

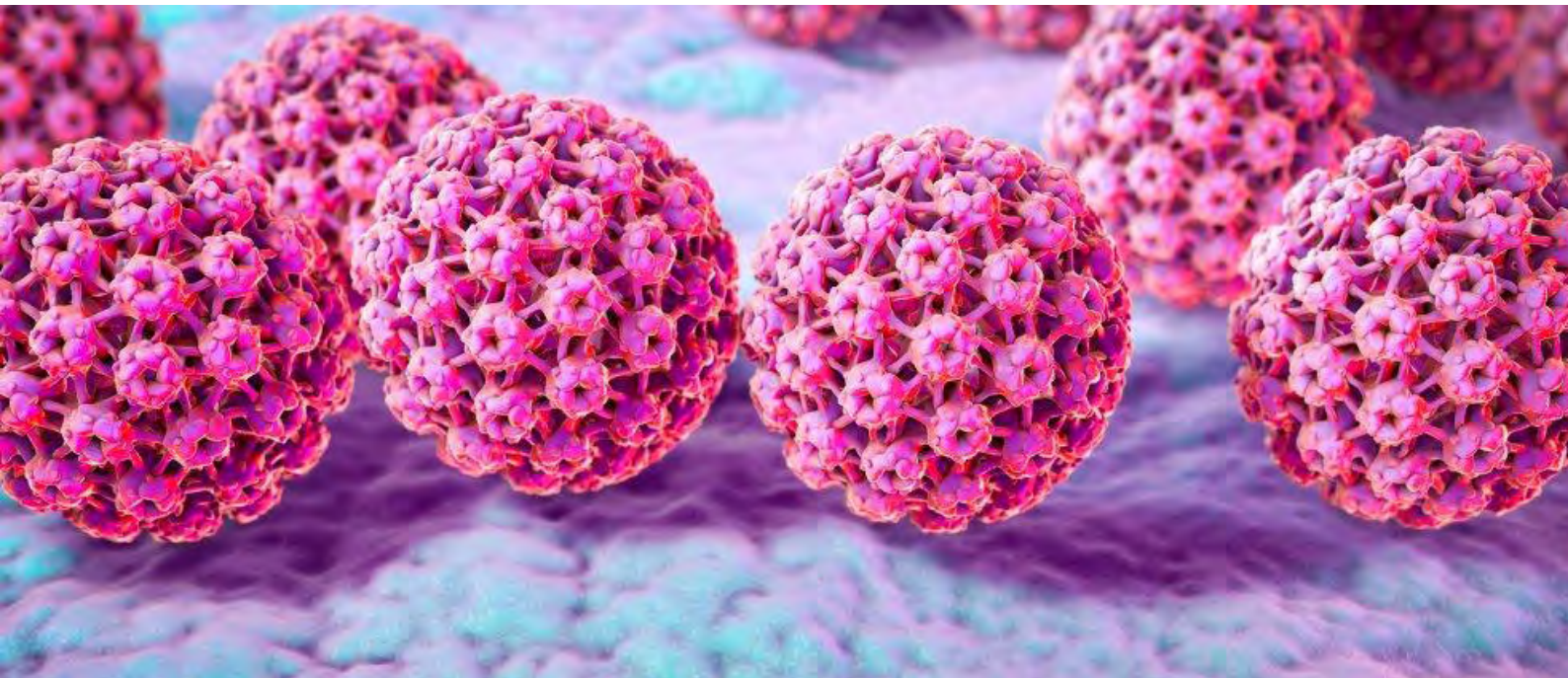
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΥΛΙΑΝΙΔΟΥ ΖΩΗ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RB1 ΣΤΑ ΕΞΟΝΙΑ 22 ΚΑΙ 23 ΚΑΙ
ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΥΨΗΛΟΥ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΟΥ
ΒΑΘΜΟΥ ΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΗΡV-16 ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**Πολυμορφισμός του γονιδίου RB1 στα εξόνια 22 και 23 και
σύνδεση των πολυμορφισμών αυτών με υψηλού και
χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετικών για HPV-16 κλινικών
δειγμάτων**

**RB1 polymorphism in exons 22 and 23 and association of RB1
gene variants with high and low grade dysplasia of HPV-16
positive clinical samples**

ΣΤΥΛΙΑΝΙΔΟΥ ΖΩΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

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 Ανθρώπινων Θηλωμάτων είναι μικροί ιοί, χωρίς λιπιδικό έλυτρο και διαθέτουν κυκλικό δίκλωνο DNA περίπου 8 kbp. Οι HPV ιοί προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και τις βλεννογόνες μεμβράνες του ανθρώπου. Έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 150 τύποι του ιού. Ορισμένοι τύποι είναι πλήρως ασυμπτωματικοί και ακίνδunami, κάποιοι από αυτούς είναι ικανοί να προκαλέσουν καλοήθεις αλλοιώσεις όπως θηλώματα του δέρματος, ενώ υπάρχουν τύποι οι οποίοι συνδέονται τόσο με καλοήθεις όσο και με κακοήθεις αλλοιώσεις του ουρογεννητικού συστήματος και με στοματοφαρυγγικούς καρκίνους. Διακρίνονται σε τύπους χαμηλού (low-risk) και υψηλού (high-risk) κινδύνου. Οι HPV χαμηλού κινδύνου συνδέονται με καλοήθεις αλλοιώσεις και δεν ανευρίσκονται σε καρκίνους, ενώ οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου έχουν σχετιστεί αιτιολογικά με καρκίνους (όπως του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου και του πρωκτού). Οι τύποι 6 και 11 αποτελούν τους πιο συχνούς χαμηλού κινδύνου τύπους ενώ οι τύποι 16 και 18 τους συχνότερους υψηλού κινδύνου τύπους που ευθύνονται για το 75% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως.

Γενικά, η εμφάνιση καρκίνου προκαλούμενου από ιούς HPV συνδέεται με την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα, γεγονός που απορρυθμίζει την έκφραση των ιικών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Κύριοι στόχοι των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 είναι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb), αντίστοιχα. Είναι Έτσι, μέσω των E6 κι E7, ο ιός παρεμβαίνει στις κυτταρικές λειτουργίες και τις απορρυθμίζει, προκαλώντας εν τέλει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ατελή επιδιόρθωση του DNA και την αδυναμία του κυττάρου να οδηγηθεί σε απόπτωση. Συνεπώς, τα μολυσμένα κύτταρα εισέρχονται συνεχώς στην φάση της μίτωσης και μακροπρόθεσμα συσσωρεύουν μεταλλάξεις και γενετικά λάθη με αποτέλεσμα την δημιουργία καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο έλεγχος των εξονίων 22 και 23 του γονιδίου RB1, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, με στόχο την εύρεση πιθανών πολυμορφισμών σε αυτά και την συσχέτισή τους με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 43 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας που προέρχονται από Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό, 1 καρκινικό δείγμα θετικό για HPV-16, 21 με υψηλό βαθμό δυσπλασίας, 12 με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και 9 δείγματα αρνητικά για HPV-16.

