



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΟΣΧΟΝΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

**Πολυμορφισμός του γονιδίου RB1 και σύνδεση των
πολυμορφισμών αυτών με υψηλού και χαμηλού βαθμού
δυσπλασίες θετικών για HPV-16 κλινικών δειγμάτων**

**RB1 polymorphism and association of RB1 gene variants
with high and low grade dysplasia of HPV-16 positive
clinical samples**

Πολυμορφισμός του γονιδίου RB1 και σύνδεση των πολυμορφισμών αυτών με υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV-16 κλινικών δειγμάτων

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΟΣΧΟΝΑΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) :ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ :ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ :ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Ιοί των Θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV) είναι μικροί, δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί, χωρίς εξωτερικό περίβλημα και προσβάλουν το επιθήλιο του δέρματος ή το επιθήλιο του βλεννογόνου. Περισσότεροι από 150 HPV τύποι έχουν ανιχνευτεί, ενώ πάνω από 40 τύποι συνδέονται με αλλοιώσεις του ουρογεννητικού συστήματος και διαχωρίζονται στους τύπους χαμηλού (low-risk) και υψηλού κινδύνου (high-risk). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει ότι "επίμονη" μόλυνση με HPV τύπους υψηλού κινδύνου, είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων με τους HPV16 και HPV18 να εντοπίζονται σε περισσότερο από το 72% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως. Η εμφάνιση καρκίνου συνδέεται με μόλυνση με HPV τύπους υψηλού κινδύνου και με την απορύθμιση της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Η ανεξέλεγκτη έκφραση των ογκογονιδίων οδηγεί στον εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων, στην ατελή επιδιόρθωση του DNA και στη συσσώρευση μεταλλάξεων στα μολυσμένα κύτταρα. Κύριοι στόχοι των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 είναι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRB αντίστοιχα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος του εξονίου 19 του γονιδίου RB1 και η εύρεση πολυμορφισμών που μπορεί να σχετίζονται με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 67 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας που απομονώθηκαν από τον Ελληνικό πληθυσμό, 24 με υψηλό βαθμό δυσπλασίας, 21 με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και 22 δείγματα αρνητικά για HPV-16.

Η νουκλεοτιδική και αμινοξική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός που να σχετίζεται με την ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού δυσπλασίας αλλά παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρουσίαζαν πολλές διάσπαρτες μεταλλάξεις σε όλο το μήκος του εξονίου 19 σε διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα. Αντίθετα τα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και τα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16 δεν εμφάνισαν μεταλλάξεις.

Για τον έλεγχο της επιλεκτικής πίεσης ελέγχθηκαν από το πρόγραμμα SNAP αρχικά όλα τα δείγματα (67) και στη συνέχεια ξεχωριστά τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας. Από την εξελικτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το εξόνιο 19 του γονιδίου RB1 παρατηρήθηκε ότι και στους δύο πληθυσμούς από τους οποίους υπολογίστηκε ο λόγος dN/dS ήταν >1 ($dN/dS=1,25$). Με βάση τα αποτελέσματα από τον λόγο των τιμών dN/dS, παρατηρήθηκε ότι ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1. Στο σύνολο των 67 δειγμάτων δεν βρέθηκε κάποιο κωδικόνιο που να του ασκείται θετική επιλεκτική πίεση, στατιστικά σημαντική. Όταν ελέγχθηκαν ξεχωριστά τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκε ότι στο κωδικόνιο 14 του εξονίου 19, το οποίο κωδικοποιεί για μία θρεονίνη στη θέση 619 της πρωτεΐνης pRB, ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στατιστικώς σημαντική.

Ενώ στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές έρευνες ανάλυσης πολυμορφισμών του γονιδίου RB1 σε διάφορους τύπους καρκίνου, έχουν γίνει ελάχιστες αντίστοιχες μελέτες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο έλεγχος όμως πολυμορφισμών σε όλο το μήκος του γονιδίου RB1 σε άτομα θετικά για HPV-16 που εμφάνισαν ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από την ογκοπρωτεΐνη E7 του HPV.

ABSTRACT

Human Papilloma Viruses (HPV) are a group of small non-enveloped double-stranded circular DNA viruses, whose infection usually causes benign epithelial lesions (warts). More than 150 HPV types have been detected, and over 40 types are associated with lesions of the urogenital system and are classified into low-risk and high-risk types. Epidemiological studies have suggested that "persistent" infection with high risk HPV types is an important factor in the development of precancerous and cancerous lesions. HPV16 and HPV18 have been recognized as causative agents in over 72% of cases of cervical cancer worldwide. The progression of cancer is associated with infection with high risk HPV types and with the deregulation of the expression of the viral oncogenes E6 and E7. Unregulated expression of oncogenes leads to extensive proliferation of infected cells, incomplete DNA repair and accumulation of mutations in infected cells. The main targets of the E6 and E7 oncoproteins are the p53 and pRB tumor suppressor proteins, respectively.

The purpose of this study was to examine the mutation spectrum on the exon 19 of the RB1 gene and to find polymorphisms that may be related to the degree of intraepithelial lesion. The study was conducted in 67 clinical cervical samples from the Greek population, 24 with a high degree of dysplasia, 21 with a low degree of dysplasia and 22 samples negative for HPV-16.

Nucleotide and amino acid analysis of the results showed that there was no specific polymorphism associated with the development of a higher degree dysplasia but it was observed that samples with a high degree of dysplasia exhibited many scattered mutations throughout the length of exon 19 in different amino acid residues. In contrast, samples with low dysplasia and samples that were negative for HPV-16 did not show mutations.

The selective pressure of the exon 19 was tested with the SNAP program that initially tested all samples (67) and then separately the high-grade dysplasia samples. From the evolutionary study performed for exon 19 of the RB1 gene it was observed that in both populations the ratio dN / dS was > 1 (dN / dS = 1.25). Based on the results from the ratio of dN / dS values, positive selective pressure was exerted on exon 19 of the RB1 gene. When the total of 67 samples were tested, we did not find a codon that was subjected to positive selective pressure, statistically significant. When the 24 samples with a high degree of dysplasia were tested separately, it was observed that codon 14 of exon 19, which codes for a threonine at position 619 of the pRB protein, exhibited a positive selective pressure statistically significant.

While there have been many studies about the mutation spectrum of RB1 mutations in various types of cancer in the past, few similar studies have been done on cervical cancer. However, the identification of several polymorphisms across the length of the RB1 gene in HPV-16 positive individuals with intraepithelial lesions may help to clarify the mechanisms of cell cycle deregulation by HPV E7 oncoprotein.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από το Σεπτέμβριο του 2015 έως τον Σεπτέμβριο του 2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος αυτής της πτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά με τα οποία συνεργαστήκαμε για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και απασχόλησης μου στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Τηλέμαχο Δημητρίου με τον οποίο συνεργαστήκαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου και από την πρώτη μέχρι την τελευταία μέρα ήταν πάντα δίπλα μου για να με βοηθάει, να με καθοδηγεί και να με συμβουλεύει, πάντα έχοντας την καλύτερη πρόθεση, καθώς και τον διδάκτορα Δημήτρη Τσακογιάννη για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθεια του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Δημήτρη και Άννα, και τον αδερφό μου, Νικόδημο, για την οικονομική, αλλά κυρίως για την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1°	9
Εισαγωγή	9
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών	9
1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV)	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	15
1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5	15
1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6	17
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7	18
1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος.....	20
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs	21
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση	21
1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος	22
1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	23
1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση	23
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	24
1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB)	25
1.8.1 Χαρακτηριστικά των «pocket family proteins»: pRb, p107, p130	26
1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRB.....	28
1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1.....	31
1.8.4 Εξόνιο 19 της πρωτεΐνης pRB.....	33
Κεφάλαιο 2°	36
Σκοπός	36
Κεφάλαιο 3°	37
Υλικά και μέθοδοι	37
3.1. Κλινικά δείγματα	37
3.2. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep	41
3.3. Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων	41
3.4. Ανάλυση πολυμορφισμών του εξονίου 19 του RB1	42
3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 19.....	42
3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων.....	43

3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης.....	44
3.4.4. Μοριακή κλωνοποίηση	44
3.4.5. Αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	46
3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης.....	47
3.4.8. Εξελικτικά μοντέλα.....	47
Κεφάλαιο 4°	50
Αποτελέσματα	50
4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 19 του RB1	50
4.2 Έλεγχος αμινοξικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 19 του RB1	53
4.3 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1	56
Κεφάλαιο 5°	58
Συζήτηση	58
Βιβλιογραφικές αναφορές	61

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Οι *Papillomaviridae* είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 τύποι του ιού των θηλωμάτων (PV) εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο και οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι. Ο ιός HPV μολύνει το τραχηλικό επιθήλιο και ανιχνεύεται τόσο σε κονδυλώματα όσο και σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Η εμπλοκή του HPV 16 στην καρκινογένεση του κατώτατου γεννητικού συστήματος, αλλά και του δέρματος, του λάρυγγα, του φάρυγγα, της ουροδόχου κύστης και των πνευμόνων ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για ένα ισχυρό ογκογόνο ιό [1].

1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Αρχικά, οι Papilloma ιοί ταξινομήθηκαν στην οικογένεια Papovaviridae μαζί με τους Polyoma ιούς καθώς είχαν παρόμοια καμψιακή δομή χωρίς εξωτερικό περίβλημα και παρόμοια μορφή γονιδιώματος. Μετά την αλληλούχηση και την εκτενέστερη ανάλυση των γονιδιωμάτων τους, διαπιστώθηκε πως η οργάνωση και το μέγεθος διέφεραν καθώς επίσης δεν υπήρχε καμία ομολογία (τόσο νουκλεοτιδική όσο και αμινοξική). Για το λόγο αυτό η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) προχώρησε στον διαχωρισμό της οικογένειας Papovaviridae σε δυο ξεχωριστές οικογένειες : την οικογένεια των Papillomaviridae και την οικογένεια των Polyomaviridae. [2]

Οι ιοί των θηλωμάτων χαρακτηρίζονται από κοινή δομή του γονιδιώματος και ταξινομούνται βάσει των διαφορών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης L1 (καθώς το γονίδιο L1 είναι το πιο συντηρημένο) σε τύπους, υποτύπους και παραλλαγές. Η ταξινόμηση γίνεται βάσει του γονιδιώματος και όχι βάσει οροτύπου καθώς δεν υπάρχει κάποια διαθέσιμη κυτταρική σειρά διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων έτσι ώστε να καλλιεργηθεί ο ιός. Μεταξύ των διαφόρων τύπων των Papilloma ιών η διαφορά στην αλληλουχία του L1 ORF

βλεπνογόνου. Οι δεύτεροι διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk), με βάση την ογκογονικότητά τους (πίνακας 1.1). Από τους τύπους υψηλού κινδύνου, οι HPV-16, HPV-18 και HPV-31 έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό που αγγίζει το 95%. [3,4]

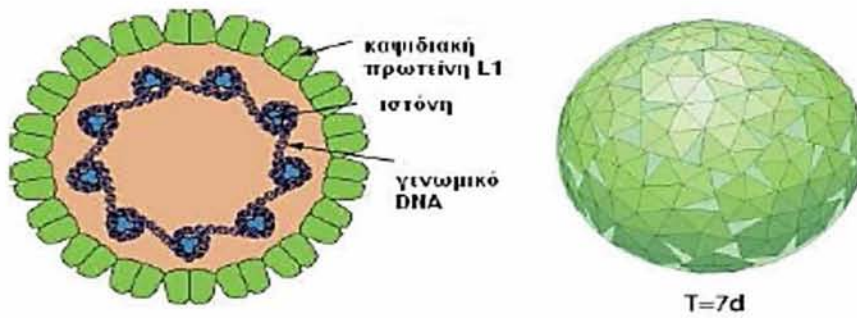
Ομάδα επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Πίνακας 1.1: Ομάδες επικινδυνότητας των HPV

1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV)

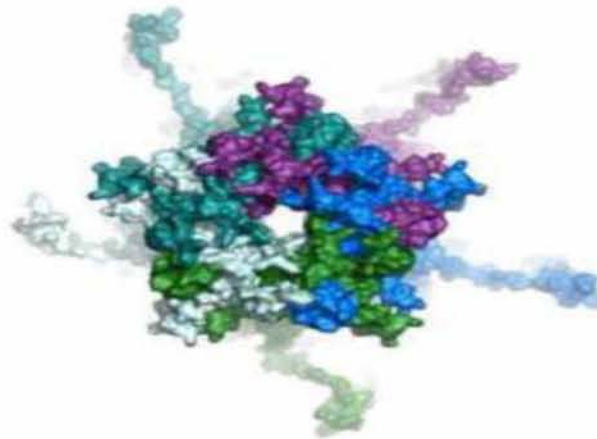
1.3.1. Δομή του καψιδίου

Οι HPV είναι μικροί DNA ιοί διαμέτρου 55-60nm και δεν περιβάλλονται από εξωτερικό περίβλημα. Το γονιδίωμα του ιού περικλείεται σε ένα καψίδιο το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες εκφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. 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=7 εικοσαεδρικά καψίδια (Εικόνα 1.2.) [6]



Εικόνα 1.2 : Δομή του καψιδίου των HPV

Η L1 αποτελεί τη μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη, βάρους 55 kDa, και σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου. Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει τόσο στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή όσο και στην απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πρωτεΐνη συγκροτεί πενταμερή καψομερή όπου 72 πενταμερή συγκροτούν ένα ώριμο καψίδιο.[7]



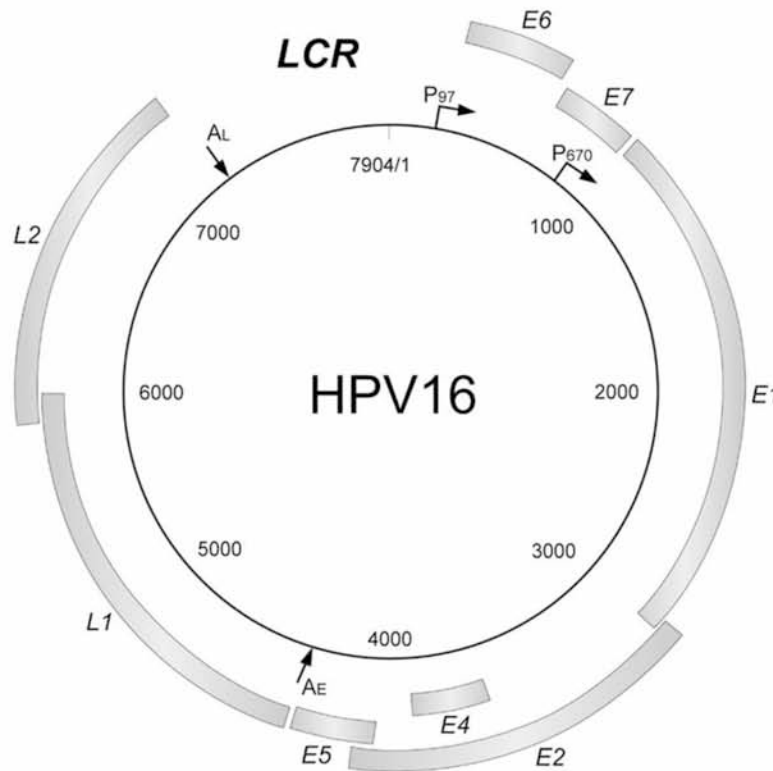
Εικόνα 1.3 : Η δομή ενός πενταμερούς καψομερούς. [8]

Η L2 αποτελεί την ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη, βάρους 55 kDa, με 12 αντίγραφα ανά ισομάτιο και εκφράζεται μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η βασικότερη λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις ικές πρωτεΐνες L1 και E2 κατά τη συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ικών σωματιδίων.[9]

1.4. Οργάνωση του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των HPV είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο μήκους περίπου 8kb. Το γονιδίωμα χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές:

- Την ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region)
- Την πρόιμη περιοχή E (Early)
- Την όψιμη περιοχή L (Late)



Εικόνα 1.4 : Το γονιδίωμα του HPV στην επισωμική του μορφή. [10]

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). [4,10]

Η πρόιμη περιοχή περιλαμβάνει 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (E1,E2,E4,E5,E6 και E7) τα οποία κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ιού και εκφράζονται στα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του ιού. [4,10]

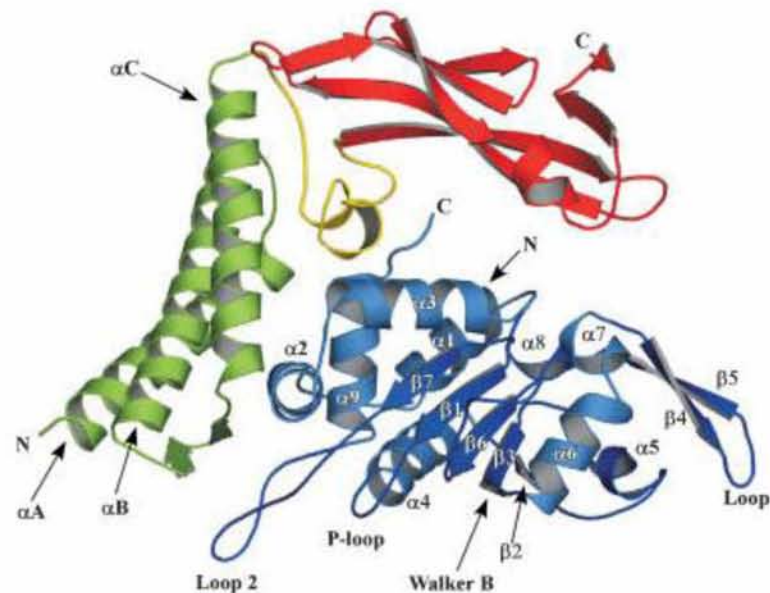
Η όψιμη περιοχή περιλαμβάνει 2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (L1 και L2) που κωδικοποιούν τις δομικές καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού. [4,10]

