DNA αυξάνεται αισθητά (Ozbun and Meyers, 1997), ωθώντας την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο (Εικόνα 1.19.) (Bedell et al., 1991). Στα τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο ιός πολλαπλασιάζει το DNA του σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων, συνθέτει τις καψιδιακές του πρωτεΐνες και προκαλεί την πλήρη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων του (Hoffmann et al., 2006).



Εικόνα 1.19. Σχηματική αναπαράσταση της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος. α) Η πρώτη ενίσχυση του DNA του ιού γίνεται αμέσως μετά τη μόλυνση των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας. β) Ακολουθεί η σταθεροποίηση του ιικού γονιδιώματος και η αντιγραφή του ιού γίνεται παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου. γ) Η δεύτερη και πιο παρατεταμένη ενίσχυση του DNA του ιού συμβαίνει στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, ώστε να συντεθούν τα νέα μολυσματικά ιικά σωματίδια.

1.7.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο κύκλος ζωής των HPVs είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Οι Papilloma ιοί διαθέτουν δύο βασικούς υποκινητές: τον πρώιμο και τον όψιμο υποκινητή. Στον HPV-16 ταυτοποιήθηκαν ο p97 και ο p670 ως ο πρώιμος και ο όψιμος υποκινητής, αντίστοιχα. Η μεταγραφική τους δραστηριότητα ελέγχεται κυρίως από την ρυθμιστική περιοχή LCR, διότι εκεί εντοπίζεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι λειτουργικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) από την πρώιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος. Τα έξι πλαίσια ανάγνωσης των ανωτέρω πρώιμων γονιδίων βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού υποκινητή p97 και συμβάλλουν στην εγκαθίδρυση της μόλυνσης και την αρχική αντιγραφή του DNA του ιού στο κύτταρο (Εικόνα 1.18.) (Zheng and Baker, 2006).

Αντίθετα, ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής p670 ενεργοποιείται ειδικά στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου και συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων E1 και E2, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων, έχοντας σαν τελικό στόχο την ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού (Grassmann et al., 1996). Επιπλέον, ο όψιμος υποκινητής ενεργοποιεί την έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών L1

και L2, οι οποίες απαιτούνται για την δημιουργία του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος μέσα σε αυτά (Doorbar et al., 2012).

1.7.4. Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση

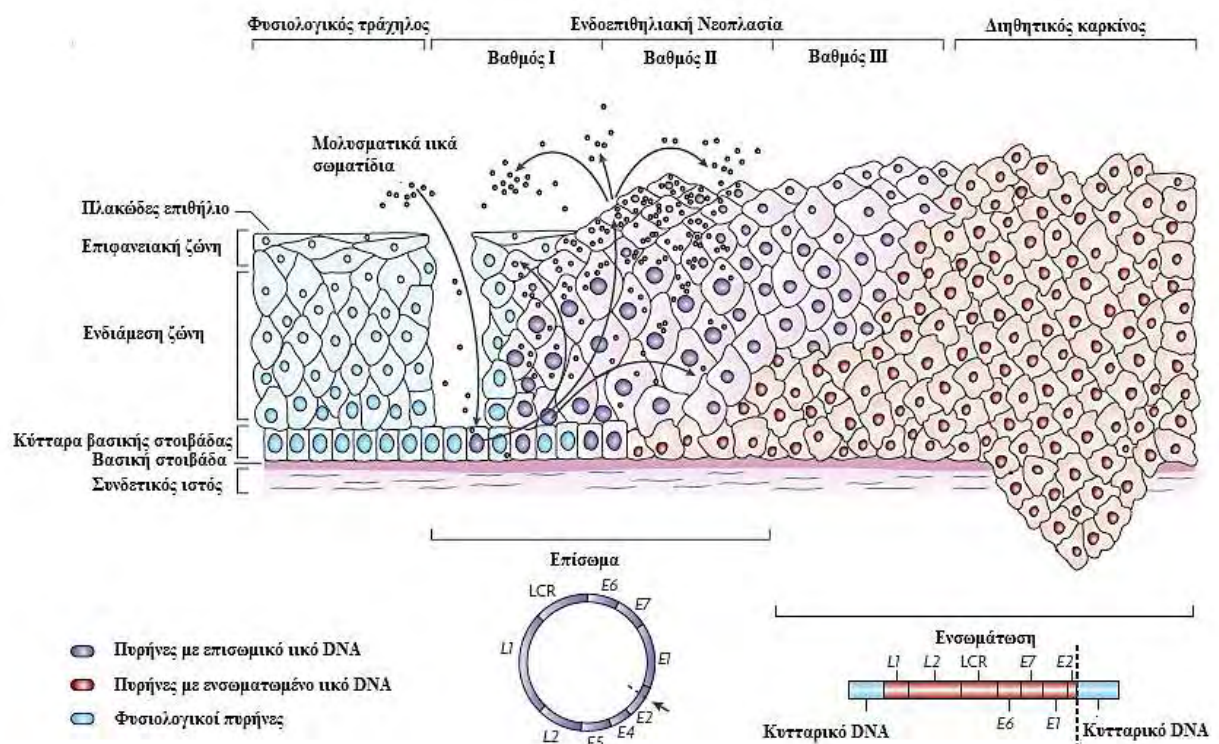
Το τελικό στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού περιλαμβάνει την συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα (Εικόνα 1.18.). Αρχικά παράγεται η ελάχιστονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2, ακολουθεί η έξοδος του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και μετά παράγεται η μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων (Buck et al., 2004). Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E1^{E4}, χωρίς να προκαλεί λύση των κερατινοκυττάρων (Lehr et al., 2004).

1.8. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων παρουσιάζουν τυπο-ειδικό τροπισμό για τα επιθήλια του δέρματος και του βλεννογόνου. Προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων που κυμαίνονται από κοινά κονδυλώματα ως νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο. Όσον αφορά τους HPVs χαμηλού κινδύνου, συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήγηθη θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμένουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλείφονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αυτοί οι τύποι HPV σπάνια έχουν σχετιστεί με νεοπλασίες ή καρκίνο στον γενικό πληθυσμό. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου των γεννητικών οργάνων και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου του κεφαλιού και του λαιμού. Οι υψηλής επικινδυνότητας HPV ιοί που συναντώνται στον γενικό πληθυσμό συνήθως προκαλούν στοματοφαρυγγικές αλλοιώσεις ή τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (Doorbar et al., 2012).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) η περιγραφή της δυσπλασίας αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ήπια, μέτρια, σοβαρή δυσπλασία ή καρκίνωμα *in situ*, ανάλογα με το πάχος του τραχηλικού επιθηλίου που καταλαμβάνεται από νεοπλασματικά κύτταρα (Reagan et al., 1953). Ο όρος τραχηλική ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) αναπτύχθηκε αργότερα για να δώσει

έμφαση στο φάσμα των αλλοιώσεων που προκαλούν οι HPVs. Κατατάσσει ως CIN I την ήπια δυσπλασία, ως CIN II την μέτρια δυσπλασία και ως CIN III τη σοβαρή δυσπλασία και το καρκίνωμα in situ (Εικόνα 1.20.) (Richart, 1967). Ωστόσο, η πιο πρόσφατη ταξινόμηση είναι αυτή της Bethesda, η οποία μετά από την εξέταση Pap κατατάσσει τις τραχηλικές αλλοιώσεις σε δύο ομάδες: χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) (Solomon et al., 2002).



Εικόνα 1.20. Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV (Woodman et al., 2007).

Κεφάλαιο 2^ο

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας, προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας», το εργαστήριο Κυτταροπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και από ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο.

Συνολικά εξετάστηκαν 28 κλινικά δείγματα, θετικά για HPV-16, εκ των οποίων τα 14 προήλθαν από βιοψίες τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη και τα υπόλοιπα 14 προήλθαν από ThinPrep. Από την κυτταροπαθολογική ανάλυση των 28 κλινικών δειγμάτων, τα 6 διαγνώστηκαν ως χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) (Πίνακας 2.1.), τα 11 ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) (Πίνακας 2.2.), και τα υπόλοιπα 11 ως περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Πίνακας 2.3.).