Τόσο από την νουκλεοτιδική, όσο και από την αμινοξική ανάλυση των εν λόγω δειγμάτων δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη συγκεκριμένου πολυμορφισμού που να σχετίζεται με την ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού δυσπλασίας. Επιπλέον, στα

δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός τυχαίων και διάσπαρτων μεταλλάξεων σε όλο το μήκος των εξονίων 22 και 23, υπεύθυνες για μη- συνώνυμες αμινοξικές υποκαταστάσεις στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Αντιθέτως, τα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και τα αρνητικά για τον ιό HPV-16 δείγματα παρουσίασαν ελάχιστο ή μηδενικό πλήθος μεταλλάξεων.

Για τον έλεγχο της επιλεκτικής πίεσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Fixed Effects Likelihood (FEL), αρχικά για όλα τα δείγματα και στη συνέχεια ξεχωριστά για τα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας, χωριστά για κάθε εξόνιο. Με βάση τον λόγο dN/dS που προέκυψε και για τα δύο εξόνια ξεχωριστά, δεν παρατηρήθηκε η άσκηση στατιστικώς σημαντικής θετικής ή αρνητικής εξελικτικής πίεσης, σε καμία αμινοξική θέση των εξονίων 22 και 23.

Στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές έρευνες ανάλυσης πολυμορφισμών του γονιδίου RB1 σε διάφορους τύπους καρκίνου, έχουν όμως γίνει ελάχιστες αντίστοιχες μελέτες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο έλεγχος για την ύπαρξη πολυμορφισμών σε όλο το μήκος του γονιδίου RB1 σε γυναίκες με ενδοεπιθηλιακές τραχηλικές αλλοιώσεις και θετικές για τον ιό HPV-16, μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από την ογκοπρωτεΐνη E7 του HPV.

ABSTRACT

Human Papilloma Viruses (HPVs) are a group of small non-enveloped viruses. HPVs have circular double-stranded DNA genome, approximately 8 kbp in size. They infect human cutaneous and mucosal epithelial cells and potentially cause a variety of lesions ranging from common warts to cervical neoplasia and cancer. More than 150 HPV types have been detected. Many of them cause asymptomatic infections, while over 40 types are associated with urogenital and oropharyngeal lesions. HPVs are classified into low-risk and high-risk types. Low-risk HPV types such as HPV-6 and HPV-11 are highly associated with benign lesions and they are rarely present in cancerous lesions. In contrast, high-risk HPV types such as HPV-16 and HPV-18 are strongly associated with carcinogenesis and constitute the etiological factor for 75% of cervical cancer worldwide. Specifically, epidemiological studies have suggested that persistent infection with high-risk types is a key factor in the development of precancerous and cancerous lesions.

The progression of cancer caused by HPVs is associated with the integration of the viral DNA in the cellular genome. The integration dysregulates the expression of the viral oncoproteins E6 and E7, which target the tumor suppressors proteins p53 and pRb, respectively. Unregulated expression of the E6 and E7 viral oncogenes leads to uncontrolled proliferation, deficient DNA repair, accumulation of mutations in the infected cells and thus cancer progression.

The purpose of this study was the investigation of the mutation spectrum on the exons 22 and 23 of the RB1 gene and the finding of polymorphisms that may be related to the degree of intraepithelial lesion. This study was conducted in 43 clinical cervical samples, all derived from the Greek population, 1 cancerous sample, 21 samples with high degree of dysplasia, 12 with low degree of dysplasia and 9 samples negative for HPV-16.

Nucleotide and amino acid sequence analysis of the exons revealed the absence of specific polymorphism linked with the development of a higher degree dysplasia. However, the samples with high degree dysplasia exhibited many scattered mutations throughout the lengths of both exons 22 and 23, while the samples with low dysplasia and the ones negative for HPV-16 showed significantly less or zero mutations.

The selective pressure that is exerted on the exons 22 and 23 was analysed with the Fixed Effects Likelihood (FEL) method, for each exon separately. Initially, the FEL method was used on the total of the 43 clinical samples and then on the high grade dysplasia samples, respectively for each exon. From the evolutionary study performed for both of the exons and the calculated ratios dN/dS, it was concluded

that nor positive or negative pressure is exerted on the exons. In the total of the 43 clinical samples, no particular codon was found to be subjected into statistically significant selective pressure (positive or negative).

In the past, many studies have been conducted in order to analyze the mutation repertoire of RB1 gene, in various types of cancer. However, few similar studies have been done on cervical cancer. Potentially, the identification of several polymorphisms across the length of the RB1 gene in HPV-16 positive individuals with intraepithelial lesions may facilitate the clarification of the molecular mechanisms of cell cycle dysregulation by the HPV E7 oncoprotein.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά	8
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών.....	8
1.2.1. Ταξινόμηση του HPV-16.....	10
1.3. Οργάνωση του γονιδιώματος των Human Papillomaviruses (HPVs)	11
1.3.1. Η ιική πρωτεΐνη E1	12
1.3.2. Η ιική πρωτεΐνη E2	13
1.3.3. Η ιική πρωτεΐνη E4	14
1.3.4. Η ιική πρωτεΐνη E5	14
1.3.5. Η ιική πρωτεΐνη E6	16
1.3.6 Η ιική πρωτεΐνη E7	18
1.4. Δομή του καψιδίου	20
1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη L1.....	20
1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη L2.....	21
1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος.....	21
1.6 Κύκλος ζωής των HPVs.....	23
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση	23
1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	24
1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος	25
1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση.....	25
1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	26
1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB).....	27
1.8.1 Χαρακτηριστικά των «rocket» family proteins: pRb, p107, p130.....	29
1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRb.....	31
1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1	33
1.8.4 Εξόνια 22 και 23 της πρωτεΐνης pRb	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	39
ΣΚΟΠΟΣ	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	40
.....	40
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.1 Κλινικά δείγματα.....	40