Στο γονιδίωμα του HPV 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 πρόιμων 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 AE και AL υποδηλώνουν τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης αντίστοιχα. [4,10]

1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 αποτελεί μια πολύ συντηρημένη περιοχή του ιικού γονιδιώματος η οποία κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 67-76 kDa (ανάλογα με τον τύπο του ιού) που απαιτείται για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη E1 είναι μια DNA ελικάση/ ATPάση και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA του ιού προσδενόμενη σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων. Το αμινοτελικό άκρο της E1 ,μήκους περίπου 200 αμινοξέων, αποτελεί μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των στελεχών του HPV. Έχει βρεθεί ότι η περιοχή στο αμινοτελικό άκρο ενισχύει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ώστε να διατηρήσει το ικό DNA στην επισωμική του μορφή, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση αυτής μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Το καρβοξυτελικό της άκρο έχει δράση ελικάσης και ATPάσης και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη E2. Τέλος, η E1 προσδένεται μέσω της κεντρικής της περιοχής (DNA-binding domain) σε μια αλληλουχία στην ori η οποία περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της E1. [11,12]



Εικόνα 1.5 : Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης E1-E2. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η E1. Με πράσινο παρουσιάζεται το αμινοτελικό άκρο της E2 και με κόκκινο παρουσιάζεται η δομική περιοχή της E2. [13]

1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa η οποία ρυθμίζει την μεταγραφή από τον πρώιμο υποκινητή, ενώ είναι απαραίτητη και για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Αποτελείται από μια περιοχή μήκους περίπου 200 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο η οποία αποτελεί μια περιοχή trans-ενεργοποίησης που εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την E1. Στο καρβοξυτελικό της άκρο έχει μια περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό γονιδίωμα και για τον διμερισμό της E1.[14,15,16]

Η περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της E2 αλληλεπιδρά με την περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της E1 η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης στη θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και την δραστικότητα ελικάσης. Συνεπώς δημιουργείται το σύμπλοκο E1/E2 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής το οποίο προκαλεί αναδιάταξη του DNA, διευκολύνοντας την προσέλευση περισσότερων μορίων E1 έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντιγραφή. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι απαραίτητος τόσο για την αντιγραφή όσο και για την μεταγραφή καθώς μετά την πρόσδεση του συμπλόκου στον πρώιμο υποκινητή προσελκύονται μεταγραφικοί παράγοντες. [14,15,16]

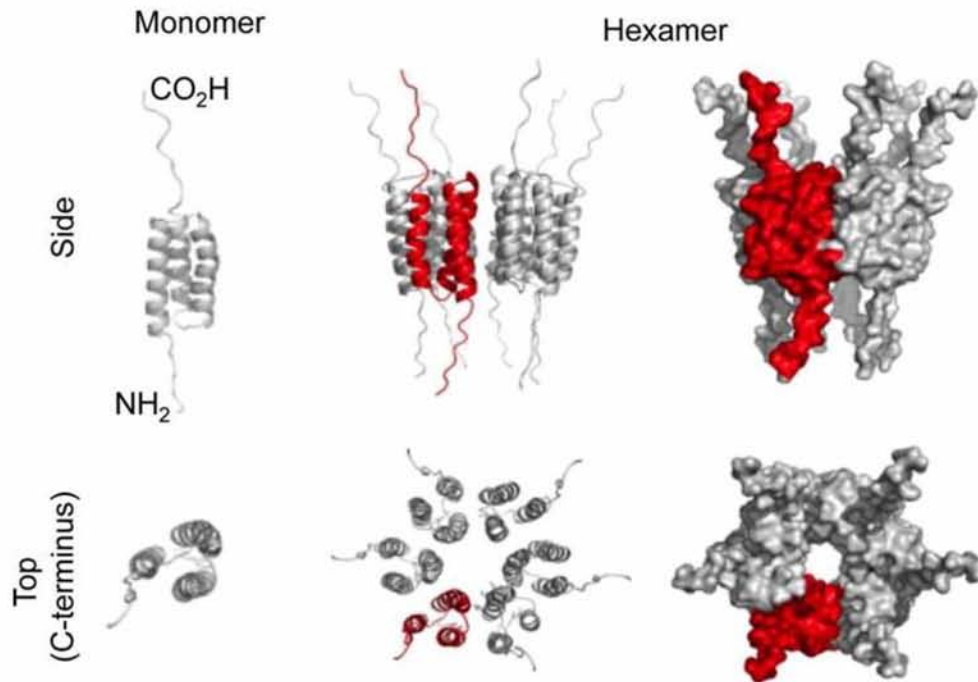
1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

Το E4 ORF εντοπίζεται εξολοκλήρου εντός του E2 ORF και εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη της οποίας τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το E1 ORF και για το λόγο αυτό αναφέρεται και ως E1^{E4}. Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού και ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα από τις άλλες πρωτεΐνες του ιού. Η πρωτεΐνη E4 του HPV16 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: α) Στο N-τελικό άκρο, όπου συναντάται το συντηρημένο μοτίβο (LLKLL), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης. β) Σε μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2. γ) Στην C-τελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης. Η καλύτερα μελετημένη λειτουργία της ιικής πρωτεΐνης E4 είναι η συμβολή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Συγκεκριμένα προάγει την κατάρευση του κυτταροσκελετού οδηγώντας στην απελευθέρωση των νέων ισοσωματίων από τα μολυσμένα κύτταρα της διαφοροποιημένης στοιβάδας. [17,18,19]

1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη 83 αμινοξέων η οποία εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυττάριας μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου και σπανιότερα μπορεί να εντοπιστεί και στον

πυρηνικό φάκελο. Αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο, η οποία διαπερνά την μεμβράνη τρεις φορές. Ολιγομερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα εξαμερές, σχηματίζοντας μια δομή «δαχτυλιδιού».



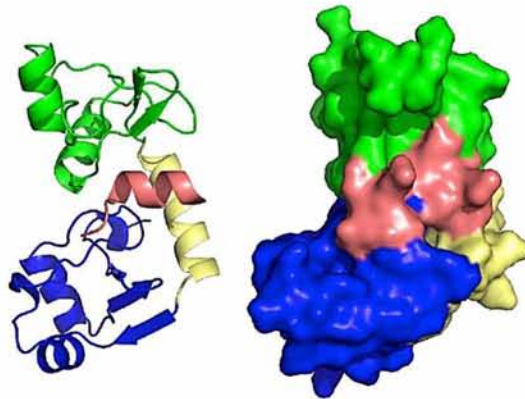
Εικόνα 1.6 : Μοντέλο ενός εξαμερούς καναλιού ιόντων που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη E5 in vitro. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η πλευρική όψη ενός μονομερούς της E5 με τρία διαμεμβρανικά τμήματα (κόκκινο χρώμα), ενώ στο κάτω μέρος η κάτοψη της ίδιας αναπαράστασης. [23]

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 HPV. Παρ'όλο που η E5 χαρακτηρίζεται από ικανότητα μετασχηματισμού των κερατινοκυττάρων, έχει πολύ ασθενέστερη δράση σε σχέση με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού E6,E7 και εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και όχι στη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, στον ιό HPV-16 έχει βρεθεί ότι η E5 δρα συνεργατικά με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) επάγοντας την μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την ικανότητα διήθησής τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η E5 μερικών PVs μπορεί να αλληλεπιδράσει με την V-ATPάση των χυμοτοπίων οδηγώντας σε αλλαγές στην οξύτητα των ενδοσωμάτων και σε αποικοδόμηση του υποδοχέα του EGF. Τέλος, η πρωτεΐνη E5 ελαττώνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μείζοντος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I) αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του MHC I έτσι ώστε ο ιός να αποκτά την ικανότητα να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση. [20,21,22]

1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 αποτελεί μία πρώιμη ιική ογκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από 151 αμινοξέα, 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 και παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, διότι εμπλέκεται σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου-ξενιστή. [24,25]

Η E6 περιέχει στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό της άκρο από μια δομική περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου όπου η κάθε μια φέρει δυο μοτίβα Cys-X-X-Cys οι οποίες είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των διαφόρων στελεχών, καταδεικνύοντας ότι είναι απαραίτητες για τις λειτουργίες της πρωτεΐνης. 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 αναστολή της απόπτωσης. [28]

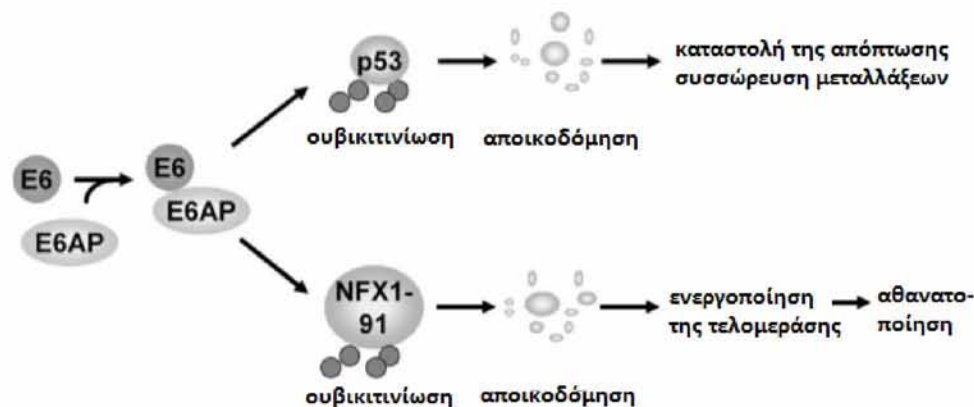


Εικόνα 1.7 : Κρυσταλλική δομή της ιικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο φαίνεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία με κίτρινο και η συντηρημένη αλληλουχία LXXLL με ροζ χρώμα. [28]

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός με τον οποίο η E6 συμβάλλει στην ογκογένεση είναι η αλληλεπίδρασή της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του κυττάρου p53. Πιο συγκεκριμένα, η E6 προσδένεται μέσω του πεπτιδίου LXXLL στη λιγάση της ουβικιτίνης E6AP σχηματίζοντας το σύμπλοκο E6/E6AP. Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στην p53 και την ουβικιτιλιώνει και έτσι οδηγείται στο πρωτεάσωμα 26S όπου και αποικοδομείται. Η απώλεια της λειτουργικής p53 έχει ως αποτέλεσμα

να μην λειτουργούν οι διεργασίες της διόρθωσης των βλαβών του DNA και η παράκαμψη των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τελικώς οδηγούν σε γενωμική αστάθεια. 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. Η αποικοδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 των υψηλού κινδύνου HPV's. Αντίθετα, η E6 των χαμηλού κινδύνου HPV's παρόλο που μπορεί να προσδένεται στην E6AP δεν μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της p53. [28,29]

Μία ακόμα σημαντική λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης, ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού ενζύμου που διατηρεί τις τελομερικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, η ογκοπρωτεΐνη E6 μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης του παράγοντα NFX1-91, οποίος είναι αναστολέας της έκφρασης του γονιδίου hTERT, ενεργοποιεί το γονίδιο hTERT. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και συνεπώς στην αθανатоποίηση των κυττάρων. [28,29]



Εικόνα 1.8 : Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του συμπλόκου E6/E6AP που οδηγούν στην αποικοδόμηση της p53 και του παράγοντα NFX1-91 στο πρωτεάσωμα 26S.

Τέλος, η E6 μπορεί να ασκήσει αντιαποπτωτική δράση μέσω της πρόσδεσης της σε πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (BAK, BAX) τις οποίες και αποδομεί μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα 26S. [27]

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. 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.[30]

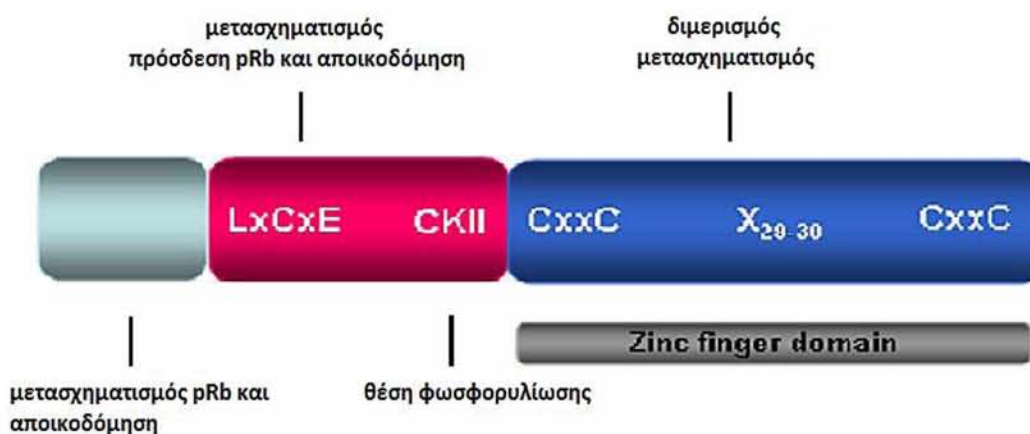
Η E7 είναι μια μικρή φωσφοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 98 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις συντηρημένες περιοχές (Conserved Regions,CR) CR1,CR2 και CR3. Το αμινοτελικό άκρο της περιλαμβάνει την CR1, το καρβοξυτελικό της άκρο την CR3 και ανάμεσα τους βρίσκεται η CR2. Η CR1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb. Η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb. Η CR3 περιοχή περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες [30]

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107). Στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή η pRb προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα E2F με στόχο την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην σύνθεση του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της pRb από τις κυκλοοεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση του E2F και στην πρόοδο στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η πρόσδεση της E7 στην αποφωσφορυλιωμένη pRb δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F και έτσι επιτρέπει στα κύτταρα να περάσουν στην φάση S. Εκτός από την pRb, η ογκοπρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F. Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω δράσεων της E7 είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Παρ'όλο που οι πρωτεΐνες E7 όλων των στελεχών μπορούν να προσδένονται στα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος, οι E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου προσδένονται με πολύ υψηλότερη συγγένεια στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τις E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου.[30,31,32]

Η E7 έχει επίσης την ικανότητα να προσδένεται στις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή των γονιδίων. Φυσιολογικά τα ένζυμα αυτά απομακρύνουν από τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών ακετυλομάδες με αποτέλεσμα την συμπύκνωση της χρωματίνης και την καταστολή της μεταγραφής. Η pRb αλληλεπιδρά με την HDAC-1 και την κατευθύνει στους υποκινητές που προσδένουν τον E2F έτσι ώστε να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Η E7 προσδένεται στην HDAC-1 μέσω της CR3 περιοχής ανεξάρτητα από την πρόσδεσή της με την pRb

παρεμποδίζοντας την λειτουργία της με αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.[33]

Μια ακόμα ομάδα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά η E7 είναι οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases inhibitors, CKIs) p21 και p27. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η μετάβαση από την G1 στην φάση S ελέγχεται από τα σύμπλοκα κυκλινών- κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζονται από τους CKIs. Η E7 αναστέλλει τη δράση των p21 και p27 των οποίων κύριος στόχος είναι η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση cdk2 που αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S. Επομένως η E7 διατηρεί σε υψηλά επίπεδα την cdk2 ενώ παρατηρούνται και υψηλά επίπεδα των κυκλινών A και E. [30,34]

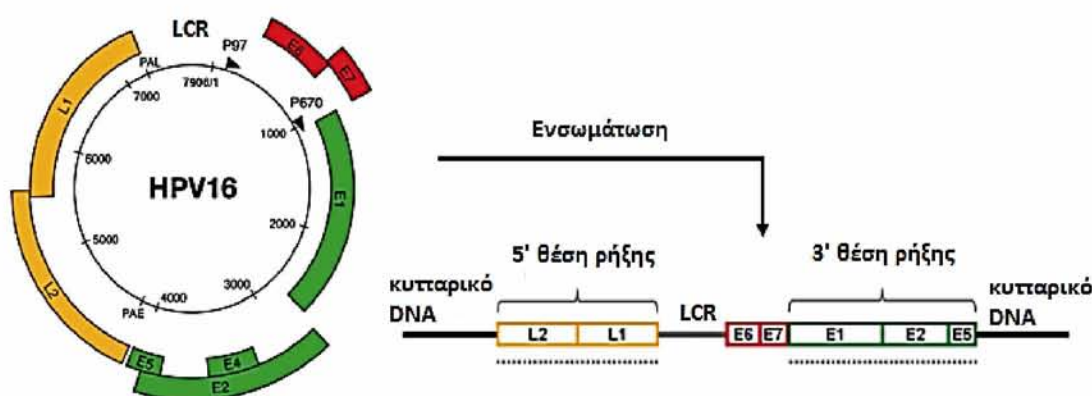


Εικόνα 1.9 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E7, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Χωρίζεται σε τρεις περιοχές: α) η CR1 (γκρίζο ανοιχτό χρώμα) που περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, β) η CR2 (κόκκινο χρώμα) που περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία LXCXE και γ) η CR3 (μπλε χρώμα) που περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου [35].