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (LSIL, n=6)			
D7	LSIL	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
747	LSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΤΤ6	LSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΤΤ78	LSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΤΤ91	LSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ΑΤΤ98	LSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»

Πίνακας 2.1. Έξι κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (HSIL, n=11)			
D2	HSIL	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D4	HSIL	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D13	HSIL	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D14	HSIL	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
PNL1	HSIL	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL9	HSIL	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL12	HSIL	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
ATT9	HSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ATT21	HSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ATT24	HSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»
ATT79	HSIL	ThinPrep	Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»

Πίνακας 2.2. Έντεκα κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
Καρκίνος του τραχήλου (cancer, n=11)			
D58	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D59	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D60	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D61	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D62	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D63	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D64	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D65	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
D66	cancer	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό Εργαστήριο
PNL7	cancer	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL16	cancer	ThinPrep	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.3. Έντεκα κλινικά δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

2.2. Εκχύλιση DNA

Η απομόνωση του DNA των ανωτέρω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, ανάλογα με το είδος του δείγματος (ThinPrep ή βιοψία τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη).

2.2.1. Εκχύλιση DNA (ThinPrep)

Για την απομόνωση των κλινικών δειγμάτων από ThinPrep χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Συγκεκριμένα, σε πλαστικό σωλήνα των 2ml αναμείχθηκαν 10μl γλυκογόνου (100mg/ml), 100μl από κάθε δείγμα και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση

σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απελευθερωθεί το ιικό DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20 °C), ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20 °C. Ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA). Το απομονωμένο DNA των δειγμάτων αποθηκεύτηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Διαλύματα: Διάλυμα θειοκυανιούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

2.2.2. Εκχύλιση DNA (Τραχηλικός ιστός μονιμοποιημένος σε παραφίνη)

Για την απομόνωση των ιστών μονιμοποιημένων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πρωτεϊνάσης K. Συγκεκριμένα, με τη χρήση νυστεριού απομακρύνθηκαν τομές τραχηλικού ιστού, διαμέτρου 5-10 μm, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με 400μl ξυλόλης και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400μl αιθανόλης (96%). Ύστερα, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Ακολούθησε προσθήκη 50-200μl διαλύματος εκχύλισης 1X και ολονύχτια επώαση στους 37 °C. Η απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης K επιτεύχθηκε με επώαση των δειγμάτων στους 95 °C για 15 min. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση στους 4 °C, συλλογή του υπερκειμένου και αποθήκευση του απομονωμένου DNA στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

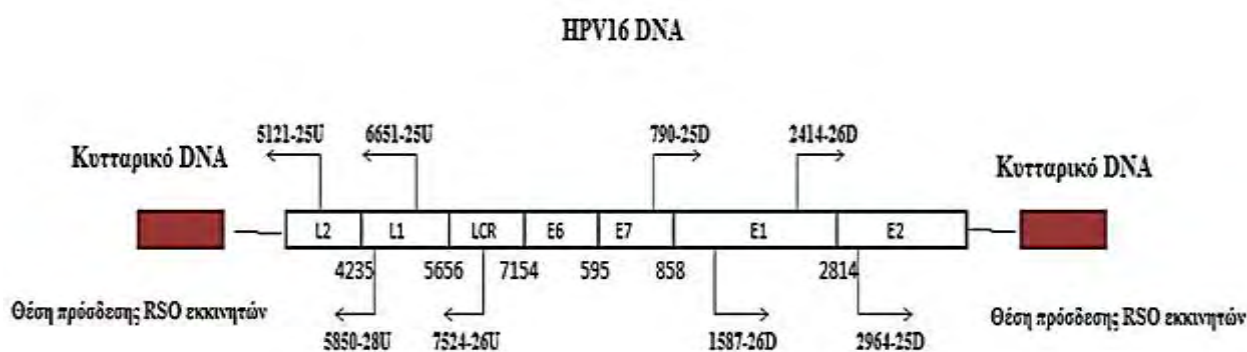
Διαλύματα: Διάλυμα εκχύλισης: 10μl πρωτεϊνάση K (20μg/μl), 100μl ρυθμιστικού διαλύματος PCR 10X (Stratagene, La Jolla, USA), 890μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA).

2.2.3. Έλεγχος της εκχύλισης

Η επιβεβαίωση της ακεραιότητας του απομονωθέντος DNA στα εκχυλισμένα δείγματα και ο έλεγχος της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε μέσω PCR ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου GAPDH, μεγέθους 230bp (Li et al., 2008).

2.3. Προσδιορισμός της θέσης ενσωμάτωσης του HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα

Ο προσδιορισμός της θέσης ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική RS-PCR (Restriction Site PCR) (Thorland et al., 2000, 2003, Yu et al., 2005). Η RS-PCR είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάκτηση άγνωστων τμημάτων DNA, τα οποία γειτονεύουν με μία γνωστή αλληλουχία (Sarkar et al., 1993). Στην τεχνική RS-PCR χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα εκκινητικά μόρια (RSOs), που περιέχουν μια αλληλουχία αναγνώρισης μιας θέσης περιορισμού, σε συνδυασμό με ειδικά εκκινητικά μόρια που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος του HPV-16 (Εικόνα 2.1.). Οι εκκινητές RSO (Restriction Site Oligonucleotide) αποτελούνται από μία αλληλουχία αναγνώρισης του υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7, 10 τυχαία νουκλεοτίδια και την αλληλουχία αναγνώρισης μιας θέσης περιορισμού. Για την ανάκτηση μιας άγνωστης αλληλουχίας, πραγματοποιείται μια πρώτη αντίδραση PCR με έναν εκκινητή ειδικό για την γνωστή αλληλουχία του HPV-16 και έναν RSO εκκινητή. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μία αντίδραση nested-PCR με έναν εκκινητή εσωτερικό της γνωστής αλληλουχίας του HPV-16 (Πίνακας 2.4.), τον ίδιο RSO και το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR σαν DNA-στόχο.



Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής RS-PCR και της θέσης πρόσδεσης των εκκινητών, εάν υποθέσουμε ότι έχει γίνει ρήξη στο 3' άκρο του γονιδίου E2 του HPV-16 DNA.

2.3.1. RS-PCR

Η αντίδραση της RS-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες των 200μl και σε τελικό όγκο 25μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 3μl DNA από κάθε δείγμα, 1μl από τον ειδικό εκκινητή για τον HPV-16 (συγκέντρωσης 2pmol/μl), 1μl από τον RSO εκκινητή (συγκέντρωσης 20pmol/μl), 5μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος A (KAPA2G Buffer A, KAPA), 5μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, USA), 0,5U Taq DNA πολυμεράσης (KAPA2G Robust DNA Polymerase, KAPA) και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 25μl.

Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν 30 κύκλοι με τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, υβριδοποίησης στους 45 °C για 1 min και επιμήκυνσης στους 72 °C για 2 min. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση για 5 min στους 72 °C. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της RS-PCR υποβλήθηκαν σε Nested RS-PCR.

2.3.2. Nested RS-PCR

Η αντίδραση της Nested RS-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες των 200μl και σε τελικό όγκο 25μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 2μl DNA από το προϊόν της πρώτης RS-PCR για κάθε δείγμα, 1μl από τον εσωτερικό ειδικό εκκινητή για τον HPV-16 (συγκέντρωσης 2pmol/μl), 1μl από τον RSO εκκινητή (συγκέντρωσης 20pmol/μl), 5μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος A (KAPA2G Buffer A, KAPA), 5μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, USA), 0,5U Taq DNA πολυμεράσης (KAPA2G Robust DNA Polymerase, KAPA) και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 25μl.

Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν 35 κύκλοι με τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, υβριδοποίησης στους 55 °C για 1 min και επιμήκυνσης στους 72 °C για 2 min. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση για 5 min στους 72 °C.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')
RS-PCR	
HPV16-768-24D	ACAAAGCACACACGTAGACATTCG
HPV16-1545-26D	AGTAATAAATCAACGTGTTGCGATTG
HPV16-2386-25D	TTTGTTTACAACCATTAGCAGATGC
HPV16-2929-24D	GTGCCAACACTGGCTGTATCAAAG
HPV16-5156-27U	TACCAATCTACTGTACCTAATGCCAG
HPV16-5883-27U	ACTTATTGGGGTCAGGTAATGTATTC
HPV16-6686-25U	AGTAGATATGGCAGCACATAATGAC
HPV16-7591-22U	GTTGGCAAGCAGTGCAGGTCAG
Nested RS-PCR	
HPV16-790-25D	CGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGG
HPV16-1587-26D	GGACTTACACCCAGTATAGCTGACAG
HPV16-2414-26D	AATAGGTATGTTAGATGATGCTACAG
HPV16-2964-25D	ACAAGCAATTGAACTGCAACTAACG
HPV16-5121-25U	GAGGTTAATGCTGGCCTATGTAAAG
HPV16-5850-28U	CCCTGTATTGTAATCCTGATACTTTAGG
HPV16-6651-25U	TGCGTGTAGTATCAACAACAGTAAC
HPV16-7524-26U	TTAAACCATAGTTGCTGACATAGAAC

RSO εκκινητές	
RSO-Bam	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGGATCC
RSO-Eco	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGAATTC
RSO-XmaI	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNTCTAGA
RSO-Sau	TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGATC

Πίνακας 2.4. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική RS-PCR. Παρουσιάζονται τα ειδικά εκκινητικά μόρια για τον HPV-16, καθώς και οι 4 RSO εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Η ένδειξη U και D δηλώνει την κατεύθυνση των εκκινητών. Με D σημειώνονται τα εκκινητικά μόρια με προσανατολισμό 5'-3', ενώ με U εκείνα με προσανατολισμό 3'-5'.

2.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RS-PCR

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων της RS-PCR έγινε με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen, UK). Η συγκέντρωση του πήκτωματος ήταν 2%. Συγκεκριμένα, για ένα πήκτωμα 2% διαλύονται 1,2gr αγαρόζης σε 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric Acid). Προστίθενται επίσης 60ml βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml), το οποίο ενσωματώνεται στο DNA και φθορίζει σε μήκος κύματος 290nm. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, όλο το προϊόν κάθε αντίδρασης (25μl) αναμεμιγμένο με 5μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης σε 40% w/v σουκρόζης σε TBE) μεταφέρεται σε αυτό. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI) και φωτογραφίζεται με ψηφιακή μηχανή (Olympus digital camera).

Διαλύματα: 5X TBE: 5,4% Tris Base, 2,75% H₃BO₃ (Merck, Germany) και 10μM EDTA διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό

Κυανό της βρωμοφαινόλης: 1mM EDTA, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 40% σουκρόζη

2.5. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

Αφού ελεγχθεί και φωτογραφηθεί το πήκτωμα, ακολουθεί η απομόνωση των προϊόντων της Nested RS-PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα προϊόντα του καθαρισμού υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση.

2.6. Μοριακή κλωνοποίηση

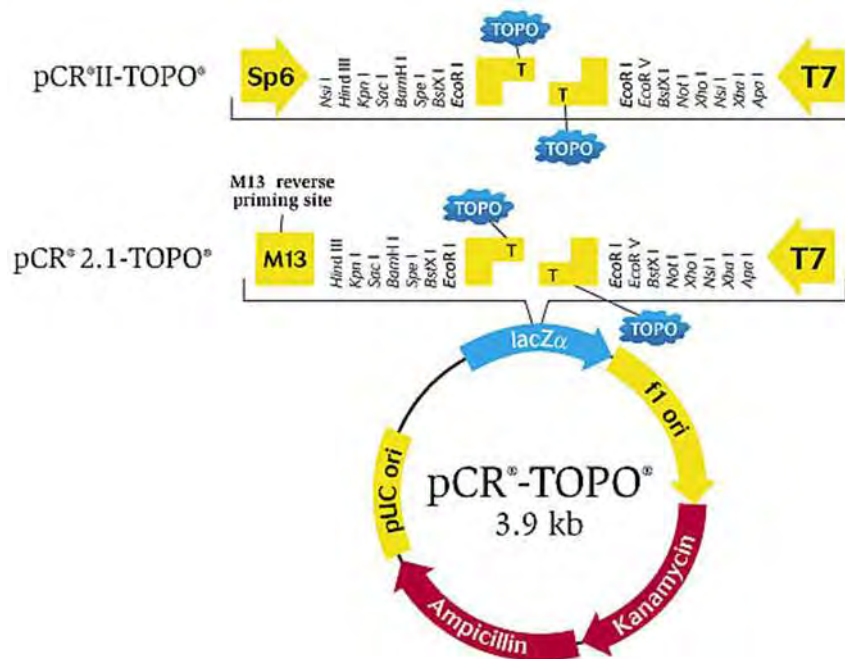
Πριν την αλληλούχιση τμημάτων DNA είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί μια διαδικασία απομόνωσης των ικών στελεχών για την αποφυγή ύπαρξης μειγμάτων, τα οποία δυσχεραίνουν τη διαδικασία της αλληλούχισης και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: α) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, β) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και γ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

2.6.1 Αντίδραση της τοποϊσομεράσης

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) (Εικόνα 2.2.), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl pCR 2.1-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της Nested RS-PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

2.6.2. Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 500μl. Στη συνέχεια προσθέτουμε ολόκληρη την ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα με 800μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1 h. Έπειτα επιστρώνουμε 300μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Αφού προστεθούν 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA), ακολουθεί ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37 °C. Την επόμενη μέρα συλλέγονται 2 - 3 λευκές (ανασυνδυσασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρονται σε 2ml LB Broth με 100μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται ολονύχτια στους 37 °C στις 210 στροφές/min. Η απομόνωση του ανασυνδυσασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) και των θέσεων κοπής του ενζύμου EcoRI.

2.6.3. Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI

Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Shiga, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 2 h στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται τα 20μl της αντίδρασης σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2%. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts για περίπου 1 h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI) και φωτογραφίζεται με ψηφιακή μηχανή (Olympus digital camera).

2.7. Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen (Amsterdam, the Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος κάθε χρωματογραφήματος για την ποιότητά του και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως προς την ειδικότητά τους μέσω ομοπαράθεσης με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του HPV-16 (HPV16R), η οποία είναι διαθέσιμη στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων Los Alamos National Laboratory.

2.8. Επιβεβαίωση των αναδιατάξεων του HPV-16 DNA

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της RS-PCR προέκυψαν φαινόμενα αναδιάταξης του HPV-16 DNA, τα οποία περιλάμβαναν διαφορετικά πρότυπα ρήξης των γονιδίων E1, E2 και συνένωση με το γονίδιο L1 με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Οι αναδιατάξεις στην αλληλουχία του HPV-16 επιβεβαιώθηκαν μέσω PCR ενίσχυσης με την χρήση εκκινητικών μορίων, τα οποία σχεδιάστηκαν ώστε να στοχεύουν ειδικά τις θέσεις εκατέρωθεν της θέσης αναδιάταξης. Τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε μοτίβου αναδιάταξης, με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), Whitehead Institute. Συγκεκριμένα, για την επιβεβαίωση του μοτίβου αναδιάταξης των γονιδίων E7,E1-L1 σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων: RSE1F1-RSE1R1 και RSE1F1-RSE1R2, λόγω της ύπαρξης ενός πολυμορφισμού στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 σε κάποια δείγματα. Για το μοτίβο αναδιάταξης E2-L1 σχεδιάστηκε το ζεύγος των εκκινητικών μορίων RSE2F1-RSE2R1 (Πίνακας 2.5.).

Η αντίδραση της επιβεβαιωτικής PCR πραγματοποιήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες των 200μl και σε τελικό όγκο 50μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 3μl DNA από κάθε δείγμα, 2μl εκκινητικών μορίων (1μl από τον καθένα σε συγκέντρωση 25pmol/μl), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (GeneON), 5μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, USA), 2,5U Taq DNA πολυμεράσης (Maximo Taq DNA Polymerase, GeneON) και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50μl.

Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν 40 κύκλοι με τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες διαφορετικές για κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση για 5 min στους 72 °C (Πίνακας 2.5.).