3.2 Εκχύλιση του DNA από υγρό υλικό συντήρησης Thin Prep	43
3.3 Έλεγχος εκχύλισης	44
3.4 Ανάλυση πολυμορφισμών των εξονίων 22 και 23 του RB1	45
3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει τα εξόνια 22 και 23	45
3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων	45
3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης.....	46
3.4.4 Μοριακή κλωνοποίηση	47
3.4.5. Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	50
3.4.6. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών.....	50
3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	52
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση.....	52
4.2 Έλεγχος αμινοξικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 22 του RB1	55
4.2.1 Ομοπαράθεσεις του εξονίου 22	56
4.2.2 Ομοπαράθεσεις του εξονίου 23	58
4.3 Εξελικτική ανάλυση των εξονίων 22 και 23 του γονιδίου RB1	60
4.3.1 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 22 του γονιδίου RB1.....	60
4.3.2 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 23 του γονιδίου RB1.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	62
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
Βιβλιογραφικές Αναφορές	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Ιοί των Θηλωμάτων - Papillomaviruses (PVs) ανήκουν στην οικογένεια των *Papillomaviridae*. Είναι ιοί χωρίς φάκελο, με καψίδιο εικοσαεδρικής δομής και δίκλωνο κυκλικό DNA, όπου το μέγεθός τους κυμαίνεται από 6.9 έως 8.6 kb (1). Έχουν αναγνωρισθεί περίπου 240 τύποι του ιού, οι οποίοι προσβάλλουν ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, μεταξύ σπονδυλωτών, πτηνών και ερπετών. Σύμφωνα με το Διεθνές Κέντρο Αναφορών HPV του Ινστιτούτου Καρολίνσκα (International HPV Reference Center, Karolinska Institute), έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί παραπάνω από 220 τύποι που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Human Papilloma Viruses – HPVs). Από αυτούς τουλάχιστον οι 40 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι, προκαλώντας από πλήρως ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι και κακοήθεις νεοπλασίες (2).

Συγκεκριμένα, οι HPVs προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται τόσο σε τραχηλικές όσο και στοματοφαρυγγικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες. Αξιοσημείωτη είναι η σύνδεση του ιού με την καρκινογένεση. 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 ισχυρά ογκογόνο ιό.

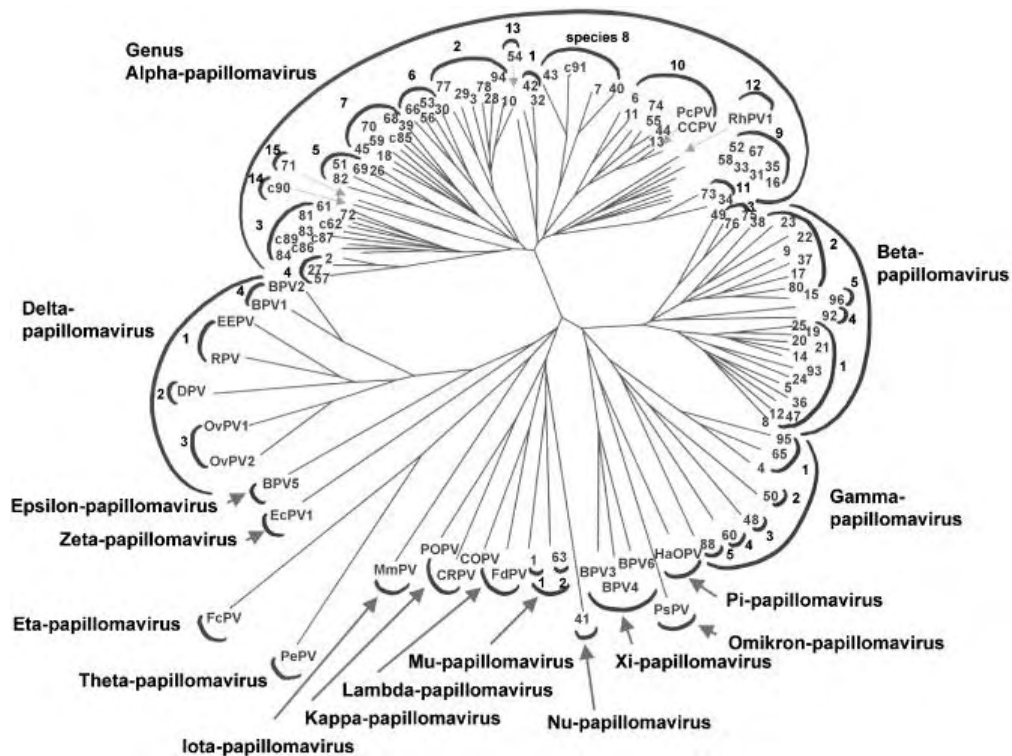
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Αρχικά, οι Papilloma ιοί ταξινομήθηκαν στην οικογένεια των *Papovaviridae*, μαζί με τους Polyoma ιούς, καθώς και οι δύο δεν διαθέτουν εξωτερικό περίβλημα, παρουσιάζουν κάποια συντηρημένα στοιχεία στα καψομερή τους και παρόμοια μορφή γονιδιώματος (δίκλωνο κυκλικό DNA) (3,4). Με την εκτενέστερη ανάλυση των γονιδιωμάτων τους διαπιστώθηκε ότι τελικά οι δύο αυτές κατηγορίες ιών διαφέρουν στο μέγεθος και στην οργάνωση του γονιδιώματος και παρουσιάζουν πολύ μικρό βαθμό ομολογίας (4). Συγκεκριμένα, οι Papilloma και Polyoma ιοί μοιράζονται μόνο μία ομόλογη αλληλουχία, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου της E1 πρωτεΐνης των ιών Papilloma και στην περιοχή του T αντιγόνου του Polyoma ιού SV40 και αντιστοιχεί σε ελικάση (4,5). Έτσι, έγινε αποδεκτός από την

Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) ο διαχωρισμός της οικογένειας Papovaviridae σε δύο διακριτές οικογένειες: την οικογένεια των *Papillomaviridae* και την οικογένεια των *Polyomaviridae* (5).

Εν συντομία, το γονιδίωμα των περισσότερων ιών Papilloma κωδικοποιεί για 8 πρωτεΐνες: 6 πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την πρώιμη φάση (E1, E2, E4, E5, E6, E7) και η λειτουργία τους είναι κυρίως ρυθμιστική και 2 πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την όψιμη φάση (L1, L2) και συνιστούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού (6). Τα γονίδια των πρωτεϊνών E1, E2, L1 και L2 είναι αρκετά συντηρημένα μεταξύ όλων των ιών των θηλωμάτων, με το γονίδιο της L1 να είναι το πιο συντηρημένο απ' όλα. Για τον λόγο αυτό, έχει γίνει αποδεκτό, η ταξινόμηση των ιών Papilloma να γίνεται βάσει των διαφορών που ανιχνεύονται στην αλληλουχία του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου L1. Η ταξινόμηση βάσει οροτύπου είναι αδύνατη δεδομένου ότι δεν υπάρχει κατάλληλη κυτταρική σειρά για την καλλιέργεια του ιού με δυνατότητα διαφοροποίησης. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι ιοί ίδιου τύπου εμφανίζουν διαφορά στην αλληλουχία της L1 μεγαλύτερη από 10%, ενώ ιοί με διαφορά που κυμαίνεται μεταξύ 2-10% αποτελούν υποτύπους του ιού και με διαφορά μικρότερη από 2% αποτελούν παραλλαγές αυτού (4).