1.5. Μορφή του ιικού 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 μετασηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε γενωμική αστάθεια. [36]

Κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης του ιού, το κυκλικό HPV γονιδίωμα υφίσταται ρήξη και μετατρέπεται σε γραμμικό DNA. Τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα κατά την ενσωμάτωση. Οι συνηθέστερες θέσεις ρήξης του γονιδιώματος του ιού εντοπίζονται στα ρυθμιστικά γονίδια E1 και E2, ενώ ρήξη έχει παρατηρηθεί και στα γονίδια L1 και L2, με πολύ μικρότερη συχνότητα. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μέρους του ιικού γονιδίου E2, το προϊόν του οποίου λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης των ιικών ογκογονιδίων. Η υπερπαραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 συμβάλλει καθοριστικά στη συσσώρευση γενετικών λαθών, η οποία οδηγεί στον κακοήθη φαινότυπο. [37]



Εικόνα 1.10: 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) [37]

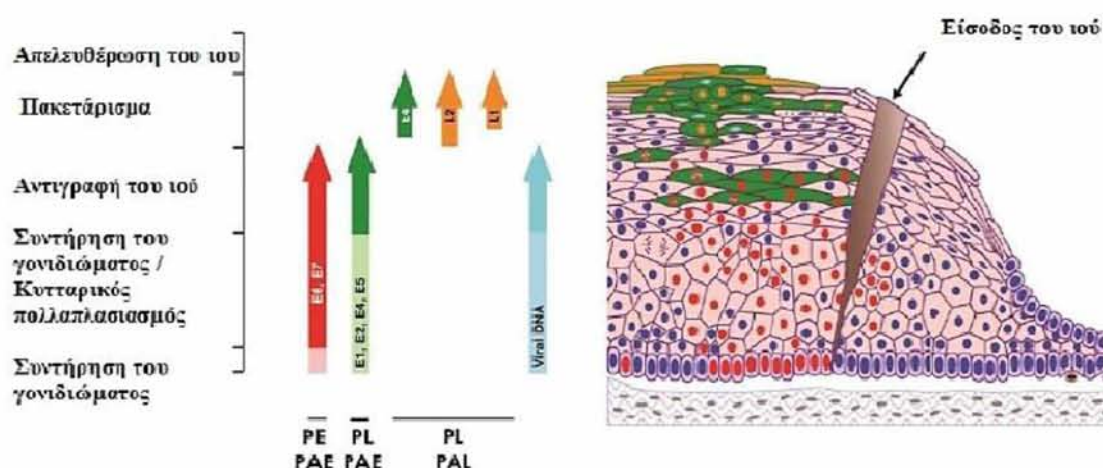
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs

1.6.1. 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 κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Ο κύκλος ζωής των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος αποπίπτουν. Μετά την είσοδο του ιού στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί ο κύκλος ζωής του, εκφράζοντας διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά

σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται. [10,38]

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. 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. Το σύμπλοκο L2 πρωτεΐνης-DNA ελέγχει την σωστή είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα.[39]



Εικόνα 1.11: 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. [10]

1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, οι HPV περνούν από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματος τους. Μία αρχική φάση αντιγραφής πραγματοποιείται αμέσως μετά την είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και ακολουθείται από τη διατήρηση του ιικού επισώματος σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων που αντιστοιχούν σε περίπου 200 ανά κύτταρο. Απαραίτητες για την αντιγραφή αυτή είναι οι δύο πρώιμες πρωτεΐνες του HPV, η E1 και E2. Ένα διμερές της E1 συνδέεται σε συνεργασία με ένα διμερές της E2 στο ιικό DNA στη θέση έναρξης της αντιγραφής (ori). Τότε η E2 αποδεσμεύεται και η E1 ξετυλίγει το DNA ανοίγοντας το δρόμο για τις πρωτεΐνες αντιγραφής του κυττάρου. Η επόμενη φάση της αντιγραφής συμβαίνει παράλληλα με την αντιγραφή του γονιδιώματος των κερατινοκυττάρων, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Δημιουργούνται έτσι δύο αντίγραφα του ιικού επισώματος, από τα οποία μεταβιβάζεται ένα σε κάθε θυγατρικό

κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό το ιικό γονιδίωμα σταθεροποιείται στο επιθήλιο. Η τρίτη και τελευταία φάση αντιγραφής στον κύκλο ζωής του HPV πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε ιικά σωματίδια. [40,41]

1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όπως προαναφέρθηκε, τόσο η αντιγραφή του ιικού DNA, όσο και η μεταγραφή των γονιδίων των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Οι HPVs έχουν δύο κύριους υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους, τον πρώιμο και το όψιμο υποκινητή. Στον HPV-16 οι δύο αυτοί υποκινητές είναι ο p97 και ο p670. Οι υποκινητές αυτοί ελέγχονται αυστηρά από τη ρυθμιστική περιοχή LCR, στην οποία συνδέονται τόσο κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όσο και ο ιικός ενεργοποιητής/καταστολέας E2. [4,10]

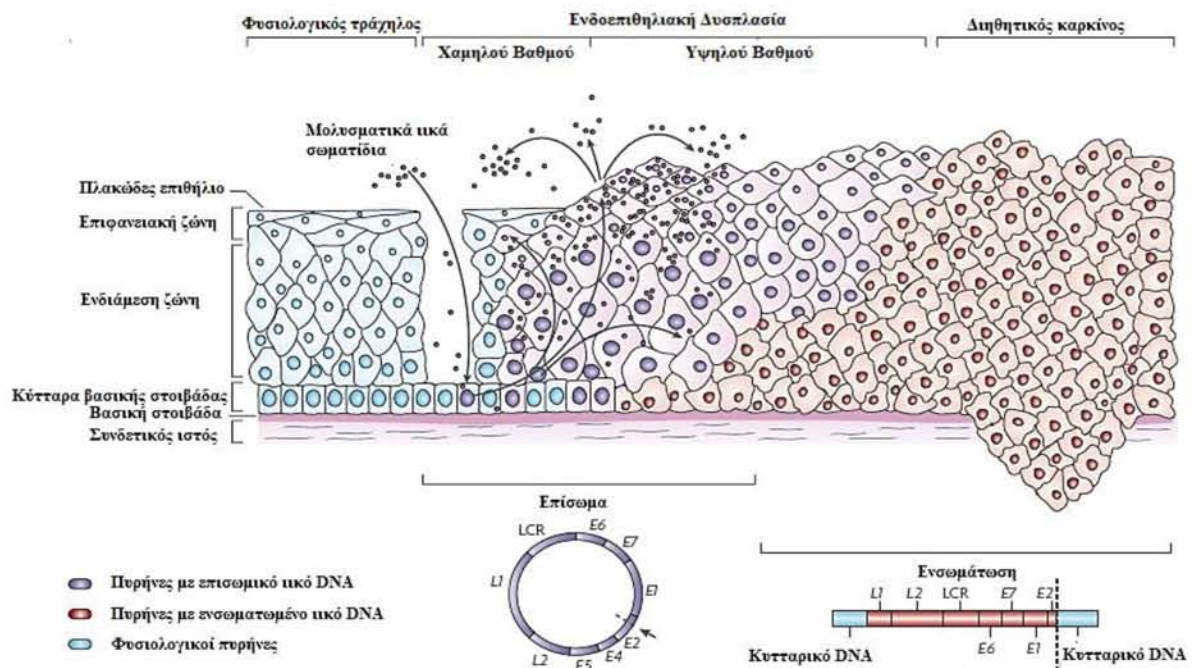
Ο πρώιμος υποκινητής p97 βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των έξι πρώιμων γονιδίων του ιού (E1, E2, E4, E5, E6, E7) στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Από την άλλη, ο όψιμος υποκινητής p670 είναι τοποθετημένος εντός του E7 ORF και ενεργοποιείται στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων επάγει την έκφραση των γονιδίων E1 και E2, επιτρέποντας την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος. Επιπλέον, ο p670 είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων του ιού L1 και L2, η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των ιοσωματίων. [4,10]

1.6.4. Συναρμολόγηση του 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. Αρχικά παράγεται η ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2, ακολουθεί η έξοδος του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και μετά παράγεται η μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη L1. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων. 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.

1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις

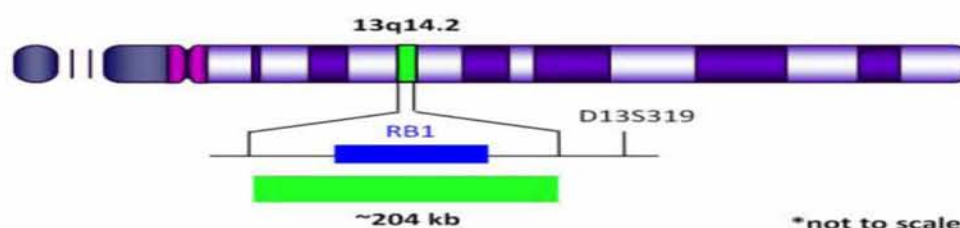
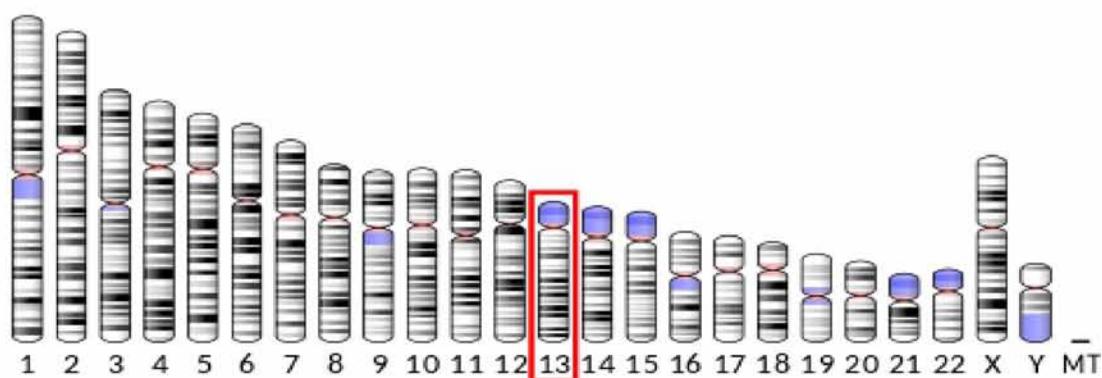
Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων παρουσιάζουν τροπισμό που εξαρτάται από τον τύπο τους για τα επιθήλια του δέρματος και του βλεννογόνου. Προκαλούν ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο, μέχρι νεοπλασίες καλοήθους και κακοήθους φύσεως του τραχήλου της μήτρας. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου προκαλούν λοιμώξεις χαμηλού κινδύνου στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθη θηλώματα, τα οποία μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλειφτούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου, σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι όπως προαναφέρθηκε ο HPV-16, αποτελούν την αιτία αρκετών σοβαρών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος και ένα αυξανόμενο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Οι υψηλής επικινδυνότητας HPV ιοί που συναντώνται στον γενικό πληθυσμό συνήθως προκαλούν στοματοφαρυγγικές αλλοιώσεις ή τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις [10]. Οι τραχηλικές αλλοιώσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες μετά το Test pap σύμφωνα με το σύστημα Bethesda, την πιο σύγχρονη ταξινόμηση που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ιστοπαθολόγοι σήμερα: χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL). [44]



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV. [45]

1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB)

Η γενετική θέση (RB ή RB1) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma protein – pRb) εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13 στο γενετικό τόπο 13q14.2 και πιο συγκεκριμένα στη θέση 13q14.1-q14.2. [46]. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος αποτελεί μέλος της οικογένειας των “rocket” proteins, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται μαζί με τη pRb, οι πρωτεΐνες p107 και p130. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος είναι η πρώτη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που κλωνοποιήθηκε [46]. Ο ρόλος της ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, από την οποία προήλθε το όνομά της, αναγνωρίστηκε μέσα από την μελέτη του γονιδίου *RB1* στο οικογενές ρετινοβλάστωμα (κακοήθης όγκος των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς).



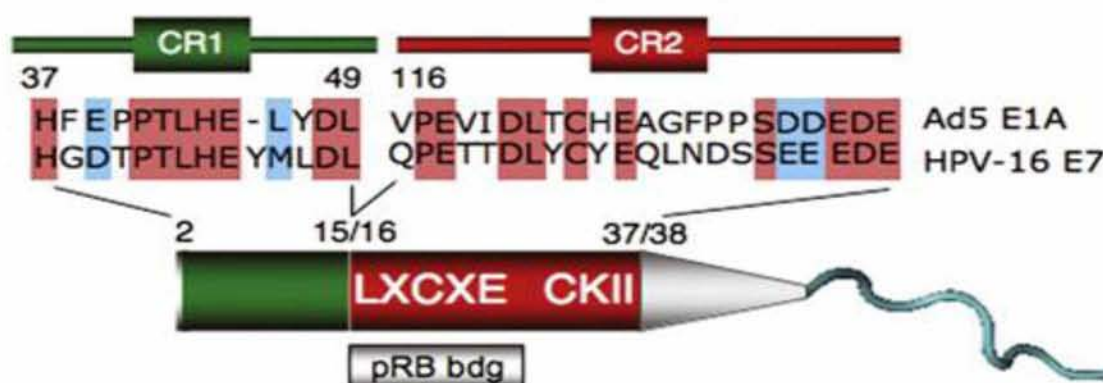
Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση της θέσης του γονιδίου RB1.

Το γονίδιο *RB1* εκτείνεται σε μήκος 180kbp περίπου, στη ζώνη q 14 του χρωμοσώματος 13 και αποτελείται από ένα μεγάλο και 26 μικρά εξώνια [47],

κωδικοποιώντας μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 105kDa, η οποία αποτελείται από 928 αμινοξέα. Τα πρώτα συμπεράσματα σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες αυτής της πρωτεΐνης προήλθαν από μελέτες αλληλεπίδρασης της με ικές πρωτεΐνες. Έτσι δείχτηκε ότι οι ικές πρωτεΐνες συνδέονται σε μια περιοχή της τριτοταγούς δομής της pRb που καλείται τσέπη (rocket), απενεργοποιούν την πρωτεΐνη με αποτέλεσμα επαγωγή κυτταρικής διαίρεσης. Αργότερα δείχθηκε ότι και σε πολλούς όγκους αυτή η περιοχή υφίσταται μεταλλάξεις ή απώλειες, με αποτέλεσμα διαταραχή στη λειτουργία της πρωτεΐνης [47].

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

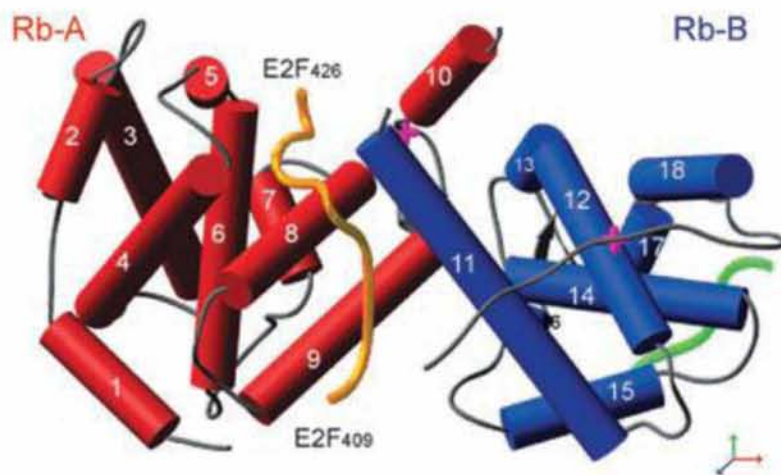
Τα μέλη της οικογένειας RB μοιράζονται πολλές δομικές ιδιότητες. Η πιο συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των πρωτεϊνών pRB, p107 και p130 είναι η περιοχή που ονομάζεται "small rocket" και αποτελείται από τις περιοχές A και B που χωρίζονται από μία εύκαμπτη περιοχή που ονομάζεται "spacer". Στις περιοχές A και B που είναι γνωστές και ως AB rocket, προσδένονται ικές ογκοπρωτεΐνες όπως π.χ η E7 πρωτεΐνη του HPV, η πρωτεΐνη του αδενοϊού E1A, καθώς και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν μια σταθερή αλληλουχία LXCXE. Ο συνδυασμός της περιοχής "small rocket" με το C-τελικό άκρο συγκροτεί τη περιοχή που ονομάζεται "large rocket" από τη οποία εξαρτάται η ικανότητα ογκοκαταστολής των πρωτεϊνών RB.[49]



Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση της ομοιότητας των αμινοξέων της E7 του HPV-16 και της E1A του αδενοϊού, καθώς και η θέση της περιοχής LXCXE που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των πρωτεϊνών αυτών με τη pRB.[57]