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και ακολούθησε μοριακή κλωνοποίηση των ενισχυμένων προϊόντων με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA), όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 2.6.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση	Προϊόν	Συνθήκες	Βιβλιογραφία
E2-L1					
RSE2F1	ATGCGGGTGGTCAGGTAA	3315	193bp	95 °C 40sec	Παρούσα μελέτη
RSE2R1	CGGCTTTGGTGCTATGGACT	6266		55 °C 40sec	Παρούσα μελέτη
				72 °C 20sec	
E7,E1-L1					
RSE1F1	TGTGTGCCCCATCTGTTCT	828	250bp	95 °C 40sec	Παρούσα μελέτη
RSE1R1	TTGTCCACCATTAGAGTTACCC	6211			50 °C 40sec
				72 °C 20sec	
RSE1F1	TGTGTGCCCCATCTGTTCT	828	248bp		Παρούσα μελέτη
RSE1R2	TTGTCCACCATTAGAGTTAC	6209			Παρούσα μελέτη

Πίνακας 2.5. Εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν για την επιβεβαίωση των αναδιατάξεων του HPV-16 DNA. Παρουσιάζεται η αλληλουχία των εκκινητών, η θέση στην οποία προσδένονται στο HPV-16 DNA, το προϊόν και οι συνθήκες της PCR.

Κεφάλαιο 3^ο

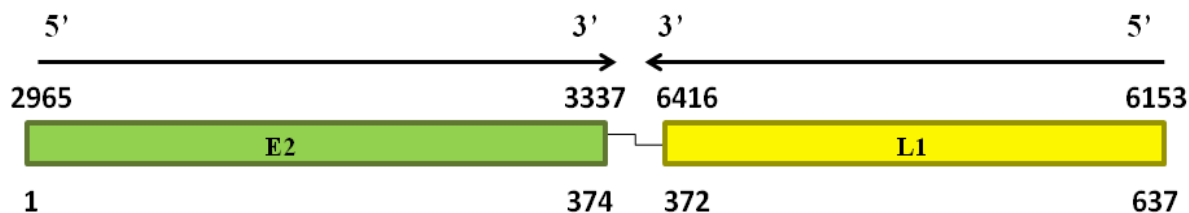
Αποτελέσματα

3.1. Ανάλυση αλληλουχιών

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση των θέσεων ενσωμάτωσης του HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα, με τη βοήθεια της μεθόδου RS-PCR (Restriction Site PCR). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην PCR και περιλαμβάνει τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα του HPV-16 σε συνδυασμό με εξειδικευμένα εκκινητικά μόρια RSOs (Restriction Site Oligonucleotides), τα οποία υβριδίζονται σε άγνωστες αλληλουχίες (Εικόνα 2.1.). Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανωτέρω τεχνικής, αναμένεται η ενίσχυση τριών διαφορετικών κατηγοριών αλληλουχιών: α) αλληλουχίες που περιλαμβάνουν μόνο ιικό DNA, β) αλληλουχίες που περιλαμβάνουν μόνο κυτταρικό DNA και γ) αλληλουχίες που περιλαμβάνουν τμήμα ιικού DNA που γειτονεύει με τμήμα κυτταρικού DNA. Η τρίτη κατηγορία αλληλουχιών προκύπτει μετά από ρήξη του κυκλικού γονιδιώματος του HPV-16 και ενσωμάτωσή του στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας περιλαμβάνουν την ανάλυση της πρώτης και της τρίτης κατηγορίας αλληλουχιών.

3.2. Φαινόμενο αναδιάταξης γονιδίων E2 και L1

Από την ανάλυση των αλληλουχιών που περιλαμβάνουν μόνο τμήματα του γονιδιώματος του HPV-16, εντοπίστηκε σε μία περίπτωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φαινόμενο αναδιάταξης του γονιδιώματος του ιού με αναστροφή. Πιο συγκεκριμένα, στο δείγμα PNL7 που προήλθε από την ενίσχυση με τον συνδυασμό των εκκινητών HPV16-2964-25D (υβριδίζεται στη θέση 2964 του HPV-16 DNA, γονίδιο E2) και RSO-Bam (υβριδίζεται σε άγνωστη αλληλουχία που περιλαμβάνει θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BamHI), εντοπίστηκε μια ενιαία αλληλουχία 637bp, η οποία περιλαμβάνει τμήμα του γονιδίου E2 (5'-3') και τμήμα του γονιδίου L1 (3'-5') με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Όπως απεικονίζεται σχηματικά και στην εικόνα 3.1., η θέση 1 έως την θέση 374 της ενισχυμένης αλληλουχίας αντιστοιχεί στις θέσεις 2965 έως 3337, αντίστοιχα, του γονιδίου E2 με προσανατολισμό 5'-3'. Ωστόσο, η αλληλουχία από την θέση 372 έως την θέση 637 φαίνεται να αντιστοιχεί στις θέσεις 6416 έως 6153, αντίστοιχα, του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3337 και 6153, η οποία περιλαμβάνει τη συνέχεια του γονιδίου E2, το E4, E5, L2 και τμήμα του γονιδίου L1 έχει απαλειφθεί και συνεχίζει το τμήμα του L1 γονιδίου με αντιπαράλληλο προσανατολισμό (3'-5').



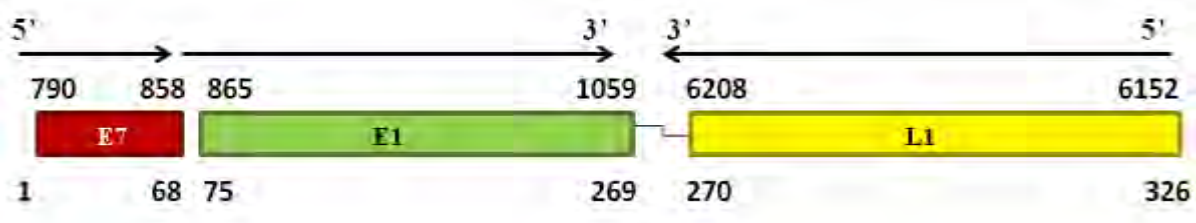
Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων E2 και L1. Από την θέση 1 έως την θέση 374 η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 2965 και 3337, αντίστοιχα, του γονιδίου E2 (πράσινο χρώμα). Στη συγκεκριμένη περιοχή ο προσανατολισμός είναι 5'-3'. Από την θέση 372 έως την θέση 637 αντιστοιχεί η περιοχή του L1 γονιδίου (κίτρινο χρώμα) μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6416 και 6153. Ο προσανατολισμός στη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία είναι 3'-5'.

3.3. Φαινόμενα αναδιάταξης γονιδίων E7, E1 και L1

Σε δύο περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (D59, PNL16), σε μία περίπτωση υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (ATT21) και σε τέσσερις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (ATT6, ATT78, ATT91 και ATT98) εντοπίστηκε ένα διαφορετικό πρότυπο αναδιάταξης του γονιδιώματος του ιού με αναστροφή. Η αναδιαταγμένη αλληλουχία των ανωτέρω κλινικών δειγμάτων προήλθε από ενίσχυση με τον συνδυασμό των εκκινητών HPV16-790-25D (υβριδίζεται στη θέση 790 του HPV-16 DNA, γονίδιο E7) και RSO-Bam (υβριδίζεται σε άγνωστη αλληλουχία που περιλαμβάνει θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BamHI). Έχει μήκος 326bp και περιλαμβάνει τμήμα των γονιδίων E7, E1 (5'-3') και τμήμα του γονιδίου L1 (3'-5') με αντιπαράλληλο προσανατολισμό.