Οι ιοί των θηλωμάτων χωρίζονται σε 16 γένη. Κάθε γένος χαρακτηρίζεται από 60% ομολογία στην αλληλουχία του L1 ORF και για την ονοματολογία του καθενός χρησιμοποιήθηκαν τα γράμματα της ελληνικής αλφαβήτου (από Άλφα έως Πι) (5).



Εικόνα 1.1 : Φυλογενετικό δέντρο που φαίνονται τα διάφορα γένη των Papilloma ιών (4).

Οι ιοί που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο εντοπίζονται μόνο στα 5 από τα 16 γένη και συγκεκριμένα στα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu (5). Από αυτά τα πέντε, τα δύο κύρια γένη των HPVs είναι τα Alpha και Beta, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των HPVs (≈90%) που έχουν χαρακτηριστεί ανήκει σε αυτά τα δύο γένη. Κάθε τύπος ιού χαρακτηρίζεται από διαφορετικό κύκλο ζωής, ενώ παράλληλα ποικίλλει η ικανότητα και ο βαθμός ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που μπορεί να προκαλέσει (7).

Ανάλογα με τον τροπισμό τους, στον οποίο φαίνεται να είναι καθοριστική η συμβολή των ρυθμιστικών στοιχείων της περιοχής LCR του γενώματος του ιού (8), οι HPVs χωρίζονται σε τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου των γεννητικών οργάνων και του στόματος. Στα γένη Beta, Gamma, Mu και Nu συγκαταλέγονται τύποι HPV με τροπισμό στο δερματικό επιθήλιο, ενώ στο γένος Alpha συγκαταλέγονται τύποι και των δύο προαναφερθέντων τροπισμών (9). Οι δεύτεροι, ανάλογα με τον βαθμό ογκογονικότητάς τους, μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε τύπους υψηλού (High Risk, HR-HPVs), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk, LR-HPVs), (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% (10).

Ομάδα επικινδυνότητας	Τύποι HPV
Υψηλού κινδύνου (High Risk)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 67, 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

1.2.1. Ταξινόμηση του HPV-16

Οι ιοί HPV-16 ταξινομούνται στο γένος των Alpha Papillomaviruses και στο είδος Alpha-9, μαζί με τους HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58 και HPV-67. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1.1, οι παραπάνω ιοί αποτελούν τύπους υψηλής επικινδυνότητας. 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 εμμένει και εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων, στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 (ο μηχανισμός θα περιγραφεί παρακάτω αναλυτικότερα) και το κύτταρο οδηγείται σε γενωμική

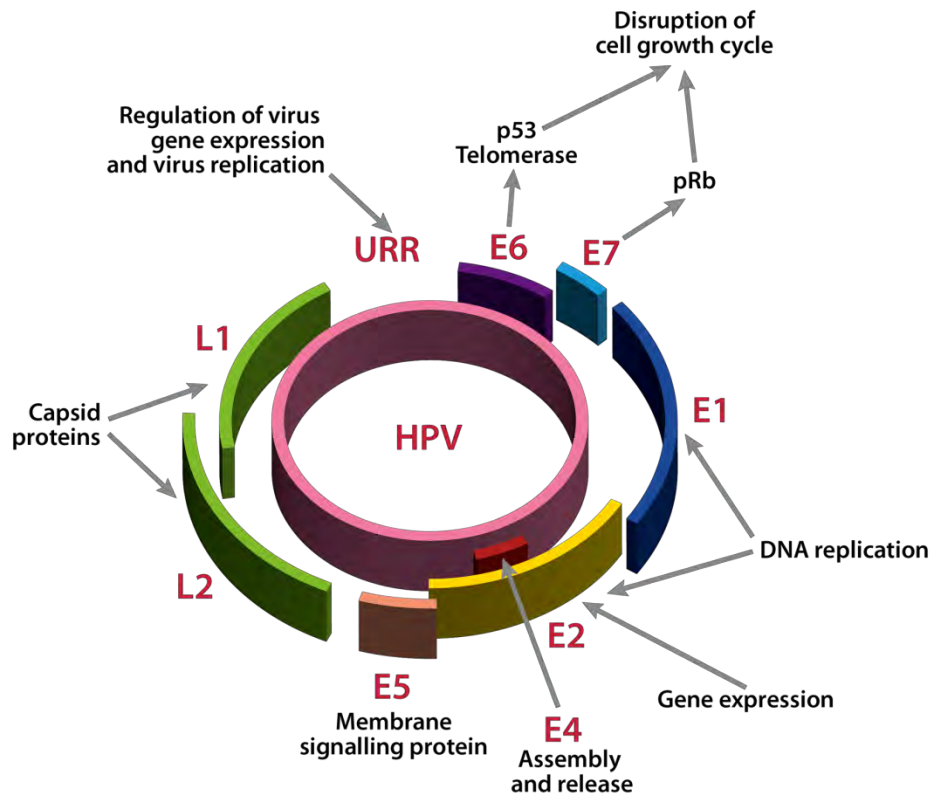
αστάθεια η οποία τελικώς μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου. Ο HPV 16, μαζί με τον HPV 18 (alpha-7), αποτελούν τους πιο ογκογόνους ιούς και συνδέονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως κατά 75% και 15% αντίστοιχα (11).

1.3. Οργάνωση του γονιδιώματος των Human Papillomaviruses (HPVs)

Οι HPV είναι μικροί ιοί διαμέτρου 55-60nm οι οποίοι δεν περιβάλλονται από εξωτερικό περίβλημα και το γονιδιώμά τους περικλείεται σε ένα καψίδιο. Η οργάνωση του γονιδιώματος είναι καλά συντηρημένη μεταξύ των ιών των Θηλωμάτων. Το γονιδίωμα του HPV-16 ακολουθεί την τυπική οργάνωση που συναντάται στους τύπους υψηλής επικινδυνότητας του γένους Alpha (12).

Διαθέτουν δίκλωνο κυκλικό DNA μήκους περίπου 8 Kbp και αυτό χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές:

- Την πρώιμη περιοχή E (Early Region)
- Την όψιμη περιοχή L (Late Region)
- Την ρυθμιστική περιοχή LCR ή NCR (Long Control Region ή Noncoding Region)



Εικόνα 1.2 : Το γονιδίωμα του HPV στην επισωμική του μορφή.