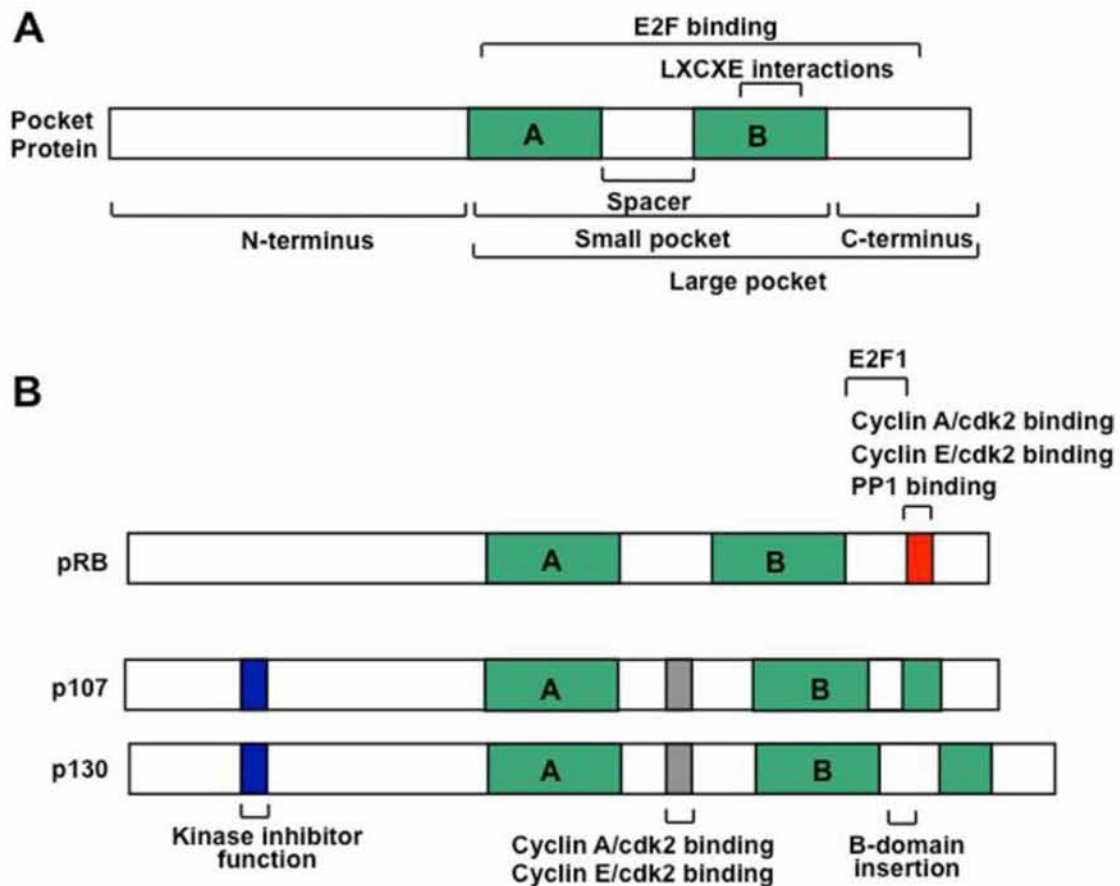
Η περιοχή "large rocket" αλληλοεπιδρά με τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F που απαρτίζεται από 6 μέλη (E2F-1 έως E2F-6). Το χαρακτηριστικότερο μέλος της οικογένειας είναι η E2F-1. Η σύνδεση RB-E2F αναστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αλληλεπίδραση με τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας RB που παίζει βασικό ρόλο στην ικανότητά τους να ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρόλο που η θέση σύνδεσης του E2F διαφέρει από τη περιοχή σύνδεσης της αλληλουχίας LXCXE, η δέσμευση ικών ογκοπρωτεϊνών μέσω του

μοτίβου LXCXE τις φέρνει κοντά στο συνδεδεμένο E2F και έτσι μια διαφορετική περιοχή της ικής πρωτεΐνης μπορεί να διαταράξει τη δέσμευση μεταξύ του E2F και των πρωτεϊνών της οικογένειας RB. Αυτό υπογραμμίζει περαιτέρω τη σημασία της αλληλεπίδρασης RB-E2F διότι η διακοπή της είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό των κυττάρων μέσω της δράσης ικών ογκοπρωτεϊνών. [50]



Εικόνα 1.15: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της pRB, όπου οι έλικες της περιοχής A απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, οι έλικες της περιοχής B απεικονίζονται με μπλε χρώμα και ο E2F και η E7 απεικονίζονται με κίτρινο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα. [58]

Ενώ η συνολική δομή της περιοχής "large pocket" είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των τριών πρωτεϊνών της οικογένειας RB, οι p107 και p130 έχουν περισσότερες ομοιότητες στην αλληλουχία τους από ότι με τη pRB. Παραδόξως, παρότι η πρωτεΐνη pRB θεωρείται ως η σημαντικότερη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη της οικογένειας RB, υπάρχουν ελάχιστα προφανή δομικά χαρακτηριστικά που διαθέτει και λείπουν από τις p107 και p130. Δύο τέτοια μοναδικά χαρακτηριστικά της pRB είναι μία θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F και μια βραχεία πεπτιδική περιοχή στο C-τελικό άκρο που λειτουργεί ως θέση σύνδεσης κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) ή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1). Επίσης οι πρωτεΐνες p107 και p130 περιέχουν παρεμβολές στην περιοχή B της "small pocket". Στην p130 αυτή η επιπρόσθετη περιοχή υπόκειται σε ρυθμιστική φωσφορυλίωση που συμβάλει στη διατήρηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν μεγαλύτερες διαχωριστικές περιοχές από τη pRB, που τους επιτρέπουν να αλληλοεπιδρούν σταθερά με συμπλέγματα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Τέλος, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν μια N-τελική περιοχή που χρησιμεύει στην αναστολή της δράσης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.[48]

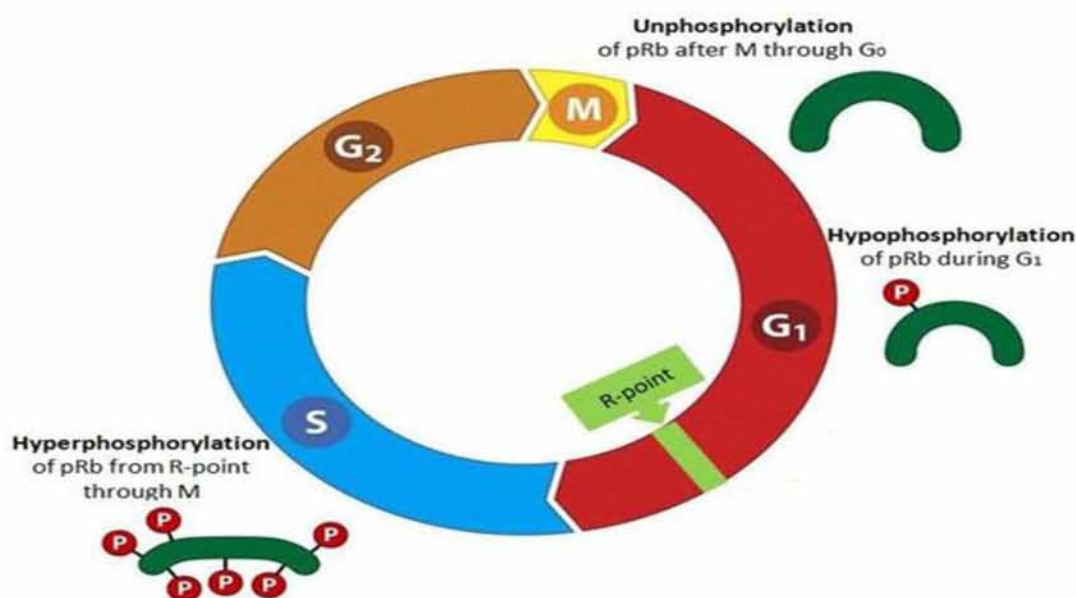


Εικόνα 1.16 Σχηματική αναπαράσταση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης των pRB, p107 και p130. (A) Το κεντρικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας RB είναι το pocket domain. Αρχικά ορίστηκε ως η ελάχιστη περιοχή που είναι απαραίτητη για δέσμευση σε ικές ογκοπρωτεΐνες μέσω του μοτίβου LXCXE και χαρακτηρίζεται ως "small pocket" σε αυτό το διάγραμμα. Η περιοχή «large pocket» είναι η περιοχή καταστολής ανάπτυξης των πρωτεϊνών της οικογένειας RB αφού είναι ικανή να δεσμεύει τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F καθώς επίσης και τις ικές πρωτεΐνες. (B) Σύγκριση των δομών του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης για κάθε πρωτεΐνη της οικογένειας RB. Πρόσθετα χαρακτηριστικά που υπάρχουν στις p107 και p130 πρωτεΐνες είναι, η θέση αναστολής κινάσης, η θέση δέσμευσης κυκλίνης και μία εισαγωγή στην περιοχή B pocket. [48]

1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRB

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν ανάγκη από την ύπαρξη εξωγενών μιτογόνων σημάτων μόνο κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα μόνο κατά τα πρώτα 2/3 της φάσης G1. Εάν το κύτταρο υποστεί συνεχή διέγερση από μιτωτικά σήματα κατά τη χρονική αυτή περίοδο, τότε προχωρά στα επόμενα στάδια του κυτταρικού κύκλου και σε μίτωση ακόμα και αν δεν υποστεί νέα επίδραση μιτογόνων σημάτων. Η συμπεριφορά αυτή υπονοεί πως υπάρχει ένα κομβικό σημείο – κλειδί στο τέλος των πρώτων 2/3 της G1 φάσης το οποίο ονομάζεται σημείο περιορισμού (Restriction point, Rp). Εάν κατά την προηγούμενη χρονική περίοδο τα σήματα που φτάνουν στο κύτταρο δεν είναι ευνοϊκά για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τότε το κύτταρο επανέρχεται στη σιωπηλή φάση G0, ή εισέρχεται σε μία μετα-μιτωτική, διαφοροποιημένη κατάσταση. Παρατηρείται λοιπόν πως η διάβαση από το Rp είναι το βασικό και κεντρικό γεγονός για τον έλεγχο του φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. [51]

Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος είναι ο μοριακός «διακόπτης – ελέγχου» του R_p. Η πρωτεΐνη αυτή απαντάται σε όλα τα κύτταρα που έχουν μελετηθεί σε δύο μορφές: την υποφωσφορυλιωμένη ενεργό (pRb) και την υπερφωσφορυλιωμένη ανενεργό (pRb-P) μορφή. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G₀ ή στα πρώτα 2/3 της G₁, περιέχουν την ενεργό υποφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Rb η οποία συνδέεται με την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων E2F (E2F-1, E2F-2, E2F-3, E2F-4, E2F-5, E2F-6) και εμποδίζει τη μεταγραφή γονιδίων τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα στην φάση S του κυτταρικού κύκλου.

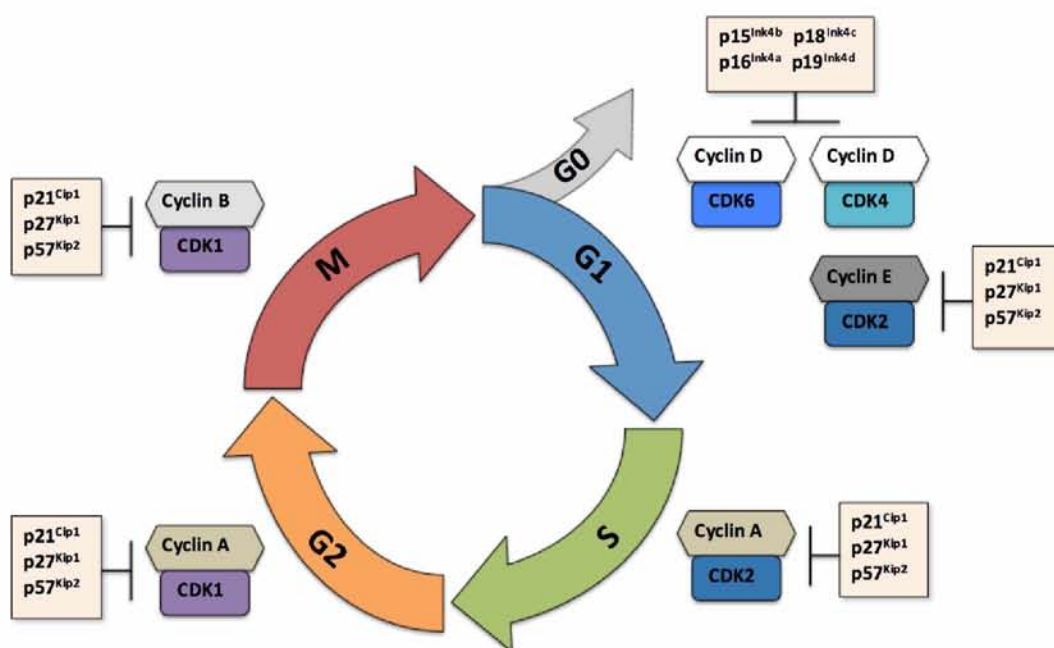


Εικόνα 1.17: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου και του Restriction Point (R_p) καθώς και των σταδίων φωσφορυλίωσης της pRB.[52]

Η μετάβαση του κυττάρου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθοδηγείται από τις κυκλίνες, τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (cyclindependent kinases, CDK) και τους αναστολείς αυτών. Οι CDK καθοδηγούν τον κυτταρικό κύκλο φωσφορυλιώνοντας σημαντικές πρωτεΐνες-στόχους οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μετάβαση του κυττάρου στο επόμενο στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Οι CDK παράγονται συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά σε ανενεργό μορφή. Ενεργοποιούνται όταν φωσφορυλιωθούν συνδεόμενες με μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζονται κυκλίνες. Οι κυκλίνες, αντίθετα με τις CDK, συντίθενται μόνο σε ορισμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, και η αποστολή τους είναι η ενεργοποίηση των CDK. Όταν αυτό συμβεί, τα επίπεδα των κυκλινών ελαττώνονται ταχύτατα [52].

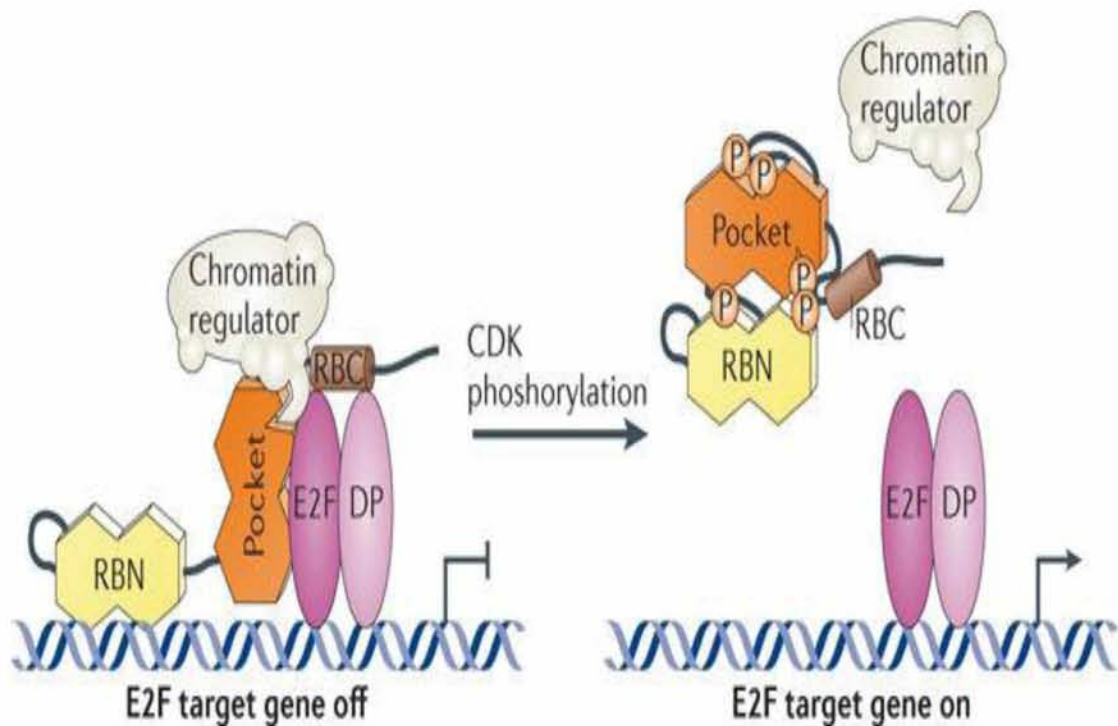
Η δραστηριότητα των CDK ρυθμίζεται από δύο ομάδες αναστολέων των CDK (CDK inhibitors, CKIs). Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις πρωτεΐνες p21 (είναι η πρωτεΐνη που προάγει η p53 για να σταματήσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου), p27, και p57 οι οποίες έχουν μια γενικότερη δράση στις CDK, ενώ η δεύτερη κατηγορία αναστολέων έχει ειδική δράση στα συμπλέγματα κυκλίνη D/CDK4, και κυκλίνη D/CDK6. Σε αυτή τη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες p15, p16, p18 και p19 οι οποίες ονομάζονται και INK4 πρωτεΐνες (p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, p19INK4d).[53]

Όταν κάποιος αυξητικός παράγοντας επιδράσει σε ένα κύτταρο, αυξάνεται (στα αρχικά στάδια της G1 φάσης) η σύνθεση των κυκλινών D (D1, D2 D3) , οι οποίες συνδέονται με τις CDK4 και CDK6. Το σύμπλεγμα κυκλινών D/CDK4-CDK6, προκαλεί μια μερική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb. Σε μεταγενέστερο στάδιο της φάσης G1, αυξάνεται η σύνθεση της κυκλίνης E, η οποία συνδέεται με τις CDK2. Το σύμπλεγμα κυκλίνης E/CDK2 προκαλεί την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb. Τα συμπλέγματα κυκλίνη A/CDK2 και κυκλίνη B/CDC2 διατηρούν την πρωτεΐνη Rb σε κατάσταση υπερφωσφορυλίωσης κατά τα επόμενα στάδια του κυτταρικού κύκλου έτσι ώστε η Rb να μην αποσφωσφορυλιωθεί μέχρι το κύτταρο να ολοκληρώσει τη μίτωση και να εισέλθει ξανά στη G1 φάση (ή τη G0) [53].



Εικόνα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης και συγκρότησης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών σε κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου και των CDKIs τους.[53]

Η υπερφωσφορυλίωση της Rb έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της, δηλαδή την αποδέσμευσή της από το σύμπλεγμα των μεταγραφικών παραγόντων E2F. Η αποδέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων από το «φρένο» της Rb έχει σαν αποτέλεσμα την μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τη σύνθεση του. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F απαρτίζεται από 6 μέλη (E2F-1 έως E2F-6). Το χαρακτηριστικότερο μέλος της οικογένειας είναι η E2F-1. Η υπερφωσφορυλίωση της Rb οδηγεί στην «απελευθέρωση» της E2F-1 και την έναρξη της έκφρασης των γονιδίων-στόχων της. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με α) τη σύνθεση του DNA (π.χ η θυμιδίνη κινάση, η histone deacetylase-1, η DNA-πολυμεράση-α), β) τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (π.χ η κυκλίνη E, η κυκλίνη A οι cdk2 και 4), γ) την έκφραση των “rocket” πρωτεϊνών (pRb, p107), δ) τον έλεγχο των πρωτο-ογκογονιδίων (π.χ myc, myb), ε) την αυτορρύθμιση της μεταγραφής των E2F-1 και E2F-2 παραγόντων, και στ) την απόπτωση με σταθεροποίηση της p53 μέσω της έναρξης έκφρασης του p14ARF [54].



Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της pRB. Η φωσφορυλίωση της pRB από τις κυκλολεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F που επάγει την μεταγραφή γονιδίων που επάγουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S. [70]

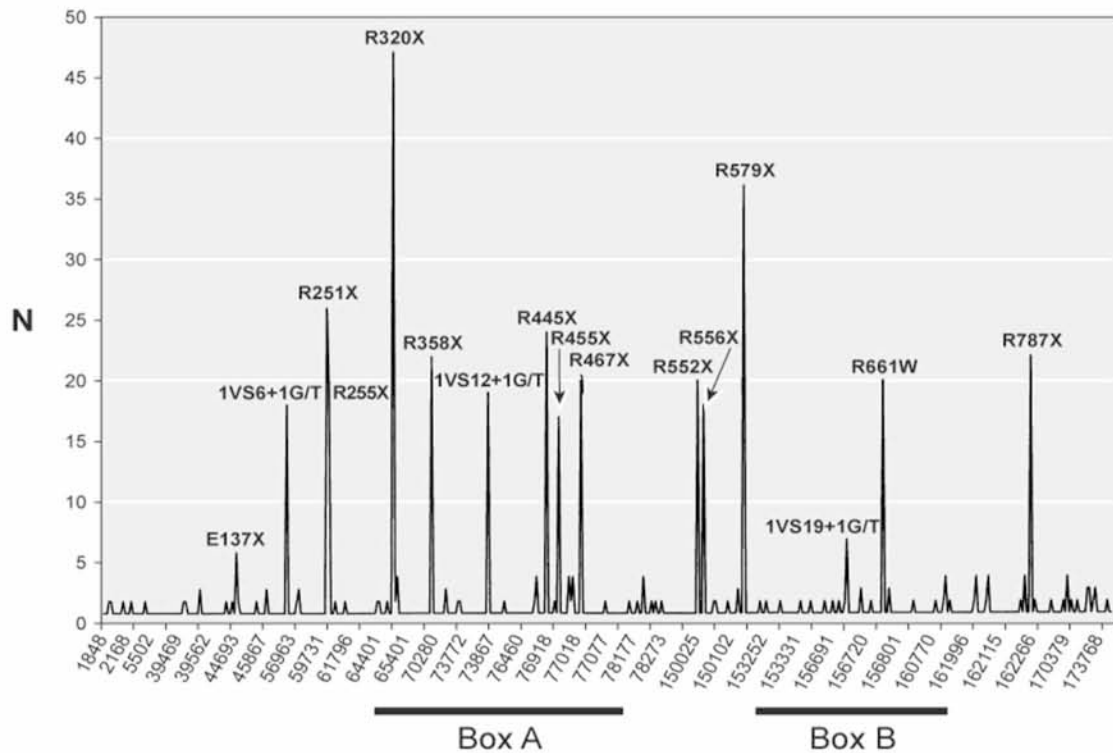
1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1

Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1 έχουν ελεγχθεί κυρίως στον καρκίνο του ρετινοβλαστώματος αλλά και σε αρκετούς άλλους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.

Το φάσμα των μεταλλάξεων του RB1 έχει αναλυθεί με τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος συχνά απενεργοποιείται από ελλείψεις (deletions) και από nonsense μεταλλάξεις, παρότι το κύριο γεγονός αδρανοποίησης στις περισσότερες γενετικές ασθένειες είναι οι missense μεταλλάξεις.
2. Περίπου το 40% των γονιδιακών μεταλλάξεων του RB1 είναι επαναλαμβανόμενες και συγκεντρώνονται σε δεκαέξι "hotspots", συμπεριλαμβανομένων δώδεκα nonsense μεταλλάξεις, δύο missense μεταλλάξεις και τρεις μεταλλάξεις ματίσματος. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις είναι διάσπαρτες κατά μήκος του RB1, και εντοπίζονται συχνότερα στα εξώνια 9, 10, 14, 17, 18, 20 και 23.
3. Η ανάλυση των μεταλλάξεων του RB1 ανά χώρα προέλευσης των ασθενών ταυτοποιεί δύο ομάδες στις οποίες ο αριθμός των μεταλλάξεων missense, nonsense, ματίσματος και μεταλλάξεων που επηρεάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης διαφέρουν. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την εμπλοκή προδιάθεσης εθνικής προέλευσης.

4. Οι περισσότερες από τις αναφερόμενες μεταλλάξεις σε οικογένειες χαμηλής διείσδυσης χωρίζονται σε τρεις ομάδες: α) Μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές αλληλουχίες στον προαγωγό με αποτέλεσμα τη χαμηλή έκφραση της φυσιολογικής pRB. β) Missense μεταλλάξεις μοτίβα μη βασικών αλληλουχιών που έχουν σαν αποτέλεσμα μερική απενεργοποίηση των λειτουργιών της pRB. γ) Μεταλλάξεις ματίσματος που οδηγούν στη μείωση του κανονικού ματίσματος του mRNA ή σε εναλλακτικό μάτισμα που οδηγεί σε ελαττωματικά (ασθενή) αλληλόμορφα.[67]

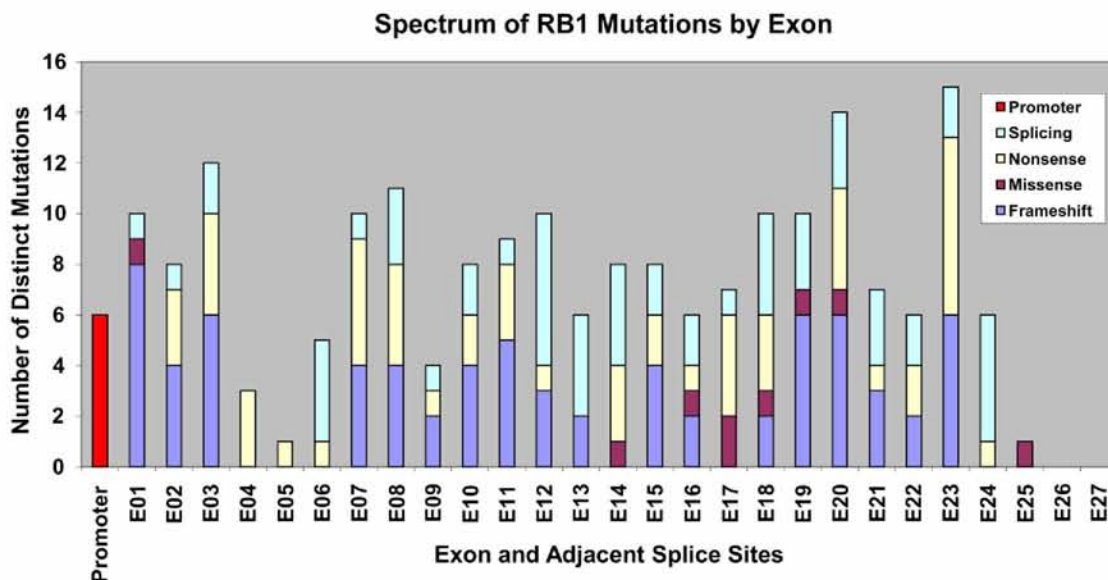


Εικόνα 1.20: Σχηματική αναπαράσταση του RB1 όπου παρουσιάζονται οι θέσεις των συχνότερων μεταλλάξεων (hotspots).[67]

Εκτός από τα σημεία “hotspot”, μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) και σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων ή σε διατάραξη του φυσιολογικού ματίσματος είναι διάσπαρτες κατά μήκος του γονιδίου RB1. Με εξαίρεση τα εξόνια 5, 14, 15, 24, 25 και τα πολύ συντηρημένα εξόνια 26 και 27, μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης κατανέμονται τυχαία κατά μήκος της κωδικής αλληλουχίας του RB1. Οι μεταλλάξεις ματίσματος είναι επίσης ομοιόμορφα κατανομημένες, αλλά δείχνουν προτίμηση για γειτονικές αλληλουχίες ιντρονίων στα εξόνια 6, 12, 16, 17, 19 και 24, τρεις από αυτές ανήκουν και στις θέσεις “hotspot” όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα. Η κατανομή των σημειακών μεταλλάξεων που αντιστοιχεί σε σημεία “hotspot” φαίνεται επίσης στην παραπάνω εικόνα, όμως αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες missense μεταλλάξεις βρίσκονται στις περιοχές A και B αλλά κυρίως στη περιοχή B, η οποία έχει καθοριστική σημασία για τη δομή τσέπης της pRB, και αποτελείται από τα εξόνια 19 έως 21. [67,68]

Οι missense υποκαταστάσεις μπορούν, υπό ορισμένες περιστάσεις, να οδηγήσουν σε εν μέρει απενεργοποίηση της λειτουργίας της pRB. Στην περίπτωση της πολύ

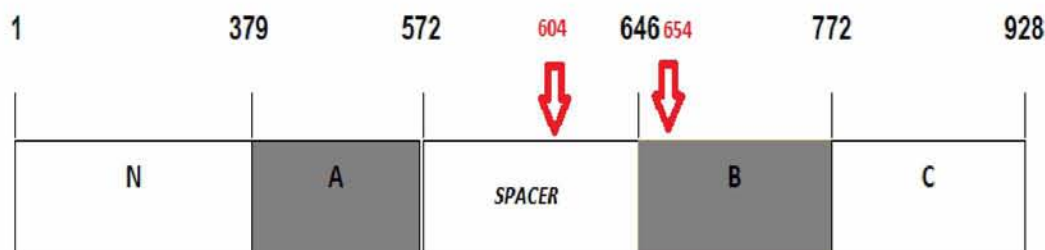
επαναλαμβανόμενης μετάλλαξης R661W. Έχει αποδειχθεί ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη pRB έχει μία θερμοευαίσθητη δραστηριότητα τσέπης (rocket) της οποίας οι διακυμάνσεις μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα τον φαινότυπο χαμηλής διείσδυσης.[69]



Εικόνα 1.21: Σχηματική αναπαράσταση της συχνότητας των διαφορετικών τύπων μεταλλάξεων σε κάθε ένα εξόνιο του γονιδίου RB1.[68]

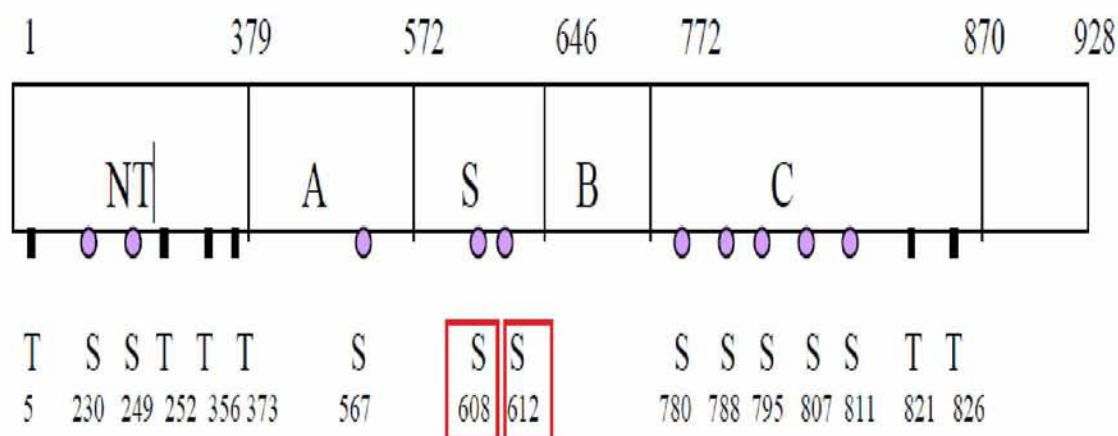
1.8.4 Εξόνιο 19 της πρωτεΐνης pRB

Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγχθηκαν πολυμορφισμοί στο εξόνιο 19 της πρωτεΐνης pRB. Στη πρωτεΐνη pRB μεταξύ του N- τελικού και C- τελικού άκρου διακρίνονται οι περιοχές A (domain A: αμινοξέα 379-572), B (domain B: αμινοξέα 646-772), C (domain C:αμινοξέα 772-870) και μια ενδιάμεση περιοχή (spacer : αμινοξέα 573-645) η οποία είναι απαραίτητη για την ορθή τοποθέτηση σε τρισδιάστατη μορφή των περιοχών A και B. Το εξόνιο 19 (αμινοξέα 604-654) κωδικοποιεί 50 αμινοξέα που διαμορφώνουν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής spacer και την αρχή της περιοχής B.



Εικόνα 1.22: Σχηματική αναπαράσταση της pRB όπου με κόκκινα βέλη απεικονίζονται τα αμινοξέα-άκρα του εξονίου 19.

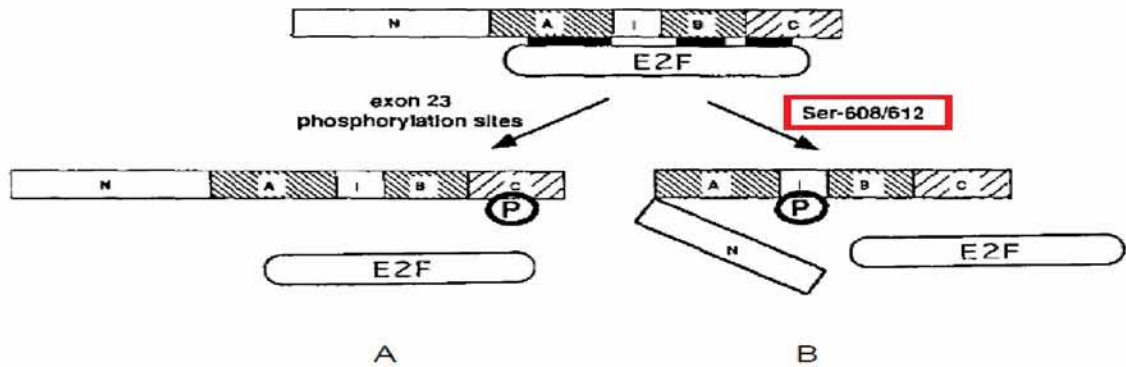
Η πρωτεΐνη Rb διαθέτει 16 πιθανές θέσεις για φωσφορυλίωση από τα συμπλέγματα κυκλινών/ CDK. Ξεκινώντας από το N- τελικό άκρο (απ' όπου ξεκινά και η αρίθμηση των αμινοξέων) είναι οι ακόλουθες : Thr 5, Ser 230, Ser 249, Thr 252, Thr 356, Thr 373, Ser 567, Ser 608, Ser 612, Ser 780, Ser 788, Ser 795, Ser 807, Ser 811, Thr 821, Thr 826 (όπου Thr = Θρεονίνη, Ser = Σερίνη) [55].



Εικόνα 1.23: Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων φωσφορυλίωσης της pRB όπου με κόκκινο είναι επισημασμένα τα αμινοξέα-θέσεις φωσφορυλίωσης Ser 608, Ser 612 που βρίσκονται εξονίου 19. [59]

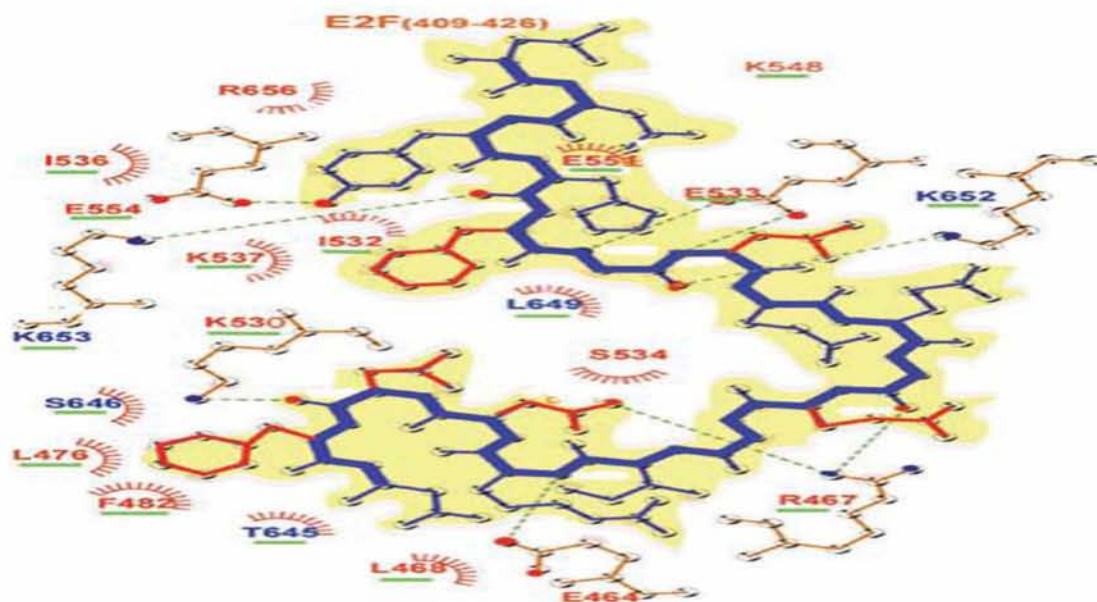
Οι CDKs δεν φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος με τον ίδιο τρόπο. Έτσι, οι περιοχές φωσφορυλίωσης από το σύμπλεγμα κυκλίνη D1/CDK4 είναι διαφορετικές από αυτές του συμπλέγματος κυκλίνη A/CDK2 και κυκλίνη E/CDK2. Βρέθηκε πως, μόνο 2 περιοχές, η Thr 5 και η Ser 795 φωσφορυλιώνονται και από τα 3 συμπλέγματα. [56]

Τα 3 συμπλέγματα των κυκλινών / CDK συνεργάζονται μεταξύ τους για να φωσφορυλιώσουν πλήρως την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Φαίνεται πως, η φωσφορυλίωση από κάθε σύμπλεγμα έχει διαφορετική επίδραση στη βιοχημική λειτουργία της Rb. Όπως προαναφέρθηκε, η υπερφωσφορυλίωση της Rb οδηγεί στην «απελευθέρωση» του E2F-1 και την έναρξη της έκφρασης των γονιδίων-στόχων της. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών E2F από το «φρένο» της Rb μπορεί να γίνει με 2 διαφορετικούς μηχανισμούς. Στην πρώτη περίπτωση (A), η φωσφορυλίωση στις θέσεις φωσφορυλίωσης exon 23 (exon 23 - phosphorylation sites) οδηγεί σε αποδέσμευση των πρωτεϊνών E2F. Στη δεύτερη περίπτωση (B), η φωσφορυλίωση στις θέσεις Ser608 ή/και Ser612 στην περιοχή spacer (exon 19) αναστέλλει επίσης τη σύνδεση των E2F με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. [56]



Εικόνα 1.24: Σχηματική αναπαράσταση των 2 μηχανισμών απελευθέρωσης των πρωτεϊνών E2F από την Rb που μπορεί να γίνει με φωσφορυλίωση στα αμινοξέα-θέσεις φωσφορυλίωσης Ser 608, Ser 612 που βρίσκονται στην περιοχή spacer του εξονίου 19 (B) είτε στις θέσεις φωσφορυλίωσης του εξονίου 23 (A).