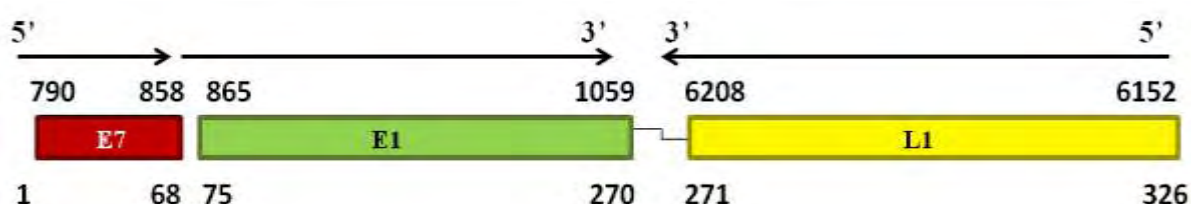
Μετά από πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών βρέθηκε μία νουκλεοτιδική έλλειψη αδενίνης στη θέση 949 του γονιδίου E1 στα κλινικά δείγματα D59 και PNL16, ενώ στα κλινικά δείγματα ATT6, ATT21, ATT78, ATT91 και ATT98 βρέθηκε μια νουκλεοτιδική έλλειψη αδενίνης στη θέση 6168 του γονιδίου L1.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα δείγματα D59 και PNL16 (Εικόνα 3.2.), η θέση 1 έως την θέση 269 αντιστοιχεί στις θέσεις 790 έως 1059, αντίστοιχα, που περιλαμβάνουν τμήμα του 3' άκρου του γονιδίου E7 (νουκλεοτιδικές θέσεις 790-858) και τμήμα του 5' άκρου του γονιδίου E1 (νουκλεοτιδικές θέσεις 865-1059) με προσανατολισμό 5'-3'. Ωστόσο, η αλληλουχία από την θέση 270 έως την θέση 326 φαίνεται να αντιστοιχεί στις θέσεις 6208 έως 6152, αντίστοιχα, του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 6152, η οποία περιλαμβάνει τη συνέχεια του γονιδίου E1, το E2, E4, E5, L2 και τμήμα του γονιδίου L1 έχει απαλειφθεί και συνεχίζει το τμήμα του L1 γονιδίου με αντιπαράλληλο προσανατολισμό.



Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων E7, E1 και L1. Από την θέση 1 έως την θέση 269 η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 790 και 1059, αντίστοιχα, των γονιδίων E7 (κόκκινο χρώμα) και του γονιδίου E1 (πράσινο χρώμα). Στη συγκεκριμένη περιοχή ο προσανατολισμός είναι 5'-3'. Από την θέση 270 έως την θέση 326 αντιστοιχεί η περιοχή του L1 γονιδίου (κίτρινο χρώμα) μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6208 και 6152. Ο προσανατολισμός στη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία είναι 3'-5'.

Όσον αφορά τα δείγματα ATT6, ATT21, ATT78, ATT91 και ATT98 (Εικόνα 3.3.), η θέση 1 έως την θέση 270 αντιστοιχεί στις θέσεις 790 έως 1059, αντίστοιχα, που περιλαμβάνουν τμήμα του 3' άκρου του γονιδίου E7 (νουκλεοτιδικές θέσεις 790-858) και τμήμα του 5' άκρου του γονιδίου E1 (νουκλεοτιδικές θέσεις 865-1059) με προσανατολισμό 5'-3'. Ωστόσο, η αλληλουχία από την θέση 271 έως την θέση 326 φαίνεται να αντιστοιχεί στις θέσεις 6208 έως 6152, αντίστοιχα, του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 6152, η οποία περιλαμβάνει τη συνέχεια του γονιδίου E1, το E2, E4, E5, L2 και τμήμα του γονιδίου L1 έχει απαλειφθεί και συνεχίζει το τμήμα του L1 γονιδίου με αντιπαράλληλο προσανατολισμό.



Εικόνα 3.3. Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων E7, E1 και L1. Από την θέση 1 έως την θέση 269 η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 790 και 1059, αντίστοιχα, των γονιδίων E7 (κόκκινο χρώμα) και του γονιδίου E1 (πράσινο χρώμα). Στη συγκεκριμένη περιοχή ο προσανατολισμός είναι 5'-3'. Από την θέση 270 έως την θέση 326 αντιστοιχεί η περιοχή του L1 γονιδίου (κίτρινο χρώμα) μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6208 και 6152. Ο προσανατολισμός στη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία είναι 3'-5'.

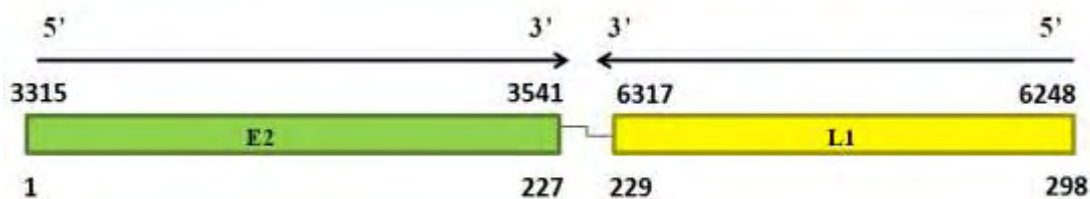
3.4. Επιβεβαίωση των αναδιαταγμένων αλληλουχιών

Για να διερευνηθεί η ειδικότητα των προτύπων αναδιάταξης του γονιδιώματος του HPV-16 και να απαλειφθεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας της RS-PCR, σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια, τα οποία στοχεύουν σε θέσεις εκατέρωθεν του σημείου σύνδεσης των δύο ανεστραμμένων τμημάτων του HPV-16 DNA (E7,E1-L1 και E2-L2). Συγκεκριμένα, για την επιβεβαίωση της αναδιάταξης E2/L1, σχεδιάστηκε το ζεύγος RSE2F1-RSE2R1 και εφαρμόστηκε στο δείγμα PNL7. Για την επιβεβαίωση της αναδιάταξης E7,E1/L1, σχεδιάστηκε το ζεύγος RSE1F1-RSE1R1 που εφαρμόστηκε στα δείγματα ATT6, ATT21, ATT78, ATT91 και ATT98 καθώς και το ζεύγος RSE1F1-RSE1R2, που εφαρμόστηκε στα δείγματα D59 και PNL16. Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η ύπαρξη των φαινομένων αναδιάταξης του γονιδιώματος του ιού επιβεβαιώθηκε σε όλα τα κλινικά δείγματα. Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι νέες ανεστραμμένες αλληλουχίες στην παθογένεια του ιού καθώς και ο τρόπος με τον οποίο έχουν σχηματιστεί, αποτελούν ακόμη αντικείμενο εργαστηριακής μελέτης.

3.5. Φαινόμενο αναδιάταξης γονιδίων E2 και L1 στην καρκινική κυτταρική σειρά CaSki

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε, προτάθηκε η ύπαρξη αντίστοιχων φαινομένων αναδιάταξης σε ενσωματωμένα μόρια HPV-16 DNA, προερχόμενα από την καρκινική κυτταρική σειρά CaSki (Akagi et al., 2014). Συνεπώς, διερευνήθηκε η ύπαρξη φαινομένων αναδιάταξης και στην καρκινική κυτταρική σειρά CaSki με όλα τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν.

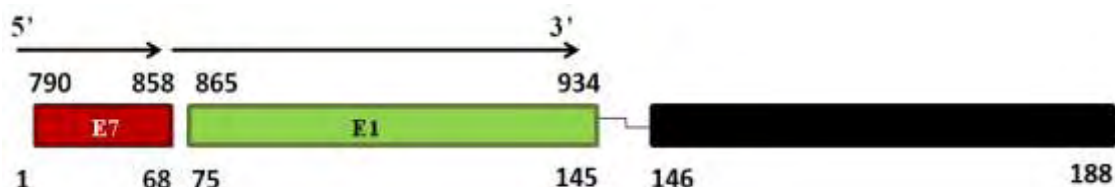
Μετά από ενίσχυση της κυτταρικής σειράς CaSki με το ζεύγος εκκινητών RSE2F1-RSE2R1, εντοπίστηκε άλλο ένα πρότυπο αναδιάταξης του HPV-16 DNA. Όπως απεικονίζεται σχηματικά και στην εικόνα 3.4., η αναδιαταγμένη αλληλουχία, μήκους 298bp, περιλαμβάνει τμήμα του γονιδίου E2 (5'-3') και τμήμα του γονιδίου L1 (3'-5') με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Πιο συγκεκριμένα, από την θέση 1 έως την θέση 227 η αλληλουχία αντιστοιχεί στις θέσεις 3315 έως 3541, αντίστοιχα, του γονιδίου E2 με προσανατολισμό 5'-3'. Ενώ, από την θέση 229 έως την θέση 298 φαίνεται να αντιστοιχεί στις νουκλεοτιδικές θέσεις 6317 έως 6248, αντίστοιχα, του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3541 και 6248, η οποία περιλαμβάνει τη συνέχεια του γονιδίου E2, το E4, E5, L2 και τμήμα του γονιδίου L1 έχει απαλειφθεί και συνεχίζει το τμήμα του L1 γονιδίου με αντιπαράλληλο προσανατολισμό.