Η πρώιμη περιοχή E διαθέτει έξι αναγνωστικά πλαίσια (E1, E2, E4, E5, E6, E7) τα οποία κωδικοποιούν για ρυθμιστικά στοιχεία του ιού και εκφράζονται κατά την πρώιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. Καλύπτει σχεδόν το 50% του γονιδιώματος του ιού (13).

Η όψιμη περιοχή L, η οποία εντοπίζεται καθοδικά της περιοχής E, διαθέτει δύο αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες του ιού και εκφράζονται κατά την όψιμη φάση. Συγκεκριμένα, η περιοχή κωδικοποιεί για τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2. Καταλαμβάνει περίπου το 40% του ιικού γονιδιώματος (13).

Το εναπομείναν 10% του γονιδιώματος του ιού καταλαμβάνει η ρυθμιστική περιοχή LCR με μέγεθος περίπου 850 bp. Εντοπίζεται μετά το τέλος του γονιδίου L2 και μέχρι πριν το γονίδιο E6. Δεν κωδικοποιεί για καμία πρωτεΐνη, αλλά διαθέτει την θέση έναρξης αντιγραφής, πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. SP1, AP1, Oct1) καθώς και τον βασικό υποκινητή των πρώιμων γονιδίων όπως θα αναφερθεί και παρακάτω (13, 14).

Η έκφραση του γονιδιώματος του HPV 16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Τον P_E υποκινητή (ή p97) που βρίσκεται στην LCR και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και τον P_L υποκινητή (ή p670), ο οποίος εντοπίζεται στο E7 γονίδιο και ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων και του E1 γονιδίου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2 οι περιοχές που επισημαίνονται ως A_E και A_L αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα τις πρώιμες και όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης του ιικού γονιδιώματος (13).

1.3.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

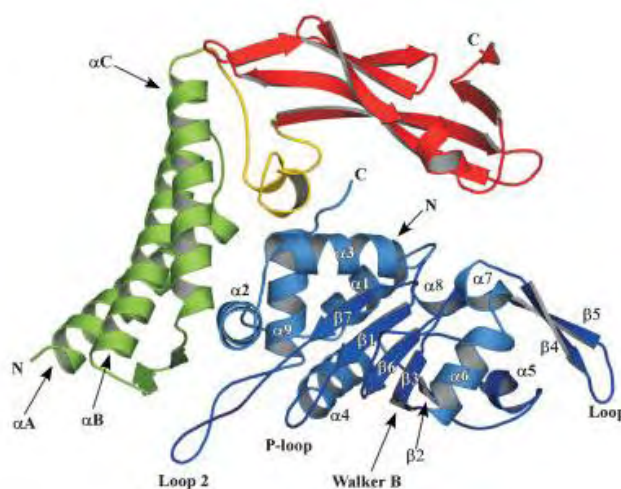
Η πρωτεΐνη E1 αποτελεί μια DNA ελικάση/ ATPάση η οποία εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA και η δράση της είναι απαραίτητη καθ' όλη τη διάρκεια του ιικού αντιγραφικού κύκλου. Προσδένεται μέσω της κεντρικής της περιοχής (DNA-binding domain) σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στην θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων, στο 3' άκρο της περιοχής LCR (15, 16). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης E1 είναι το μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα του ιού και αποτελεί μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματός του, που (ανάλογα με τον τύπο) κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 67-76 kDa (600-650 αμινοξέα). Αντιθέτως, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης E1 είναι λιγότερο συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων στελεχών HPV κι έχει βρεθεί ότι αυτή η περιοχή ενισχύει την αντιγραφή του ιού, συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της επισωματικής μορφής του ιικού DNA. Γενικά, αυτή η περιοχή φαίνεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο

συνεισφέροντας στην ρύθμιση της αντιγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται η ενζυματική επικράτεια της E1, δηλαδή αυτή της ελικάσης και ΑΤΡάσης. Αυτή η περιοχή μετέχει στην 'αυτοσυναρμολόγηση' E1 εξαμερών καθώς επίσης αλληλεπιδρά και με την ική πρωτεΐνη E2, η οποία περιγράφεται παρακάτω (15, 17, 18).

1.3.2. Η ική πρωτεΐνη E2

Η E2 είναι μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην ική αντιγραφή ενώ παράλληλα αποτελεί και βασικό ρυθμιστή της μεταγραφής του ικού γονιδιώματος. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kD. Το αμινοτελικό της άκρο αποτελείται από μία περιοχή αρκετά συντηρημένη, μήκους περίπου 200 αμινοξέων και συνιστά περιοχή trans-ενεργοποίησης που συμμετέχει στην ρύθμιση της μεταγραφής του ικού γονιδιώματος. Στο καρβοξυτελικό άκρο της E2 πρωτεΐνης, το οποίο αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα, εντοπίζεται μία επικράτεια σύνδεσης της E2 στο ικό DNA καθώς επίσης και μία περιοχή υπεύθυνη για τον διμερισμό της πρωτεΐνης E1 (15, 18).

Απαραίτητο συμβάν για την έναρξη της αντιγραφής του ικού γονιδιώματος αποτελεί η δημιουργία συμπλόκου E1•E2 στην θέση έναρξης της αντιγραφής. (Εικόνα 1.3) Το σύμπλοκο αυτό προκαλεί αναδιάταξη του DNA με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η στρατολόγηση περεταιίρω μορίων E1 και τελικώς να ξεκινήσει η αντιγραφή. Επιπλέον, το σύμπλοκο E1•E2 παίζει ρόλο και στην μεταγραφή καθώς προσδένεται στον πρώιμο υποκινητή P_E και προσελκύει στην περιοχή μεταγραφικούς παράγοντες (19).



Εικόνα 1.3 : Αναπαράσταση του συμπλόκου E1•E2. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η E1. Με πράσινο απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο της E2 και με κόκκινο παρουσιάζεται η δομική περιοχή της E2 (18).