Το εξόνιο 19 του RB1 κωδικοποιεί το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής spacer και την αρχή της περιοχής B της pRB και αυτό το καθιστά πολύ σημαντικό για τη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της χαρακτηριστικής δομής τσέπης της πρωτεΐνης pRB. Επίσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω διαθέτει δύο κατάλοιπα Ser (S608 και S612) που μέσω της φωσφορυλίωσης τους είναι υπεύθυνα για την αποδέσμευση του E2F από τη pRB. Η περιοχή του εξονίου 19 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του E2F στην pRB καθώς υπάρχουν σε αυτή αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση του E2F στην περιοχή τσέπης της pRB, όπως είναι τα T645, S646, L649, K652, K653. [58]



Εικόνα 1.25: Σχηματική αναπαράσταση του άκρου C του E2F με τα αμινοξέα 409-426 να φαίνονται μέσα στο κίτρινο πλαίσιο. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ E2F (409-426) και RbAB παρουσιάζονται ως διακεκομμένες πράσινες γραμμές, ενώ οι υδροφοβες επαφές υποδεικνύονται με κόκκινες ακτίνες. Τα αμινοξέα από τη περιοχή A της pRb είναι χρωματισμένα κόκκινα και αμινοξέα από την περιοχή B είναι μπλε χρώματος. Η θέση των αμινοξέων υπογραμμίζεται με πράσινο χρώμα. Οι πλευρικές αλυσίδες του E2F είναι χρωματισμένες με κόκκινο χρώμα. [58]

Κεφάλαιο 2^ο

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών του εξονίου 19 του γονιδίου RB1 σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό με στόχο την εύρεση πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Κεφάλαιο 3^ο

Υλικά και μέθοδοι

3.1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 67 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό (22 αρνητικά για HPV-16 και 55 θετικά για HPV-16). Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2010-2015 από το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αθηνών «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ», το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας και από ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep ή σε μονιμοποιημένο ιστό σε παραφίνη.

Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες:

- 22 δείγματα αρνητικά για HPV-16 (πίνακας 3.1)
- 21 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 3.2)
- 24 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (πίνακας 3.3)

Τα θετικά για HPV-16 δείγματα χωρίστηκαν στις παραπάνω ομάδες έπειτα από κυτταρολογική ανάλυση.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LBC 1	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 2	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 3	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 4	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 7	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 10	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 13	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 14	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 15	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 19	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

LBC 20	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 61	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 63	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 64	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 65	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 66	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 67	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 68	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 69	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 70	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 71	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 72	αρνητικό για HPV-16	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.1 Είκοσι δύο κλινικά δείγματα αρνητικά για HPV-16 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
LBC 36	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 32	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 26	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 31	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 39	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 29	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 38	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 28	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3500	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

AG 3515	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3807	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3670	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
ΑΤΤ2	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 6	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ8	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 12	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 22	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 45	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 51	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.2 Εικοσιένα 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
LBC 46	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 57	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 42	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 44	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 60	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 52	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
LBC 56	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
AG 3578	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
AG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ

AG 3623	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
Δ3	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Ιστός σε παραφίνη	Ιδιωτικό εργαστήριο
ΠΝΛ 1	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 11	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 12	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 13	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΠΝΛ 15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
ΑΤΤ 4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 20	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 20	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ 80	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.3 Εικοσιτέσσερα κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση των δειγμάτων, την κλινική εικόνα του ασθενούς, το υλικό μέσο συλλογής και την προέλευσή τους.

3.2. Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

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

Σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml τοποθετήθηκαν 10μl γλυκογόνου (100mg/ml), 300μl Lysis Buffer GuSCN (σύσταση: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol, 25mM sodium citrate) και 100μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), τα σωληνάρια αναδεύτηκαν ισχυρά και πραγματοποιήθηκε επώαση στους -20°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000gcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% (-20°C). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 14.000 gcf στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού ελεύθερου DNAσων και RNAσων . [42]

Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Η επιβεβαίωση της ακεραιότητας του εκχυλισμένου DNA και ο έλεγχος της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε με μια Multiplex-PCR παράλληλα με την ταυτοποίηση των δειγμάτων., όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.3. Έλεγχος εκχύλισης και ταυτοποίηση δειγμάτων

Ο έλεγχος της εκχύλισης του DNA καθώς και η ταυτοποίηση των HPV-16 θετικών δειγμάτων έγινε με μία MultiplexPCR [43]. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μόνο το PrimerMix I(επειδή περιέχει το ζεύγος εκκινητών για τον HPV-16) καθώς και το ζεύγος εκκινητών για την β-ακτίνη που χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της PCR.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν PCR
β-ακτίνη	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	498 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	
HPV-16	HPV16 L1F	CACTATTTTGGAGGACTGGAAT	291 bp
	HPV16 L1R	GATGAGGTGGTGGGTGTAGC	
HPV-45	HPV45 L1F	TTTTATCATGCAGGCAGTTCC	233 bp
	HPV45 L1R	CCACGACCAATTTCCATACC	
HPV-66	HPV66 L1F	CGCCGTAAACGTATTCCTA	168 bp
	HPV66 L1R	CCAACAGCAAGCAACCTAGA	

Το PrimerMix I περιείχε 25 pmol του κάθε ζεύγους εκκινητών και 10 pmol του ζεύγους β-ακτίνης. Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε το μείγμα των εκκινητών, 5X KAPA2G Buffer A (KAPA, Boston, Massachusetts, USA) το οποίο περιείχε 2mM MgCl₂, 1.2mM dNTPs και 0.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA2GFast DNA polymerase, KAPA, Boston, Massachusetts, USA).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 1 min. Για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 58 °C για 50 sec, επέκταση στους 72 °C για 10 sec. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 1 min.

Η ταυτοποίηση των θετικών για HPV-16 δειγμάτων έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.4. Ανάλυση πολυμορφισμών του εξονίου 19 του RB1

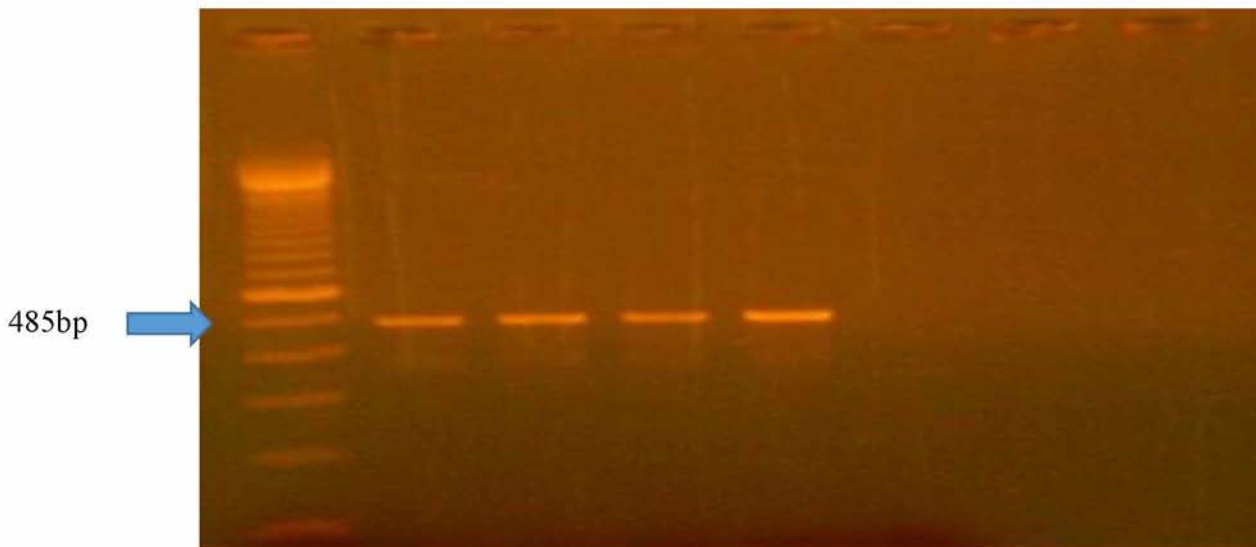
3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει το εξόνιο 19

Με την μέθοδο της PCR ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου RB1 μήκους 485 bp το οποίο περιέχει το εξόνιο 19 της pRB και τμήμα των εξωτερικών του ιντρονίων.[60] Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl τα οποία περιείχαν το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 50pmol, 1 mM dNTPs, 2U θερμοανθεκτικής Paq DNA πολυμεράσης και 1X Paq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl₂.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
RB1F (forward)	AGGCAGTAATCCCCAGGAAAAGCCA
RB1R (reverse)	CACAGAGATATTAAGTGACTTGCCC

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min. Για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 20sec, υβριδοποίηση στους 60 °C για 20 sec, επέκταση στους 72 °C για 20 sec. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 min.

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



Εικόνα 3.1: Ενδεικτική φωτογραφία του αποτελέσματος της PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 485 bp .

3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων

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

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης που περιέχει 50% σουκρόζη και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

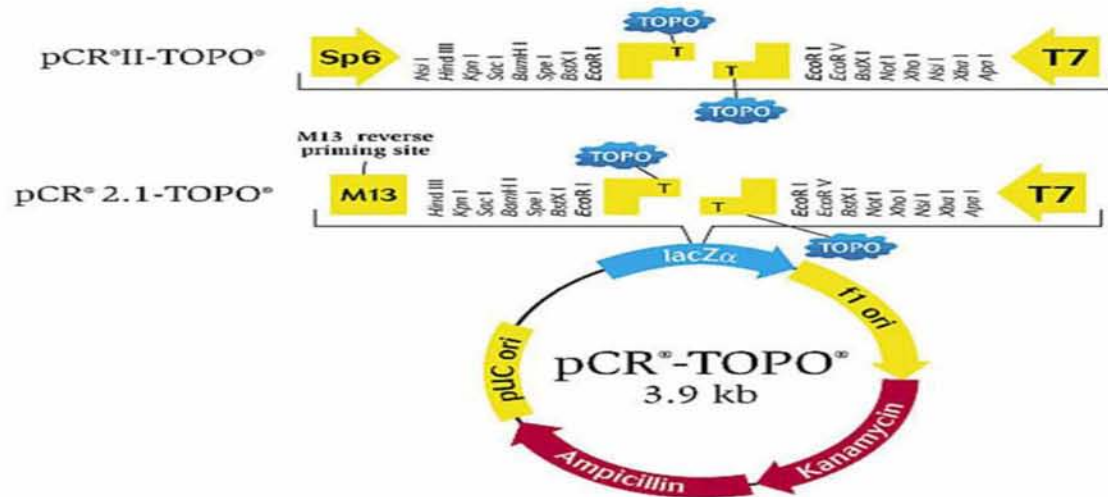
Αφού εκτεθεί το πήκτωμα αγαρόζης σε ακτινοβολία UV, ακολουθεί η απομόνωση των προϊόντων της PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του Gel Extraction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

3.4.4. Μοριακή κλωνοποίηση

Πριν την αλληλούχιση τμημάτων DNA είναι απαραίτητο να μην υπάρχουν μείγματα, 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 προσθήκη άκρων A στα τμήματα DNA β) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, γ) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων δ) Colony PCR (προαιρετικό στάδιο) ε) δημιουργία υγρών καλλιιεργειών στ) η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων ζ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

α) Προσθήκη άκρων A : Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της τοποϊσομεράσης πρέπει να προηγηθεί αυτό το βήμα. Συγκεκριμένα, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl τα οποία περιέχουν 7 μl καθαρισμένου DNA, 5U KAPA Taq Pol , 1X KAPA Taq Buffer, 0,2 mM dATPs και ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από ddH₂O. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 72 °C για 30 min.

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



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

γ) Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων : Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε ολόκληρη την ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η προσθήκη 800μl LB Broth και 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.

δ) Colony PCR : Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα επιπλέον βήμα ελέγχου του ανασυνδυασμού των πλασμιδιακών φορέων. Με την Colony PCR μπορούμε γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια να επιβεβαιώσουμε την ένθεση. Συγκεκριμένα, επιλέγουμε 2-3 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και δημιουργούμε εναιώρημα σε 15 μl ddH₂O για την κάθε αποικία. Έπειτα μεταφέρουμε 3 μl του εναιωρήματος σε πλαστικούς σωλήνες και πραγματοποιείται λύση των βακτηρίων με θέρμανση στους 95 °C για 15 min. Στη συνέχεια κάνουμε spin down τους πλαστικούς σωλήνες και τους τοποθετούμε στον πάγο για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθεται το MasterMix και πραγματοποιείται PCR. Το MasterMix περιέχει το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 25pmol, 1 mM dNTPs, 2,5U θερμοανθεκτικής Paq DNA πολυμεράσης και 1X Paq DNApol Buffer μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl₂.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες : Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min. Για 30 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 20sec, υβριδοποίηση στους 60 °C για 20 sec, επέκταση στους 72 °C για 20 sec.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε το μοναδικό προϊόν στο μέγεθος του ενθέματος (485bp).

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

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

ζ) 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 1 h στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, τα προϊόντα τα αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε την ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος.

3.4.5. 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.

3.4.6. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος κάθε χρωματογραφήματος για την ποιότητά του και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως προς την ειδικότητά τους αρχικά μέσω επεξεργασίας τους με το πρόγραμμα GeneRunner και έπειτα μέσω ομοπαράθεσης με το πρόγραμμα MEGA με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του RB1, η οποία είναι διαθέσιμη στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων NCBI. Με το πρόγραμμα MEGA ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των ιντρονίων πριν και μετά του εξονίου 19 και η πρωτεϊνική αλληλουχία του εξονίου 19. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξελικτική ανάλυση του εξονίου 19, για να εντοπιστούν νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλλαγές, οι οποίες μπορεί να συσχετιστούν με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης

Η αξιολόγηση της επιλεκτικής πίεσης που επιδρά στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1 πραγματοποιήθηκε μετά από πολλαπλή ομοπαράθεση, μεταξύ των αλληλουχιών κάθε γονιδίου ξεχωριστά και της πρότυπης αλληλουχίας του γονιδίου RB1. Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS. Ο ρυθμός dN/dS είναι μία διαδεδομένη στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω της απλότητας και της αξιοπιστίας της. Ο λόγος dN/dS είναι ο ρυθμός που προσδιορίζει τον αριθμό των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά μη-συνώνυμη θέση (dN) προς τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά συνώνυμη θέση (dS) [61].

Οι υποκαταστάσεις σε συνώνυμες (σιωπηλές) και μη συνώνυμες (μη σιωπηλές) θέσεις διαφοροποιούνται μεταξύ ουδέτερων και ενεργών εξελικτικών δυνάμεων που ασκούνται σε γονίδια. Ο ρυθμός dN/dS δίνει ένδειξη για τον τρόπο και την δύναμη της εξέλιξης. Πιο συγκεκριμένα, περίσσεια μη συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS > 1$) αποτελεί ένδειξη θετικής επιλεκτικής πίεσης (δρά η φυσική επιλογή), ενώ περίσσεια συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS < 1$) δείχνει αρνητική επιλεκτική πίεση (αναστολή της φυσικής επιλογής). Επιπλέον, καμία διαφορά μεταξύ συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων ($dN/dS = 1$) αποτελεί ένδειξη ουδετερότητας (τυχαία σταθεροποίηση ουδέτερων μεταλλάξεων) [62].

Ο ρυθμός dN/dS υπολογίστηκε με την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας μέσω του προγράμματος SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-synonymous Analysis Program) [63].

Επιπλέον, για να προσδιοριστεί η ύπαρξη θετικής επιλεκτικής πίεσης ($dN/dS > 1$) σε συγκεκριμένα κωδικόνια εντός των γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός θετικής επιλεκτικής πίεσης με την Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του διακομιστή Selecton 2.4 [63].