Εικόνα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων E2 και L1. Από την θέση 1 έως την θέση 227 η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 3315 και 3541, αντίστοιχα, του γονιδίου E2 (πράσινο χρώμα). Στη συγκεκριμένη περιοχή ο προσανατολισμός είναι 5'-3'. Από την θέση 229 έως την θέση 298 αντιστοιχεί η περιοχή του L1 γονιδίου (κίτρινο χρώμα) μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6317 και 6248. Ο προσανατολισμός στη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία είναι 3'-5'.

3.6. Ανάλυση αποτελεσμάτων ενίσχυσης του D59

Από την ανάλυση των αλληλουχιών που περιλαμβάνουν τμήμα ιικού DNA που γειτονεύει με τμήμα κυτταρικού DNA, εντοπίστηκε στο κλινικό δείγμα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας D59, μια αλληλουχία που περιλαμβάνει τον συνδυασμό ιικού DNA και άγνωστης μέχρι στιγμής αλληλουχίας (Εικόνα 3.5.). Η ενίσχυση έγινε με τον συνδυασμό των εκκινητών HPV16-790-25D (υβριδίζεται στη θέση 790 του HPV-16 DNA, γονίδιο E7) και RSO-Bam (υβριδίζεται σε άγνωστη αλληλουχία που περιλαμβάνει θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BamHI). Αναλυτικότερα, η αλληλουχία του δείγματος D59, μήκους 188bp, αντιστοιχεί από την θέση 1 έως την θέση 145 στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 865 έως 934 του 5' άκρου του γονιδίου E1. Ωστόσο, από την θέση 146 έως την θέση 188 υπάρχει νουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία δεν αντιστοιχεί σε αλληλουχία του ιού. Η ταυτότητα του συγκεκριμένου τμήματος δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με την βοήθεια του προγράμματος NCBI BLAST. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε ένας εκκινητής, ο οποίος υβριδίζεται ακριβώς στο σημείο συνένωσης της ικής με την άγνωστη αλληλουχία. Ο εκκινητής αυτός θα συνδυαστεί με τους εξειδικευμένους RSO εκκινητές, ώστε να ενισχυθεί μεγαλύτερο τμήμα της άγνωστης αλληλουχίας για να μπορέσει να ταυτοποιηθεί με ακρίβεια η θέση της άγνωστης αλληλουχίας στο χρωμοσωμικό DNA. Η διαδικασία αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη.



Εικόνα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση της σύνδεσης ιικού DNA με άγνωστη αλληλουχία. Μεταξύ των θέσεων 1 έως 145 περιέχεται το 3' άκρο του γονιδίου E7 (κόκκινο χρώμα) και το 5' άκρο του E1 γονιδίου (πράσινο χρώμα) του HPV-16 DNA. Μεταξύ των θέσεων 146 έως 188 περιέχεται άγνωστη νουκλεοτιδική αλληλουχία (μαύρο χρώμα) που δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί.

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση

4.1. Ενσωμάτωση του HPV-16 DNA

Η ενσωμάτωση του HPV-16 DNA αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο που οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και τελικά στη δημιουργία διηθητικού καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού επιφέρει δομικές χρωμοσωμικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν αναδιατάξεις, ελλείψεις, μετατοπίσεις και αναδιπλασιασμούς. Τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν τις καταστροφικές επιπτώσεις της ιικής ένθεσης στο γονιδίωμα του ξενιστή (Xu et al., 2013, Akagi et al., 2014). Ωστόσο, η ανάλυση του γονιδιώματος της καρκινικής κυτταρικής σειράς CaSki έφερε στο φως τις καταστροφικές συνέπειες της ενσωμάτωσης που προκαλούνται και στον ίδιο τον ιό (Meissner, 1999, Akagi et al., 2014). Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της ιικής ενσωμάτωσης, διερευνήσαμε περαιτέρω τις θέσεις ενσωμάτωσης του ιού καθώς και τις συνέπειες που αυτή προκαλεί. Επίσης, έγινε μια προσπάθεια συσχέτισμού των ικών αναδιατάξεων με την ανάπτυξη κακοήθειας και προτάθηκε ένα μοντέλο δημιουργίας τους.

4.2. Φαινόμενα αναδιάταξης του HPV-16 DNA

Ο προσδιορισμός των θέσεων ενσωμάτωσης πραγματοποιήθηκε σε 28 κλινικά δείγματα με την μέθοδο RS-PCR, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάκτηση άγνωστων τμημάτων DNA, τα οποία γειτονεύουν με μία γνωστή αλληλουχία (Sarkar et al., 1993). Η τεχνική περιλαμβάνει ειδικά εκκινητικά μόρια που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα του HPV-16, τα οποία συνδυάζονται με εξειδικευμένα εκκινητικά μόρια RSOs (Restriction Site Oligonucleotides) που υβριδίζονται σε άγνωστες αλληλουχίες.

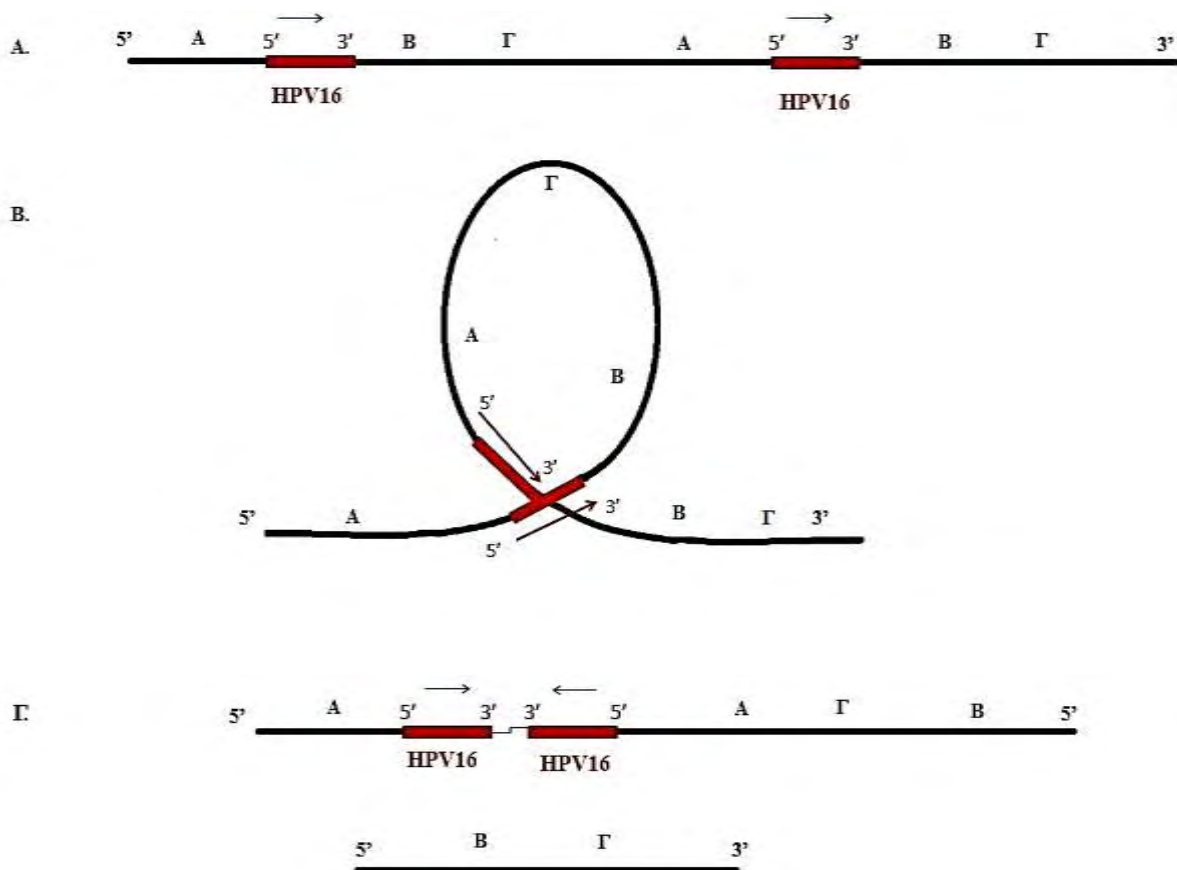
Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων εντοπίστηκαν φαινόμενα αναδιάταξης του ιικού γονιδιώματος στην καρκινική κυτταρική σειρά CaSki, σε τρεις περιπτώσεις καρκίνου, μία περίπτωση υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και σε τέσσερις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Αναλυτικότερα, στην κυτταρική σειρά CaSki και στο δείγμα PNL7 (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας) εντοπίστηκε μια αλληλουχία HPV-16, η οποία διαθέτει τμήμα του E2 γονιδίου με προσανατολισμό 5'-3' και τμήμα του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'. Επιπλέον, στα δείγματα D59, PNL16 (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας), ATT21 (υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση) και ATT6, ATT78, ATT91, ATT98 (χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση) εντοπίστηκε ένα διαφορετικό πρότυπο αναδιάταξης, το οποίο περιλαμβάνει τμήμα των γονιδίων E7 και E1 με προσανατολισμό 5'-3' και στη συνέχεια ακολουθεί ένα τμήμα του γονιδίου L1 με προσανατολισμό 3'-5'.