1.3.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

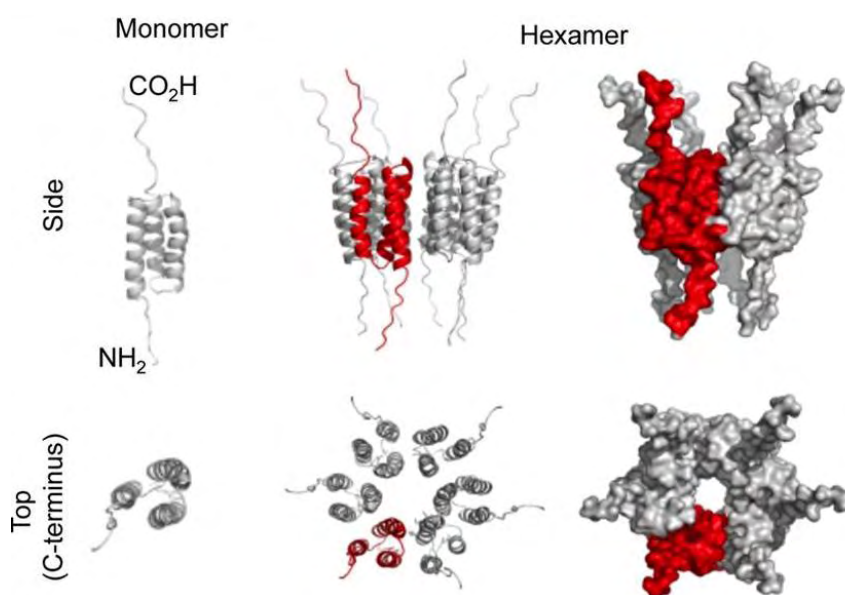
Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της ιικής πρωτεΐνης E4 εντοπίζεται εξ ολοκλήρου στο ORF της πρωτεΐνης E2, ενώ παράλληλα διαθέτει το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου της E1 καθώς και κάποιες παρακαείμενες αλληλουχίες αυτού. Για το λόγο αυτό συχνά αναφέρεται και ως πρωτεΐνη E1^{E4}. Παρόλο που το E4 ORF εντοπίζεται στην πρώιμη περιοχή του γονιδιώματος του ιού, δεν έχει παρατηρηθεί κάποια συνεισφορά της πρωτεΐνης E4 στα πρώιμα στάδια του ιικού κύκλου ζωής. Αντιθέτως, ανιχνεύεται σε πολύ υψηλά επίπεδα (συγκριτικά και με τις άλλες ιικές πρωτεΐνες) κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού (20).

Το μέγεθος της πρωτεΐνης E4 διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ιού. Η πρωτεΐνη E4 του ιού HPV 16 απαρτίζεται από 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: α) στο N-τελικό άκρο, στο οποίο ανιχνεύεται μία συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία (το μοτίβο LLKLL), η οποία μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων χρωματίνης, β) στην κεντρική περιοχή η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών καταλοίπων προλίνης και συνεισφέρει στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2, γ) στην C-τελική περιοχή, η οποία συμβάλλει στην καταστροφή και στην αναδιοργάνωση του κυτταρικού δικτύου κερατίνης προκειμένου να απελευθερωθούν τα παραγόμενα ιοσωμάτια από τα μολυσμένα κύτταρα της διαφοροποιημένης στιβάδας (21).

1.3.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Το γονίδιο της E5 πρωτεΐνης εντοπίζεται στο 3' άκρο της πρώιμης περιοχής του ιικού γονιδιώματος και η έκφρασή του πραγματοποιείται με την μεσολάβηση ενός ματισμένου μεταγράφου που ξεκινά ανοδικά του γονιδίου της E2. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, που ποικίλλει σε μέγεθος ανάλογα με τον τύπο του ιού και δεν εκφράζεται από όλους τους τύπους HPV (22). Η πρωτεΐνη E5 του HPV 16 έχει μήκος 83 αμινοξέων και διαθέτει 3 υδρόφοβες διαμεμβρανικές επικράτειες, με κυτταροπλασματικό το C-τελικό άκρο. Ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ σπανιότερα μπορεί να εντοπιστεί και στον πυρηνικό φάκελο (23). Η πρωτεΐνη E5 ολιγομερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και δισουλφιδικών δεσμών προς σχηματισμό μιας εξαμερούς δομής «δαχτυλιδιού» και φαίνεται να έχει πιθανή δραστικότητα καναλιού ιόντων (Εικόνα 1.4).

Η πρωτεΐνη E5 διαθέτει ένα ευρύ φάσμα δράσεων που ως αποτέλεσμα έχουν τον μετασχηματισμό των πρώιμων κερατινοκυττάρων, ενισχύοντας έτσι το ογκογόνο δυναμικό των HPV. Συγκεκριμένα, η E5 του ιού HPV 16 φαίνεται να αλληλεπιδρά με αρκετά κυτταρικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και της V-ATPάσης των κενωτοπίων. Η E5, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την V-ATPάση, παρεμβαίνει στην οξύνιση των ενδοσωμάτων αποτρέποντας την αποικοδόμηση των EGFR και οδηγώντας τελικά στην συνεχή ανακύκλωσή τους στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτός είναι ένας πιθανός μηχανισμός που σε συνδυασμό με την «προσδετο-εξαρτώμενη» ενεργοποίηση του υποδοχέα EGF από την E5, εξηγεί την συνεχή σηματοδότηση από τον EGFR η οποία είναι και υπεύθυνη για την μιτογόνο επίδραση στα πρώιμα κερατινοκύτταρα. Παρόλο που χαρακτηριστικό της E5 είναι η ικανότητα μετασχηματισμού των κερατινοκυττάρων, έχει αρκετά ασθενέστερο αντίκτυπο στην ογκογένεση συγκριτικά με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού, τις E6 και E7, που θα περιγραφούν στην συνέχεια.



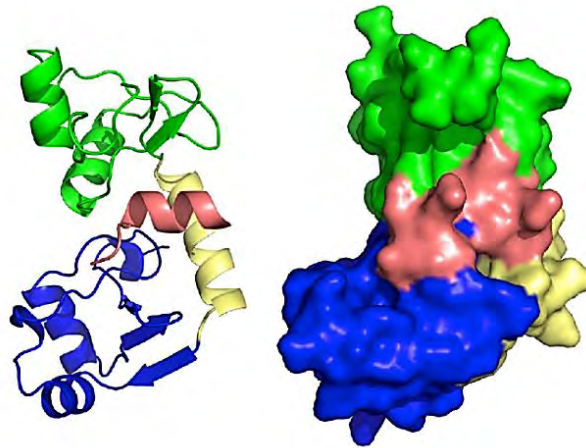
Εικόνα 1.4 : Μοντέλο του εξαμερούς καναλιού ιόντων που σχηματίζεται από τον ολιγομερισμό των μονομερών E5 in vitro. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η πλευρική όψη του εξαμερούς δακτυλίου της E5 με τρία διαμεμβρανικά τμήματα ενός μονομερούς να επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ στο κάτω μέρος η κάτω όψη της ίδιας αναπαράστασης (22).

Αντιθέτως, φαίνεται πως εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και όχι στην διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου (24). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη E5 ελαττώνει την έκφραση των πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και των δύο τάξεων (τάξεις I και II), επιτρέποντας στον ιό να «ξεφεύγει» της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή (23, 25).