3.4.8. Εξελικτικά μοντέλα

Στην ουσία, ένα εξελικτικό μοντέλο περιγράφει με όρους πιθανότητας πώς οι χαρακτήρες (στην περίπτωση μας - κωδικόνια) εξελίσσονται κατά μήκος ενός φυλογενετικού δέντρου. Ο κύριος στόχος κατά την οικοδόμηση ενός εξελικτικού μοντέλου είναι να εξασφαλιστεί ότι είναι αρκετά εκφραστικό για να περιγράψει τη βιολογική πραγματικότητα, αλλά δεν υπερβαίνει τις παρατηρούμενες ακολουθίες. Το Selecton εφαρμόζει διάφορα μοντέλα κωδικονίου, καθένα από τα οποία λαμβάνει διαφορετικές βιολογικές υποθέσεις. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα αυτών των μοντέλων είναι ότι επιτρέπουν την αντίθεση διαφορετικών υποθέσεων, ελέγχοντας ποιο μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα. Στην περίπτωση του Selecton, η υπόθεση είναι είτε η θετική επιλογή που ασκείται πάνω στην πρωτεΐνη που μελετάται, και αυτό αντιπαραβάλλεται με μια μηδενική (null) υπόθεση που υποθέτει ότι δεν υπάρχει θετική επιλογή.

Όλα τα μοντέλα του Selecton είναι Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας μοντέλα τα οποία υποθέτουν μια στατιστική κατανομή για να υπολογίζουν τις ετερογενείς τιμές

dN/dS μεταξύ των τοποθεσιών. Επειδή η εργασία με συνεχείς διανομές είναι υπολογιστικά έντονη, η κατανομή είναι προσεγγισμένη με (ξεχωριστά) 8 διακριτές κατηγορίες. Λεπτομέρειες για κάθε μοντέλο διατίθενται στην αναφορά:

- M8 [64]
Αυτό είναι το προεπιλεγμένο μοντέλο για όλες τις εργασίες του Selecton. Επιτρέπει τη θετική επιλογή που λειτουργεί σε μία πρωτεΐνη. Μια αναλογία p_0 των θέσεων αντλείται από μία βήτα κατανομή (η οποία ορίζεται σε διάστημα $[0,1]$), και μια αναλογία $p_1 (= 1-p_0)$ των θέσεων αντλείται από μια πρόσθετη κατηγορία ω_s (η οποία είναι περιορισμένη να είναι ≥ 1). Έτσι, οι θέσεις που προέρχονται από τη beta κατανομή είναι τοποθεσίες που υφίστανται αρνητική επιλογή, ενώ τοποθεσίες που προέρχονται από την κατηγορία ω_s είναι τοποθεσίες που έχουν είτε ουδέτερη είτε θετική επιλογή. Τόσο τα p_0 όσο και τα ω_s εκτιμώνται χρησιμοποιώντας ML.
- M8a [65]
Αυτό το μοντέλο είναι ουσιαστικά παρόμοιο με το μοντέλο M8, εκτός του γεγονότος ότι δεν επιτρέπει θετική επιλογή καθορίζοντας το $\omega_s = 1$. Έτσι, επιτρέπεται μόνο ουδέτερη και αρνητική επιλογή. Το μοντέλο M8a είναι ενσωματωμένο (nested) στο μοντέλο M8: εάν σύμφωνα με το μοντέλο M8 το ω_s εκτιμάται ότι είναι 1, λαμβάνουμε το μοντέλο M8a. Αυτό επιτρέπει τη διεξαγωγή δοκιμών υποθέσεων εκτελώντας μια διεργασία Μέγιστης Πιθανοφάνειας (a likelihood ratio test) μεταξύ των δύο μοντέλων για να διαπιστωθεί ποιο μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα.
- M7 [64]
Και πάλι, αυτό το μοντέλο είναι παρόμοιο με το M8, εκτός από το γεγονός ότι αναλαμβάνει μόνο μια beta κατανομή χωρίς πρόσθετη κατηγορία. Έτσι επιτρέπει κυρίως την αρνητική επιλογή στην πρωτεΐνη. Το μοντέλο M7 είναι ενσωματωμένο (nested) στο μοντέλο M8: εάν το p_0 εκτιμάται ότι είναι 1, το μοντέλο M8 συμπίπτει με το μοντέλο M7.
- M5 [64]
Το μοντέλο αυτό υποθέτει ότι τα dN/dS μεταξύ των τοποθεσιών είναι διανεμημένα σε gamma κατανομή. Σε αντίθεση με τη beta κατανομή, η κατανομή gamma δεν περιορίζεται και επομένως μπορεί να επιτρέψει αρνητική, ουδέτερη και θετική επιλογή. Ωστόσο, το μειονέκτημα του μοντέλου είναι ότι κάτω από μια διακριτή κατηγοριοποίηση της κατανομής είναι δυνατόν να μην αποκτηθεί καμία κατηγορία θετικής επιλογής, αν και η θετική επιλογή λειτουργεί πάνω στην πρωτεΐνη.
- MEC [66][64]
Αυτό το μοντέλο είναι το μόνο μοντέλο που παίρνει λαμβάνει υπόψη τις διαφορές τιμές μεταξύ της αντικατάστασης αμινοξέων. Εν συντομία, αυτό το μοντέλο επεκτείνει ένα 20 προς 20 εύρος αμινοξικής αντικατάστασης [όπως τα κοινά χρησιμοποιούμενα JTT matrix] σε ένα εύρος κωδικονίων 61 προς 61. Ως εκ τούτου, όταν υπολογίζεται ο λόγος dN/dS, οι διαφορετικές πιθανότητες αντικατάστασης μεταξύ αμινοξέων με ξεχωριστές ιδιότητες λαμβάνονται υπόψη. Για παράδειγμα, όλα τα άλλα μοντέλα του Selecton υποθέτουν ότι το οι εξελικτικοί ρυθμοί της λευκίνης (UUG) αντικαθίστανται

είτε με τρυπτοφάνη (UGG) είτε με φαινυλαλανίνη (UUU) είναι ίσες, καθώς και οι δύο απαιτούν μία μεταστροφή. Ωστόσο, σύμφωνα με το matrix JTT η τελευταία είναι πενταπλάσια πιθανότερη από τη πρώτη. Το πλεονέκτημα του μοντέλου MEC έναντι των άλλων μοντέλων που παρουσιάζονται εδώ είναι ότι με την διαφορετική αντιμετώπιση διαφορετικών αμινοξέων, ο λόγος dN/dS υπολογίζεται διαφορετικά.

Ωστόσο, δεν υπάρχει κανένα null μοντέλο για το μοντέλο MEC. Ως εκ τούτου, για τη διεξαγωγή στατιστικών αναλύσεων, τα αποτελέσματα Akaike Information Content (AICc) συγκρίνονται μεταξύ των μοντέλων MEC και M8a. όσο χαμηλότερη είναι η βαθμολογία AIC, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα και, κατά συνέπεια, το μοντέλο θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

Προκειμένου να ελεγχθεί αν ασκείται θετική εξελικτική πίεση (στατιστικώς σημαντική) σε μία πρωτεΐνη θα πρέπει να ακολουθηθούν δύο βήματα :

Εκτέλεση likelihood ratio test μεταξύ ενός null μοντέλου (το οποίο δεν λαμβάνει υπόψιν τις θέσεις με θετική επιλογή), και ενός εναλλακτικού μοντέλου που τις λαμβάνει υπόψιν. Εν συντομία, αυτό σημαίνει ότι πρέπει να πάρουμε δύο φορές τη διαφορά μεταξύ των δυο βαθμολογιών πιθανότητας (likelihood scores) του μηδενικού (null) μοντέλου και του εναλλακτικού μοντέλου (το οποίο υποθέτει θετική επιλογή) και να το συγκρίνουμε με έναν πίνακα chi-square.

Το Selecton επιτρέπει τη σύγκριση:

- Μεταξύ των μοντέλων M8 και M8a. Αυτή η σύγκριση υποθέτει $DF = 1$ (μία πρόσθετη παράμετρο p_0).
- Μεταξύ των μοντέλων M8 και M7. Αυτή η σύγκριση υποθέτει $DF = 2$ (δύο πρόσθετες παραμέτρους: p_0 και ω_s).
- Μεταξύ του μοντέλου MEC και του μοντέλου M8a ή M7. Αυτά τα μοντέλα δεν είναι ένθετα (nested) και ως εκ τούτου η σύγκριση απαιτεί τη σύγκριση βαθμολογιών AIC.

Κεφάλαιο 4^ο

Αποτελέσματα

4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση στο εξόνιο 19 του RB1

Στην παρούσα εργασία ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου RB1 μήκους 485 bp το οποίο περιέχει το εξόνιο 19 της pRB και της τμήμα των εξωτερικών του ιντρονίων σε 67 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό (22 αρνητικά για HPV-16 και 55 θετικά για HPV-16) που χωρίστηκαν σε 3 ομάδες :

- 22 δείγματα αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)
- 21 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας
- 24 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας

Τα προϊόντα PCR αλληλουχίστηκαν και έπειτα μέσω πολλαπλής ομοπαράθεσης με το πρόγραμμα MEGA με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του RB1 ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξονίου 19 και των ιντρονίων πριν και μετά του εξονίου 19.

Μέσω της πολλαπλής ομοπαράθεσης ΔΕΝ εντοπίστηκε κάποιος συγκεκριμένος πολυμορφισμός ο οποίος να συνδέεται με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης, αλλά παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός διάσπαρτων μεταλλάξεων σε όλο το εύρος της ενισχυμένης περιοχής στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας σε σύγκριση με τα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και με τα δείγματα αρνητικά για HPV-16.

Ο αριθμός των μεταλλάξεων ελέγχθηκε αρχικά στο συνολικό τμήμα 485 bp και στη συνέχεια ξεχωριστά στην περιοχή του ιντρονίου που προηγείται του εξονίου 19 (1 bp – 223 bp του ενισχυμένου τμήματος), στην περιοχή CDS του εξονίου 19 (224 bp – 369 bp του ενισχυμένου τμήματος) και στη περιοχή του ιντρονίου που βρίσκεται μετά από το εξόνιο 19 (370 bp – 485 bp του ενισχυμένου τμήματος).

Κλινική εικόνα	Αριθμός μεταλλάξεων	Αριθμός δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG)	57	13/24 (54,1%)
Χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LG)	10	8/21 (38%)
Αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)	6	5/22 (22,7%)

Πίνακας 4.1.1 : Στον πίνακα παρουσιάζονται για κάθε ομάδα δειγμάτων ξεχωριστά, ο αριθμός μεταλλάξεων και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις στο **συνολικό ενισχυμένο τμήμα 485 bp**. Όπως φαίνεται και στον πίνακα ο αριθμός των μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και στα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16. Επίσης από τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας που ελέγχθηκαν τα 13 έφεραν μεταλλάξεις (54,1%), ποσοστό μεγαλύτερο από ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα δείγματα αρνητικά για HPV-16 όπου ήταν 38% και 22,7% αντίστοιχα.

Κλινική εικόνα	Αριθμός μεταλλάξεων	Αριθμός δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG)	26	11/24 (45,8%)
Χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LG)	6	4/21 (19%)
Αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)	3	2/22 (9%)

Πίνακας 4.1.2 : Στον πίνακα παρουσιάζονται για κάθε ομάδα δειγμάτων ξεχωριστά, ο αριθμός μεταλλάξεων και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις στην **περιοχή του ιντρονίου που προηγείται του εξονίου 19** (1 bp – 223 bp του ενισχυμένου τμήματος). Όπως φαίνεται και στον πίνακα ο αριθμός των μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και στα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16. Επίσης από τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας που ελέγχθηκαν τα 11 έφεραν μεταλλάξεις (45,8%), ποσοστό μεγαλύτερο από ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα δείγματα αρνητικά για HPV-16 όπου ήταν 19% και 9% αντίστοιχα.

Κλινική εικόνα	Αριθμός μεταλλάξεων	Αριθμός δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG)	26	11/24 (45,8%)
Χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LG)	2	2/21 (9,5%)
Αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)	2	2/22 (9%)

Πίνακας 4.1.3 : Στον πίνακα παρουσιάζονται για κάθε ομάδα δειγμάτων ξεχωριστά, ο αριθμός μεταλλάξεων και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις στην **περιοχή CDS του εξονίου 19** (224 bp – 369 bp του ενισχυμένου τμήματος). Όπως φαίνεται και στον πίνακα ο αριθμός των μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και στα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16. Επίσης από τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας που ελέγχθηκαν τα 11 έφεραν μεταλλάξεις (45,8%), ποσοστό μεγαλύτερο από ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα δείγματα αρνητικά για HPV-16 όπου ήταν 9,5% και 9% αντίστοιχα.

Κλινική εικόνα	Αριθμός μεταλλάξεων	Αριθμός δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG)	5	3/24 (12%)
Χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LG)	2	2/21 (9%)
Αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)	1	1/22 (4%)

Πίνακας 4.1.4 : Στον πίνακα παρουσιάζονται για κάθε ομάδα δειγμάτων ξεχωριστά, ο αριθμός μεταλλάξεων και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις στη **περιοχή του ιντρονίου που βρίσκεται μετά από το εξόνιο 19** (370 bp – 485 bp του ενισχυμένου τμήματος). Όπως φαίνεται και στον πίνακα στην περιοχή του ιντρονίου που βρίσκεται μετά από το εξόνιο 19 εντοπίστηκαν λίγες μεταλλάξεις συγκριτικά με τις άλλες γενωμικές περιοχές που ελέγχθηκαν αλλά και πάλι οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αλλά και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις ήταν μεγαλύτερος στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας σε σύγκριση με τα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και τα δείγματα αρνητικά για HPV-16 .

4.2 Έλεγχος αμινοξικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 19 του RB1

Με το πρόγραμμα MEGA και την πρότυπη αλληλουχία του CDS ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 19 και στα 67 δείγματα. Παρακάτω παρουσιάζονται :

- Ο συγκεντρωτικός πίνακας με τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν και στα 67 δείγματα που ελέγχθηκαν
- Οι εικόνες των πολλαπλών ομοπαράθεσεων για τις τρεις ομάδες δειγμάτων ξεχωριστά.
- Πίνακας που φαίνονται οι θέσεις των αμινοξικών καταλοίπων που εμπλέκονται στη σύνδεση (pRB - E7) καθώς και τα δείγματα που εμφάνισαν μεταλλάξεις στα κατάλοιπα αυτά.

Κλινική εικόνα	Αριθμός μεταλλαγών αμινοξέων	Αριθμός δειγμάτων που φέρουν μεταλλαγές
Υψηλού βαθμού δυσπλασίας (HG)	21	9/24 (37,5 %)
Χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LG)	1	1/21 (4%)
Αρνητικά για HPV-16 (φυσιολογικά)	0	0/22 (0%)

Πίνακας 4.2.1 : Στον πίνακα παρουσιάζονται για κάθε ομάδα δειγμάτων ξεχωριστά, ο αριθμός αμινοξικών μεταλλάξεων και ο αριθμός των δειγμάτων που έφεραν μεταλλάξεις **στην αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 19** (604 – 652 : 48 αμινοξέα). Είναι χαρακτηριστικό ότι από τις 22 αμινοξικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν και στα 67 δείγματα, οι 21 βρέθηκαν σε δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ενώ μόνο μια βρέθηκε στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και καμία μετάλλαξη στην αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 19 δεν εντοπίστηκε στα δείγματα αρνητικά για HPV-16.

Αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη σύνδεση του E2F	Δείγματα που έφεραν μεταλλάξεις
S608	<i>Κανένα δείγμα</i>
S612	<i>AG 3578</i>
T645	<i>Κανένα δείγμα</i>
S646	<i>LBC56</i>
L649	<i>Κανένα δείγμα</i>
K652	<i>Κανένα δείγμα</i>
K653	<i>LBC46, LBC52</i>

Πίνακας 4.2.2 : Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη σύνδεση του E2F στην πρωτεΐνη pRB καθώς και τα δείγματα που έφεραν μεταλλάξεις σε αυτά τα αμινοξέα.

4.3 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 19 πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS με την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας μέσω του προγράμματος SNAP v2.1.1 (Synonymous Non-synonymous Analysis Program).

Για τον έλεγχο της επιλεκτικής πίεσης ελέγχθηκαν από το πρόγραμμα SNAP αρχικά όλα τα δείγματα (67) και στη συνέχεια ξεχωριστά τα δείγματα κάθε ομάδας δειγμάτων, υψηλού βαθμού δυσπλασίας, χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και αρνητικά για HPV-16.

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 19 δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί ξεχωριστά από τα δείγματα των ομάδων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και αρνητικά για HPV-16 διότι έφεραν πολύ λίγες μεταλλάξεις και όταν οι τιμές των rs (η αναλογία των παρατηρούμενων συνώνυμων υποκαταστάσεων: Sd / S) ή pn (το ποσοστό των παρατηρούμενων μη συνώνυμων υποκαταστάσεων: Sd / S) είναι ≥ 0.75 θεωρείται ότι έχει επιτευχθεί κορεσμός και ο μετασχηματισμός Jukes-Cantor δεν μπορεί να γίνει αλλά μπορεί να θεωρηθεί ότι ο λόγος dN/dS είναι < 1 , οπότε ασκείται αρνητική επιλεκτική πίεση.

Από την εξελικτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το εξόνιο 19 του γονιδίου RB1 παρατηρήθηκε ότι και στους δύο πληθυσμούς από τους οποίους υπολογίστηκε ο λόγος dN/dS ήταν > 1 ($dN/dS=1,25$). Με βάση τα αποτελέσματα από τον λόγο των τιμών dN/dS, παρατηρήθηκε ότι ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1.

Στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί η ύπαρξη θετικής επιλεκτικής πίεσης ($dN/dS > 1$) σε συγκεκριμένα κωδικόνια εντός του εξονίου 19, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος

Μπεύζιανής Συμπερασματολογίας. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός θετικής επιλεκτικής πίεσης με την Μπεύζιανή Συμπερασματολογία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του διακομιστή Selecton 2.4 και στο συνολικό πληθυσμό και των 67 δειγμάτων αλλά και ξεχωριστά για τα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας.