Φαινόμενα αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV-16 έχουν αναφερθεί στο παρελθόν, μέσω νουκλεοτιδικής ανάλυσης των γονιδίων E1 και E2, από τον Arias Pulido και τους συνεργάτες του (Arias Pulido et al., 2006). Εκτός από την εργασία αυτή, σε προηγούμενη μελέτη είχαν βρεθεί ενιαίες ικές αλληλουχίες από μη γειτονικά γονίδια. Αρχικά είχε πραγματοποιηθεί πέψη του DNA της κυτταρικής σειράς CaSki με το ένζυμο BamHI και μετέπειτα κλωνοποίηση των νουκλεοτιδικών τμημάτων. Μετά την αλληλούχιση προέκυψαν νουκλεοτιδικά τμήματα που διέθεταν ενιαίες ικές αλληλουχίες από τμήματα των γονιδίων E1 και L1 καθώς και τμήματα των γονιδίων E2 και L1 (Baker et al., 1987, Meissner, 1999). Παρόλα αυτά, οι ενιαίες ικές αλληλουχίες μη γειτονικών γονιδίων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε μια πρόσφατη μελέτη, στην οποία έγινε ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος της κυτταρικής σειράς CaSki. Στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρθηκαν πολλαπλά γεγονότα αναδιάταξης σε ενσωματωμένα ικά μόρια DNA, δημιουργώντας τμήματα με αντιπαράλληλο προσανατολισμό (Akagi et al., 2014). Μέχρι στιγμής, η ανάλυση τέτοιων περιπτώσεων αναδιάταξης ενσωματωμένων γονιδιωμάτων του HPV-16 έχει περιγραφεί μόνο στην κυτταρική σειρά CaSki, ενώ δεν έχουν αναλυθεί κλινικά δείγματα. Ο εντοπισμός αναδιαταγμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος του HPV-16 σε περιπτώσεις χαμηλού και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης, αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι οι αναδιατάξεις του ικού DNA δημιουργούνται στα αρχικά στάδια της τραχηλικής κακοήθειας. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί η συγκεκριμένη υπόθεση θα πρέπει να εμπλουτιστεί η μελέτη με περισσότερα κλινικά δείγματα και περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη των επιθηλιακών αλλοιώσεων σε δείγματα που έχουν βρεθεί φαινόμενα αναδιάταξης.

4.3. Πιθανό μοντέλο δημιουργίας αναδιαταγμένων αλληλουχιών

Από την μελέτη του Akagi και των συνεργατών του προτάθηκε ένα μοντέλο θηλιάς, σύμφωνα με το οποίο η αντιγραφή των ενσωματωμένων μορίων του HPV-16 σε συνδυασμό με γεγονότα ανασυνδυασμού, πιθανόν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αλυσομερών (concatemers) ικού και κυτταρικού DNA. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές των γειτονικών γονιδίων, όπως είναι οι ενδοχρωμοσωμικοί αναδιπλασιασμοί και αναδιατάξεις, η έλλειψη γονιδίων αλλά και η υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 (Akagi et al., 2014). Με βάση την παραπάνω πληροφορία, ένα πιθανό μοντέλο σχηματισμού των αναδιατάξεων που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία, είναι η δημιουργία μιας παροδικής θηλιάς κατά τη διάρκεια της αντιγραφής των ενσωματωμένων μορίων DNA. Η θηλιά αυτή περιλαμβάνει αλυσομερή HPV-16 DNA, τα οποία έρχονται σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό και ανασυνδυάζονται μεταξύ τους. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η σύνδεση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος του HPV-16 με αντιπαράλληλο προσανατολισμό, η αναστροφή τμήματος του χρωμοσώματος και η απαλοιφή περιοχών του κυτταρικού DNA (Εικόνα 4.1.).

Συνεπώς, η ενσωμάτωση του HPV-16 σχετίζεται στενά με την αποσταθεροποίηση των χρωμοσωμάτων του ξενιστή και τη συσσώρευση μεταλλάξεων μεγάλης έκτασης, οι οποίες οδηγούν σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και τελικά σε καρκίνο. Ωστόσο, για να καταλήξουμε σε πιο σημαντικά και ευδιάκριτα συμπεράσματα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που μεσολαβούν στην ιική ογκογένεση, θα πρέπει να μελετηθούν περισσότερα κλινικά δείγματα και να ελεγχθούν οι περιοχές δεξιά και αριστερά των ενσωματωμένων αλληλουχιών.



Εικόνα 4.1. Πιθανό μοντέλο θηλιάς, το οποίο συμβάλλει στο σχηματισμό αναδιαταγμένων τμημάτων HPV-16 DNA με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Α) Αλυσομερή (concatemers) κυτταρικού και HPV-16 DNA, όπως προτείνεται από το μοντέλο που περιγράφεται σε προηγούμενη εργασία (Akagi et al., 2014). Β) Σχηματισμός δομής θηλιάς, η οποία φέρει σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό διαφορετικά μόρια HPV-16 DNA, τα οποία στη συνέχεια ανασυνδυάζονται μεταξύ τους. Γ) Σχηματισμός τμημάτων HPV-16 DNA με αντιπαράλληλο προσανατολισμό, δημιουργία χρωμοσωμικών αναστροφών και έλλειψη περιοχών του χρωμοσώματος.

Συμπερασματικά, η μελέτη των ενσωματωμένων αλληλουχιών του HPV-16 προσφέρει νέες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην γενωμική αστάθεια, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη κακοήθειας. Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά ενιαίες ικές αλληλουχίες μη γειτονικών γονιδίων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό, υποδεικνύοντας ότι η ενσωμάτωση του HPV-16 σχετίζεται άμεσα με την χρωμοσωμική αποσταθεροποίηση ακόμη και στα πρώιμα στάδια της τραχηλικής κακοήθειας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προτείνεται ότι ο εντοπισμός φαινομένων αναδιάταξης του HPV-16 DNA, ίσως να αποτελέσει ένα σημαντικό μοριακό δείκτη που μπορεί να προβλέψει την παρουσία χρωμοσωμικών αλλαγών και την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από χαμηλού βαθμού σε υψηλού βαθμού και κατ' επέκταση σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Κεφάλαιο 5^ο

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML (2014) Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *24(2):185-199*
- Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology 272(1):137-150*
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol 44(5):1755-1762*
- Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS (2005) E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer 113(2):276-283*
- Auster AS, Joshua-Tor L (2004) The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1: Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem 279(5):3733-3742*
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML (2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol 67(4):574-582*
- Baker CC, Howley PM (1987) Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J 6(4):1027-1035*
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol 61(4):962-971*
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J 60(6):1445-1456*
- Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS (2010) Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol 91(Pt 2):521-530*
- Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Willbanks GD, Laimins LA (1991) Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol 65(5):2254-2260*