1.3.5. Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 αποτελεί μία ιική ογκοπρωτεΐνη η οποία συμβάλλει στον μετασχηματισμό και την αθανατοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιό HPV υψηλού ή χαμηλού κινδύνου. Συνίσταται από 151 αμινοξέα και πρόκειται για μία πρωτεΐνη που εκφράζεται από τα πρώτα στάδια της HPV λοίμωξης. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E7 που θα περιγραφεί στην συνέχεια, παίζει εξέχοντα και καθοριστικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, καθώς παρεμβαίνει σε πολλές βασικές λειτουργίες του ιού και του κυττάρου ξενιστή.

Η E6 διαθέτει στο N-τελικό και στο C-τελικό της άκρο από μία δομική περιοχή δακτύλων ψευδαργύρου. Κάθε μία φέρει δύο μοτίβα Cys-X-X-Cys. Οι περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των διαφόρων στελεχών, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι απαραίτητες για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι δύο αυτές περιοχές συνδέονται μεταξύ τους μέσω μίας συνδετικής αλληλουχίας που διαθέτει δομή α-έλικας, δημιουργώντας έτσι μία κοιλότητα στην οποία μπορεί να συνδεθούν κυτταρικές πρωτεΐνες-στόχοι της E6 που διαθέτουν το μοτίβο LXXLL. Οι κυτταρικές πρωτεΐνες που διαθέτουν αυτό το χαρακτηριστικό μοτίβο εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών, όπως στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και η αναστολή της απόπτωσης (26).

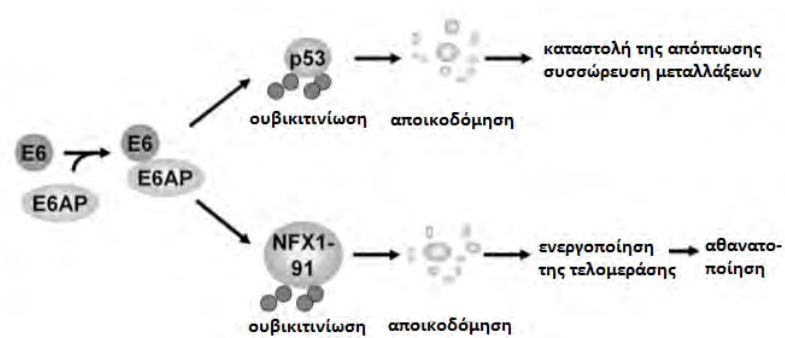


Εικόνα 1.5 : Κρυσταλλική δομή της ικής πρωτεΐνης E6. Το N-τελικό άκρο απεικονίζεται με πράσινο χρώμα, το C-τελικό απεικονίζεται με μπλε χρώμα, η συνδετική αλληλουχία απεικονίζεται με κίτρινο. Με ροζ απεικονίζεται η α-έλικα του συντηρημένου μοτίβου LXXLL στην κοιλότητα που δημιουργείται από την E6 (26).

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός με τον οποίο η E6 συμβάλλει στην ογκογένεση είναι η αλληλεπίδρασή της E6 του ιού HPV 16 με την ογκοκατασταλτική κυτταρική πρωτεΐνη p53. Πιο συγκεκριμένα, η E6 προσδένεται μέσω αναγνώρισης του πεπτιδίου LXXLL στη λιγάση της ουβικιτίνης E6AP σχηματίζοντας το σταθερό σύμπλοκο E6•E6AP. Στην συνέχεια το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στην πρωτεΐνη p53 και λαμβάνει χώρα η ουβικουιτίνωση της p53 από την συντηρημένη C-τελική

επικράτεια HECT της E6AP. Έτσι η p53 οδηγείται τελικώς στο πρωτεάσωμα 26S όπου και αποικοδομείται. Κατά συνέπεια, τα χαμηλά πλέον επίπεδα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση των συστημάτων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, παρακάμπτονται τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στις μεταβάσεις G1/S και G2/M, καταργούνται οι αποπτωτικοί μηχανισμοί και κατ' επέκταση το κύτταρο οδηγείται σε γενωμική αστάθεια και συσσώρευση μεταλλάξεων. Από τα προηγούμενα είναι ευκόλως εννοούμενο ότι τα γεγονότα αυτά συμβάλλουν στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη κακοήθειας. Η αποικοδόμηση της p53 εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της E6 τόσο με την p53 όσο και με την E6AP. Η αποικοδόμηση επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τις E6 των HPVs υψηλού κινδύνου και με μικρότερη αποτελεσματικότητα από τις E6 των HPVs χαμηλού κινδύνου. Ιοί HPV των οποίων οι E6 δεν αλληλεπιδρούν με καμία από τις p53 ή E6AP, είναι ανίκανοι να επηρεάσουν την ακεραιότητα της ογκοκατασταλτικής p53 (Εικόνα 1.6) (26, 60).

Μία περαιτέρω σημαντική λειτουργία της ογκοπρωτεΐνης E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης, ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού ενζύμου που προστατεύει το μήκος των τελομερικών δομών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Ο παράγοντας NFX1-91 αποτελεί αναστολέα της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης (hTERT). Η E6 επάγει την αποικοδόμηση μέσω ουβικουιτίνωσης του παράγοντα NFX1-91 κι έτσι ενεργοποιείται η έκφραση του γονιδίου hTERT. Κατ'επέκταση εξασφαλίζεται η προστασία και διατήρηση των τελομερικών δομών, γεγονός που οδηγεί στην αθανατοποίηση των κυττάρων (Εικόνα 1.6) (26, 60).



Εικόνα 1.6 : 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 είναι δυνατό να προσδεθεί σε πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (BAK, BAX) τις οποίες και αποικοδομεί μέσω ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα 26S, ασκώντας έτσι την αντι-αποπτωτική της δράση (27).