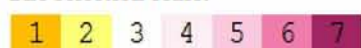
Εκτελέστηκαν και τα 5 μοντέλα (M8, M8a, M7, M5, MEC) και για τους δύο πληθυσμούς :

- Στο σύνολο των 67 δειγμάτων δεν βρέθηκε κάποιο κωδικόνιο που να του ασκείται θετική επιλεκτική πίεση ,στατιστικά σημαντική σε κανένα από τα 5 μοντέλα.
- Όταν ελέγχθηκαν ξεχωριστά τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκε ότι στο κωδικόνιο 14 του εξονίου 19, το οποίο κωδικοποιεί για μία θρεονίνη στη θέση 619 της πρωτεΐνης pRB, ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στατιστικώς σημαντική.
 - Στο μοντέλο M5 το οποίο μπορεί να επιτρέψει αρνητική, ουδέτερη και θετική επιλογή βρέθηκε ότι ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στο κωδικόνιο 14 του εξονίου 19 με $p\text{ value}=0,034$.
 - Μέσω της σύγκρισης του μοντέλου M8 και του null του μοντέλο M8a βρέθηκε ότι ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στο κωδικόνιο 14 του εξονίου 19.

1 11 21 31 41
YLS**1****SPVRS****PKK** **KGST****2****TTRVN****ST** **ANAETQ****3****ATS****A** **FQTQ****4****KPLK****ST** **SLSL****5****FFY****KK**

Legend:

The selection scale:



Positive selection Purifying selection

Εικόνα 4.3.1 : Codon Ka/Ks scores color-coded on the linear sequence : Αυτός ο σύνδεσμος είναι ο κύριος σύνδεσμος στο Selecton και περιλαμβάνει μια προβολή των αποτελεσμάτων Ka / Ks πάνω στην πρωτογενή αλληλουχία της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας μια κλίμακα 7 χρωμάτων. Οι αποχρώσεις του κίτρινου χρώματος (χρώματα 1 και 2) δείχνουν αναλογία Ka / Ks > 1 και οι αποχρώσεις του μωροντό (χρώματα 3 έως 7) δείχνουν λόγο Ka / Ks < 1: {μοντέλο M5}

Κεφάλαιο 5^ο

Συζήτηση

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι παγκοσμίως ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, και προκαλείται, όπως είναι γνωστό, κατά κύριο λόγο από τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μια πολύπλοκη ασθένεια που επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων εκτός από τη μόλυνση από ιό HPV, όπως είναι η επακόλουθη υπερ-ενεργοποίηση των ογκογονιδίων E6 και E7 του HPV καθώς και η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων. [71,72]

Το γονιδίωμα του HPV αντιγράφεται επισωματικά σε κύτταρα ξενιστές, αλλά στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας το DNA τους βρίσκεται συχνά ενσωματωμένο σε χρωμοσώματα του ξενιστή. Ο χρόνος της ενσωμάτωσης του ιού φαίνεται να αντιστοιχεί στην ανάπτυξη υψηλού βαθμού δυσπλασίας ως συνέπεια της έκφρασης υψηλών επιπέδων των E6 και E7. Στην πραγματικότητα, οι E6 και E7 εκφράζονται πάντοτε σε HPV-θετικά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας και παίζουν σημαντικούς ρόλους στην καρκινογένεση καθώς και στη διατήρηση του μετασχηματισμένου φαινοτύπου. Οι E6 και E7 έχουν διάφορες βιολογικές δραστηριότητες αλλά ο κύριος ρόλος τους είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της αδρανοποίησης των βασικών ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, p53 και pRB, αντίστοιχα. [73]

Η ογκοπρωτεΐνη E7 του HPV δεσμεύεται στη pRB μέσω της LXCXE περιοχής της που συνδέεται σε αμινοξέα της περιοχής B της pRB (Tyr 709, Lys 713, Tyr 756, and Asn 757). Η σύνδεση της E7 με την pRB δεν είναι ικανή από μόνη της να διαταράξει τη σύνδεση (pRB-E2F) και να απομακρύνει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F από τη pRB. Επίσης, σε έλεγχο που έγινε σε pRBs που έφεραν μεταλλάξεις στα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση (E7-pRB) αποδείχτηκε ότι η περιοχή σύνδεσης της E7 στη pRB δεν επηρεάζει καθόλου τη σύνδεση (pRB-E2F). [74,75,76]

Οι Frederick A. Dick και Nicholas J. Dyson σε έρευνα που έκαναν ελέγχοντας τη δράση της E7 σε pRBs που έφεραν μεταλλάξεις σε διαφορετικά σημεία της πρωτεΐνης, απέδειξαν ότι εκτός από τη περιοχή σύνδεσης E7-pRB υπάρχουν και άλλες περιοχές στην pRB που επηρεάζουν τη δράση της E7. [50]

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση του εξονίου 19 της pRB (το οποίο διαθέτει πολλά από τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση pRB-E2F) σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας, για να διαπιστωθεί αν η συγκεκριμένη περιοχή επηρεάζει τη δράση της E7 και αν υπάρχουν μεταλλάξεις που συνδέονται με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 67 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό (22 αρνητικά για HPV-16, 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας και 11 δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας).

Κατά τη νουκλεοτιδική ανάλυση ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξονίου 19 και των ιντρονίων εκατέρωθεν του εξονίου 19 και

παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας (57) ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας (10) και στα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16 (6). Επίσης από τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας που ελέγχθηκαν τα 13 έφεραν μεταλλάξεις (54,1%), ποσοστό μεγαλύτερο από ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα δείγματα αρνητικά για HPV-16 όπου ήταν 38% και 22,7% αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα στη περιοχή CDS του εξονίου 19 ο αριθμός των μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας (26) ήταν συντριπτικά μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας (2) και στα δείγματα που ήταν αρνητικά για HPV-16 (2). Επίσης από τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας που ελέγχθηκαν τα 11 έφεραν μεταλλάξεις (45,8%), ποσοστό μεγαλύτερο από ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα δείγματα αρνητικά για HPV-16 όπου ήταν 9,5% και 9% αντίστοιχα.

Κατά την αμινοξική ανάλυση του εξονίου 19, από τις 22 αμινοξικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν και στα 67 δείγματα, οι 21 βρέθηκαν σε δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ενώ μόνο μια βρέθηκε στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και καμία μετάλλαξη δεν εντοπίστηκε στα δείγματα αρνητικά για HPV-16. Από αυτές τις 22 μεταλλάξεις μόνο οι τέσσερις ήταν σε αμινοξέα που σχετίζονται άμεσα με τη σύνδεση του E2F στη pRB (AG 3578 : S612T, LBC56 : S46Y, LBC46 : K653N, LBC52 : K653*).

Από την εξελικτική ανάλυση του εξονίου 19 παρατηρήθηκε ότι και στους δύο πληθυσμούς από τους οποίους υπολογίστηκε ο λόγος dN/dS (όλα δείγματα και ξεχωριστά τα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας) ήταν >1 (dN/dS=1,25). Με βάση τα αποτελέσματα από τον λόγο των τιμών dN/dS, παρατηρήθηκε ότι ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στο εξόνιο 19 του γονιδίου RB1. Στη συνέχεια, όταν ελέγχθηκε η ύπαρξη θετικής επιλεκτικής πίεσης (dN/dS > 1) σε συγκεκριμένα κωδικόνια εντός του εξονίου 19, στο σύνολο των 67 δειγμάτων δεν βρέθηκε κάποιο κωδικόνιο που να του ασκείται θετική επιλεκτική πίεση, στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως όταν ελέγχθηκαν ξεχωριστά τα 24 δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκε ότι στο κωδικόνιο 14 του εξονίου 19, το οποίο κωδικοποιεί για μία θρεονίνη στη θέση 619 της πρωτεΐνης pRB, ασκείται θετική επιλεκτική πίεση στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι στο εξόνιο 19 της pRB δρα η φυσική επιλογή γεγονός που την καθιστά ευμετάβλητη.

Στην παρούσα εργασία μπορεί να μην βρέθηκε ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός που να σχετίζεται με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης αλλά στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκαν πολλές διάσπαρτες missense μεταλλάξεις σε όλο το μήκος του εξονίου 19.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες έρευνες στις οποίες έγινε έλεγχος πολυμορφισμών στο γονίδιο RB1 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου και σε διαφορετικές εθνικές ομάδες. Στις έρευνες αυτές φάνηκε ότι στο εξόνιο 19 συμβαίνουν κυρίως missense μεταλλάξεις που είτε διαταράσσουν τη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης είτε αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου RB1. Επίσης στις έρευνες αυτές φάνηκε ότι ανάλογα τον τύπο καρκίνου παρατηρούνται με διαφορετική συχνότητα διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 σε θέσεις διαφορετικές από αυτές που είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση του E2F στη pRB. Τέλος, σε έρευνα που περιλάμβανε 932 κλινικά δείγματα καρκίνου του ρετινοβλαστώματος από 11

διαφορετικές χώρες φάνηκε ότι το εύρος των μεταλλάξεων του γονιδίου RB1 διαφέρει μεταξύ των εθνικών πληθυσμών. [67, 68, 77, 78, 79, 80, 81, 82]

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε η ύπαρξη αρκετών διάσπαρτων μεταλλάξεων στο εξόνιο 19 στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας. Οι μεταλλάξεις αυτές θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη δομή της πρωτεΐνης pRB και να διευκολύνουν την απομάκρυνση του E2F από την E7 του HPV καθιστώντας τα άτομα που τις φέρουν πιο επιρρεπείς σε ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Για την επιβεβαίωση αυτής της θεωρίας θα μπορούσε μελλοντικά να ελεγχθεί στα ίδια κλινικά δείγματα η περιοχή της pRB που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση (pRB - E7) ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν μεταλλάξεις στις περιοχές δέσμευσης του E2F και της E7 που μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* Oct;445(1-2):11-20
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* Jun 20;324(1):17-27.
3. 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* Oct;445(1-2):224-31
4. Zheng ZM, Baker CC. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* Sep 1;11:2286-302
5. de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* Oct;445(1-2):2-10
6. 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* Dec;60(6):1445-56
7. Stanley M. (2008) The epidemiology and burden of HPV disease. *Nurs Times* Sep 9-15;104(36):38-40
8. Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* Oct;445(1-2):169-74
9. El Mehdaoui S, Touzé A, Laurent S, Sizaret PY, Rasschaert D, Coursaget P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. (2000) *J Virol.* Nov;74(22):10332-40
10. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* Nov 20;30 Suppl 5:F55-70
11. Frattini MG, Laimins LA.(1994) Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;91(26):12398-402
12. Hughes FJ, Romanos MA.(1993) E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* Dec 25;21(25):5817-23.
13. Eric A. Abbate, James M. Berger, and Michael R. Botchan(2004) The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* Aug 15;18(16):1981-96
14. Leng X, Ludes-Meyers JH, Wilson VG.(1997) Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding and E2 interaction capacity. *J Virol.* Jan;71(1):848-52
15. Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. (1998) The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology.* Mar 15;242(2):378-86.

16. 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* Feb 4;275(5):3522-34.
17. Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* Oct;445(1-2):80-98
18. 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*
19. Tsakogiannis D, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Skordas V, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece.(2012) *Arch Virol. Sep*;157(9):1729-39
20. DiMaio D, Petti LM. (2013) The E5 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):99-114
21. DiMaio D, Mattoon D.(2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* Nov 26;20(54):7866-73
22. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS.(2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* Nov 1;119(9):2105-12
23. Laura F. Wetherill, Kristopher K. Holmes, Mark Verow, Marietta Müller, Gareth Howell, Mark Harris, Colin Fishwick, Nicola Stonehouse, Richard Foster, G. Eric Blair,^a Stephen Griffin, and Andrew Macdonald (2012) High-Risk Human Papillomavirus E5 Oncoprotein Displays Channel-Forming Activity Sensitive to Small-Molecule Inhibitors. *J Virol* May;86(9):5341-51
24. Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE.(1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Natl Cancer Inst.* Jul 21;91(14):1211-20
25. zur Hausen H.(2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* May 3;92(9):690-8
26. Brimer N, Lyons C, Vande Pol SB.(2007) Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein. *Virology* Feb 20;358(2):303-10
27. Thomas M, Banks L.(1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* Jun;80 (Pt 6):1513-7
28. Vande Pol SB, Klingelutz AJ.(2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology. Oct*;445(1-2):115-37
29. Yugawa T, Kiyono T.(2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* Mar;19(2):97-113
30. Roman A, Munger K.(2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):138-68

31. Stevaux O, Dyson NJ.(2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol.* Dec;14(6):684-91
32. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO.(1990) The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* Feb;64(2):723-30
33. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA.(2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.* May 18;24(10):1821-30
34. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P.(1995) Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* Oct;69(10):6389-99
35. 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
36. 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
37. 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* Jun 18;8(6):e66693
38. Schiller JT, Day PM, Kines RC (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *GynecolOncol* Jun;118(1 Suppl):S12-7
39. 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 AcadSci USA* Dec 1;106(48):20458-63
40. Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* May;110(5):525-41
41. McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* ;72:155-205
42. 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* May;53(1):25-36
43. Tsakogiannis D, Diamantidou V, Toska E, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Ruether IG, Gortsilas P, Markoulatos P.(2015) Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Arch Virol* Jan;160(1):207-14
44. 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* Apr 24;287(16):2114-9
45. Roh JW, Kim BK, Lee CH, et al. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. *Oncol Res* 2010;18(9):453-9.

46. Friend SH et al. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988.
47. Dietmar R.Lohmann et al. Constitutional RB1-Gene Mutations in Patients with Isolated Unilateral Retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* 61:282–294, 1997
48. Shauna A. Henley and Frederick A. Dick. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. Henley and Dick Cell Division 2012
49. Nicholas Dyson. Homologous Sequences in Adenovirus E1A and Human Papillomavirus E7 Proteins Mediate Interaction with the Same Set of Cellular Proteins. *Journal Of Virology*, Dec. 1992
50. Nicholas Dyson and Frederick A. Dick. Three Regions of the pRB Pocket Domain Affect Its Inactivation by Human Papillomavirus E7 Proteins. *Journal Of Virology*, 2002
51. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 1989 Nov 3;246(4930):603-8.
52. C Giacinti and A Giordano. RB and cell cycle progression. *Oncogene* (2006) 25, 5220–5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
53. Mikhail V. Blagosklonny and Arthur B. Pardee. The Restriction Point of the Cell Cycle. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]
54. Gustavo Leone et al. Collaborative role of E2F transcriptional activity and G1 cyclindependent kinase activity in the induction of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8; 96(12): 6626–6631.
55. Knudsen ES1, Wang JY. Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10):5771-83
56. Tamara Zarkowska and Sibylle Mitnacht. Differential Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein by G1/S Cyclin-dependent Kinases. *The Journal of Biological Chemistry* (1997).
57. Margaret E. McLaughlin-Drubin, Karl Münger. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384 (2009) 335–344
58. Bing Xiao. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar
59. Sama Tamrakar, Ethel Rubin and John W. Ludlow. Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Frontiers in Bioscience* 5, d121-137, January 1, 2000]
60. Priya Kadam-Pai et al. Ethnic variations of a retinoblastoma susceptibility gene (RB1) polymorphism in eight Asian populations. *Journal of Genetics* (2003)
61. Kryazhimskiy I, Plotkin JB. The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet.* 2008 Dec
62. Nielsen R. Molecular signatures of natural selection. *Annu Rev Genet.* 2005

63. Adi Stern. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Research*, 2007
64. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AM (2000) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155:431-449
65. Swanson, W.J., Nielsen, R. and Yang, Q. (2003) Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Mol Biol Evol*, 20, 18-20
66. Doron-Faigenboim, A. and Pupko, T. (2006) A Combined Empirical and Mechanistic Codon Model. *Mol Biol Evol*, 24, 388-397
67. José R Valverde et al. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genetics* 2005
68. Elizabeth A Price et al. Spectrum of RB1 mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *Cancer genetics* 2013
69. Gregory A. Otterson et al. Temperature-Sensitive RB Mutations Linked to Incomplete Penetrance of Familial Retinoblastoma in 12 Families. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1040–1046, 1999
70. Frederick A. Dick and Seth M. Rubin. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 May
71. Husain A, Ramakrishnan V.(2015) Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of Global Health* ;81(5)
72. Bravo IG, Sanchez MF.(2015) Papillomaviruses Viral Evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health* Jan: 32–51
73. Takashi Yugawa and Tohru Kiyono. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses :novel function of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology* 2009.
74. Xin Liu et al. Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. *The Journal of Biological Chemistry* (2005)
75. A. Dahiya et al. Role of the LXCXE Binding Site in Rb Function. *Molecular And Cellular Biology*, Sept. 2000
76. F.A. Dick et al. Mutagenesis of the pRB Pocket Reveals that Cell Cycle Arrest Functions Are Separable from Binding to Viral Oncoproteins. *Molecular and Cellular Biology* (2000)
77. Suzanne Richter et al. Sensitive and Efficient Detection of RB1 Gene Mutations Enhances Care for Families with Retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* 72:253–269, 2003
78. Hajer Ayari-Jeridi et al. Mutation Spectrum of RB1 Gene in Unilateral Retinoblastoma Cases from Tunisia and Correlations with Clinical Features. *PLoS ONE* 10(1): 2015
79. Swati Tomar et al. Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PLoS One.* 2017 Jun

80. J. William Harbour. Overview of RB Gene Mutations in Patients with Retinoblastoma. *Ophthalmology*. 1998 Aug
81. Berge et al. Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. *Molecular Cancer* 2010
82. Javier Alonso et al. Spectrum of Germline RB1 Gene Mutations in Spanish Retinoblastoma Patients: Phenotypic and Molecular Epidemiological Implications. *Human Mutation* (2001)