- Bergant Marusic M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L (2012) Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* 13(3):455-467
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology* 445(1-2):35-56
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63(10):4317-4324
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70-79
- Bernard HU (2013) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445(1-2):197-204
- Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, 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
- Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):2006-2011
- Bubb V, McCance DJ, Schlegel R (1988) DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* 163(1):243-246
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78(2):751-757
- Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445(1-2):169-174
- Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445(1-2):224-231
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 53:25-36
- Castella S, Burqin D, Sanders CM (2006) Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res* 34(13):3731-3741
- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH (1982) The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299(5883):529-534

- Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB (1994) Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* 44(2):206-211
- Chin MT, Hirochika R, Hirochika H, Broker TR, Chow LT (1988) Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: Functional and biochemical studies. *J Virol* 62(8):2994-3002
- Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M (1989) Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: Structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* 63(4):1743-1755
- Ciuffo G (1907) Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* 48:12-17
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2009) Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods* 158(1-2):180-183
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65(2):606-612
- Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JBA, Doorbar J (2002) Identification of a G2 arrest domain in the E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 76(19):9806-9818
- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (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(1):142-150
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(39):14252-14257
- Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (2008) Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies. *J Virol* 82(9):4638-4646
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445(1-2):2-10
- DiMaio D, Mattoon D (2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20(54):7866-7873

- DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445(1-2):99-114
- Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol* 79(9):5839-5846
- Doorbar J, Myers G (1996) The E4 protein. G Myers (Ed) *Human Papillomaviruses 1996 Compendium*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA:58-80
- Doorbar J, Elston RC, Naphthine S, Raj K, Medcalf E, Jackson D, Coleman N, Griffin HM, Masterson P, Stacey S, Mengistu Y, Dunlop J (2000) The E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* 74(21):10081-10095
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525-541
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55-70
- Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445(1-2):80-98
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66(Pt 7):1515-1522
- Egawa K (2003) Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207(3):251-254
- Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T (2012) The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86(6):3276-3283
- Enemark EJ, Stenlund A, Joshua-Tor L (2002) Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *EMBO J* 21(6):1487-1496
- Fehrmann F, Laimins LA (2003) Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22(33):5201-5207
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL (2003) Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77(8):4818-4826
- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M (2002) Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 76(19):10009-10014
- Gewin L, Galloway DA (2001) E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* 75(15):7198-7201

- Giri I, Yanin M (1988) Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7(9):2823-2829
- Gissman L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H (1984) Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 83(1 Suppl):26s-28s
- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M (2010) *Virus Genes* 40(1):1-13
- Glover TW, Stein CK (1987) Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *Am J Hum Genet* 41(5):882-890
- Glover TW, Stein CK (1988) Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet* 43(3):265-273
- Gradissimo Oliveira A, Delgado C, Verdasca N, Pista A (2013) Prognostic value of human papillomavirus types 16 and 18 DNA physical status in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Microbiol Infect* 19(10):E447-450
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, 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(4):2339-2349
- Halbert CL, Galloway DA (1988) Identification of the E5 open reading frame of human papillomavirus type 16. *J Virol* 62(3):1071-1075
- Ham J, Dostatni N, Gauthier JM, Yaniv M (1991) The papillomavirus E2 protein: A factor with many talents. *Trends Biochem Sci* 16(11):440-444
- Hebner CM, Laimins LA (2006) Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16(2):83-97
- Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K (2006) Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* 80(9):4431-4439
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10(13):4129-4135
- Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K (1972) Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 32(3):583-589
- Jeon S, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(5):1654-1658

- Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H (2012) Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 3:152
- Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Haqmar B, Johansson B (1998) Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17(2):146-153
- Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001) Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10(1):46-54
- Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20458-20463
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24):12180-12184
- Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27(18):2532-2541
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M (1999) Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59(24):6132-6136
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDouqall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380(6569):79-82
- Kraus I, Driesch C, Vinokurova S, Hovig E, Schneider A, von Knebel Doeberitz M, Durst M (2008) The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. *Cancer Res* 68(7):2514-2522
- Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM (1987) A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50(1):69-78
- Lee D, Kim H, Lee Y, Choe J (1997) Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res* 52(1):97-108
- Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D (2004) Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol* 72(3):478-483

- Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, Li Y, Lu Y, Wang S, Ma D (2008) The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1355-1361
- Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B (2013) Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol* 56(4):342-347
- Longworth MS, Wilson R, Laimins LA (2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 24(10):1821-1830
- Lu JZ, Sun YN, Rose RC, Bonnef W, McCance DJ (1993) Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 67(12):7131-7139
- Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wojcikowski C (2003) Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 41(2):608-612
- Matovina M, Sabol I, Grubisic G, Gasperov NM, Grce M (2009) Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol* 113(1):120-127
- Matsukura T, Koi S, Sugase M (1989) Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 172(1):63-72
- McBride AA, Schlegel R, Howley PM (1988) The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* 7(2):533-539
- McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 72:155-205
- McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445(1-2):57-79
- McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J (2010) E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123(Pt 16):2810-2822
- Meissner JD (1999) Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 80(Pt7):1725-1733
- Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21(18):4754-4762
- Morin G, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Berqeron -Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J (2011) A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the

- papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85(11):5287-5300
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nquyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78(21):11451-11460
- Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM (2006) Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int* 6:19
- Oetke C, Auvinen E, Pawlita M, Alonso A (2000) Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* 145(10):2183-2191
- Oh ST, Kyo S, Laimins LA (2001) Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* 75(12):5559-5566
- Ozbun MA, Meyers C (1997) Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 71(7):5161-5172
- Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* 18(18):5061-5072
- Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupe P, Barillot E, de Cremoux P, Cottu P, Radvanyi F, Sastre-Garau X (2010) Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol* 221(3):320-330
- Pett M, Coleman N (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212(4):356-367
- Popescu NC, DiPaolo JA (1989) Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cancer Genet Cytogenet* 42(2):157-171
- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF (2009) Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5(2):e1000318
- Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y (1953) The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer* 6(2):224-234
- Richards RI (2001) Fragile and unstable chromosomes in cancer: Causes and consequences. *Trends Genet* 17(6):339-345
- Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2006) Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5):1522-1527

- Richart RM (1967) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 10:748-784
- Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH (1997) Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1 E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* 71(5):3554-3562
- Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445(1-2):138-168
- Sanders CM, Stenlund A (2000) Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* 275(5):3522-3534
- Sarkar G, Turner RT, Bolander ME (1993) Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers. *PCR Methods Appl* 2(4):318-322
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75(3):495-505
- Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 118(1 Suppl):S12-S17
- Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, Iftner T (1996) The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol* 70(3):1912-1922
- Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One* 7(6):e39632
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314(6006):111-114
- Shope RE, Hurst EW (1933) Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med* 58(5):607-624
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-2119
- Straight SW, Herman B, McCance DJ (1995) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 69(5):3185-3192

- Stubenrauch F, Leigh IM, Pfister H (1996) E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* 70(1):119-126
- Sun Y, Han H, McCance DJ (1998) Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79(Pt 7):1651-1658
- Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 74(16):7349-7361
- Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J (2003) Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77(9):5178-5191
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 60(21):5916-5921
- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI (2003) Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22(8):1225-1237
- Vande Pol SB, Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137
- Van Doorslaer K (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* 445(1-2):11-20
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R (2001) Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 75(9):4467-4472
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10:140
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljev F, Durst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68(1):307-313
- Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T (1990) Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* 64(2):813-821
- Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM (2011) Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol* 85(16):8080-8092

- Wang JW, Roden RB (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445(1-2):175-186
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64(11):3878-3884
- Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Muller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S, Macdonald A (2012) High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol* 86(9):5341-5351
- White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J (2001) Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276(25):22426-22438
- Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR, Coleman N (2007) An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J Pathol* 213(1):27-34
- Wise-Draper TM, Wells SI (2008) Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* 13:1003-10017
- Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N, Harrison SC (2010) Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(14):6298-6303
- Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1):11-22
- Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Durst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One* 8(6):e66693
- Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ (2003) Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 1. *Protein Expr Purif* 30(1):1-10
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI (2005) The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 158:27-34
- Zanier K, M'Hamed Ould Sidi AO, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Trave G (2012) Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure* 20(4):604-617

Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Bahah KO, Asnsari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S, Trave G (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* 339(6120):694-698

Zhao KN, Henqst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA, Frazer IH (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* 272(2):382-393

Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11:2286-2302

Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einkenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M (2003) A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 22(25):3977-3984