1.3.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

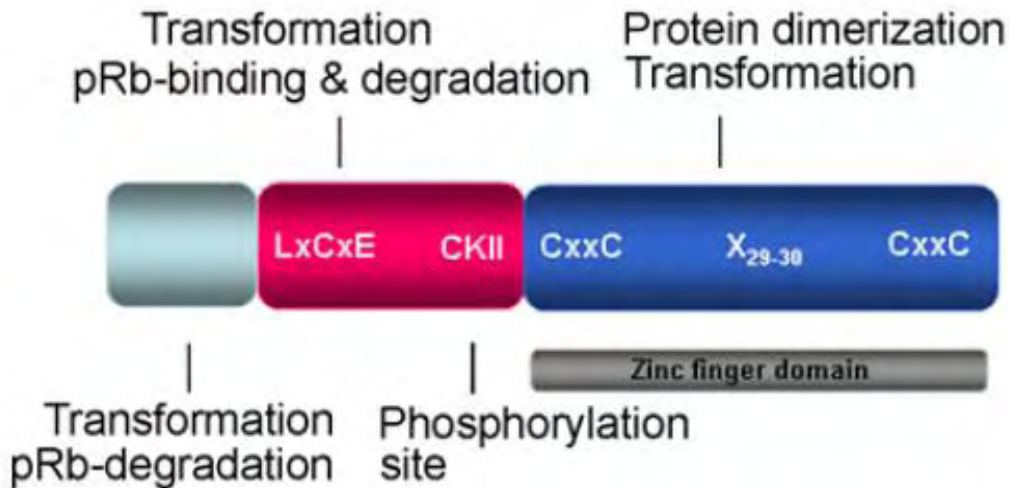
Η πρωτεΐνη E7 αποτελεί την δεύτερη βασική ογκοπρωτεΐνη του ιού, η οποία συμβάλλει στον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιό HPV υψηλού κινδύνου. Οι λειτουργίες της E7 παίζουν κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, καθώς επαναπρογραμματίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες προς όφελος της αναπαραγωγής του ιού. Παρ' όλα αυτά δεν κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς. Η δράση της ογκοπρωτεΐνης E7 συνδυάζεται με την δράση της E6, με αποτέλεσμα να επάγουν την εγκαθίδρυση της ογκογένεσης στα μολυσμένα κύτταρα (28).

Η πρωτεΐνη E7 είναι μία φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η E7 του ιού HPV 16 αποτελείται από 98 αμινοξέα και χαρακτηρίζεται από 3 συντηρημένες περιοχές (Conserved Regions, CR), τις CR1, CR2 και CR3. Στο N-τελικό άκρο εντοπίζεται η περιοχή CR1, η οποία είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης pRb. Στην περιοχή CR2 ανιχνεύεται το συντηρημένο αμινοξικό μοτίβο LXCXE, το οποίο εμπλέκεται στην πρόσδεση της E7 με την pRb. Είναι γεγονός ότι οι πρωτεΐνες E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου προσδέονται με αρκετά υψηλότερη συγγένεια στην pRb, σε σχέση με τις E7 των λιγότερο επικίνδυνων στελεχών. Τέλος, η συντηρημένη περιοχή CR3 εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και διαθέτει δύο μοτίβα CXXC δακτύλων ψευδαργύρου (28, 29).

Μία από τις βασικές λειτουργίες της ογκοπρωτεΐνης E7 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια του ρετινοβλαστώματος (όπως η pRb, p103, p107). Φυσιολογικά, στα μη μολυσμένα από ιό κύτταρα, η υποφωσφορυλιωμένη μορφή της pRb είναι προσδεδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Η πρόσδεση αυτή καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της pRb από κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases- cdk), επάγει την αποδέσμευση του E2F από την pRb και συνεπώς ενεργοποιείται η μεταγραφή των εν λόγω γονιδίων και στην μετάβαση στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιό, η πρόσδεση της ικής πρωτεΐνης E7 στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb αποτρέπει την σύνδεσή της με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Παράλληλα, η E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές των παραγόντων E2F. Κατά συνέπεια, οι παράγοντες E2F είναι ελεύθεροι να επάγουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε απορρύθμιση αυτού και τελικά σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (28, 30).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ική E7 αλληλεπιδρά και με τις απακετυλάσες των ιστονών (Histone Deacetylases- HDACs). Φυσιολογικά, στα κύτταρα που δεν έχουν

μολυνθεί από τον ιό, οι HDACs απομακρύνουν τις ακετυλομάδες από τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών, οδηγώντας έτσι σε συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb αλληλεπιδρά με τις HDACs και τις κατευθύνει στους υποκινητές των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F προκειμένου να αποτραπεί η μεταγραφή τους.



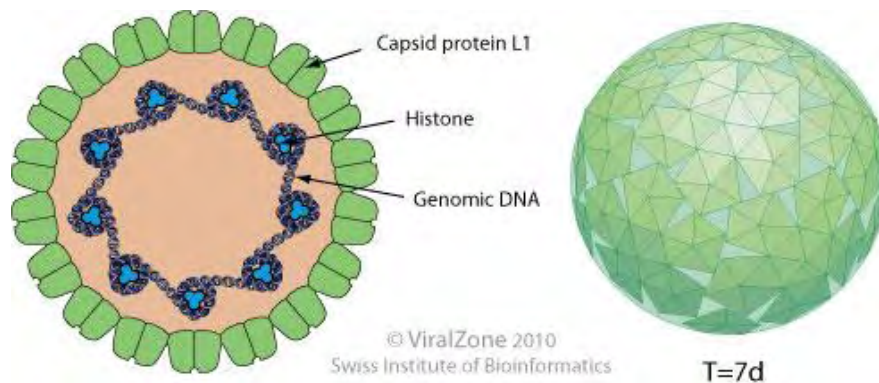
Εικόνα 1.7 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E7. Στην αναπαράσταση επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα. Χαρακτηρίζεται από τρεις συντηρημένες περιοχές: α) την CR1 (γκρίζο ανοιχτό χρώμα) που περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο, β) την CR2 (κόκκινο χρώμα) που περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία LXCXE και γ) η CR3 (μπλε χρώμα) που περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (32).

Αντιθέτως, στα προσβεβλημένα από τον ιό HPV κύτταρα, η ιική πρωτεΐνη E7 προσδένεται στις HDACs μέσω της συντηρημένης περιοχής CR3 και παρεμποδίζει την λειτουργία τους, επιτρέποντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (30).

Ακόμη, η E7 αλληλεπιδρά και με τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors, CKIs) p21 και p27. Κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, η μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S ελέγχεται αυστηρά από σύμπλακα κυκλινών- κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζονται από τους αναστολείς CKIs. Η ιική E7 αναστέλει την δράση των CKIs p21 και p27, των οποίων κύριος στόχος είναι η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση cdk2. Η cdk2 αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E, προωθώντας με αυτόν τον τρόπο την μετάβαση από την φάση G1 του κυτταρικού κύκλου στην φάση S. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση της E7 με τους αναστολείς οδηγεί σε υψηλά επίπεδα cdk2, ενώ παρατηρούνται και υψηλά επίπεδα των κυκλινών A και E (31, 32).

1.4. Δομή του καψιδίου

Το γονιδίωμα του ιού περικλείεται σε ένα καψίδιο το οποίο δομείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2 κι έχει διάμετρο 55-60 nm. Το καψίδιο του ιού δεν περιβάλλεται από εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα. Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες L1 και L2 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 1.8) (33).

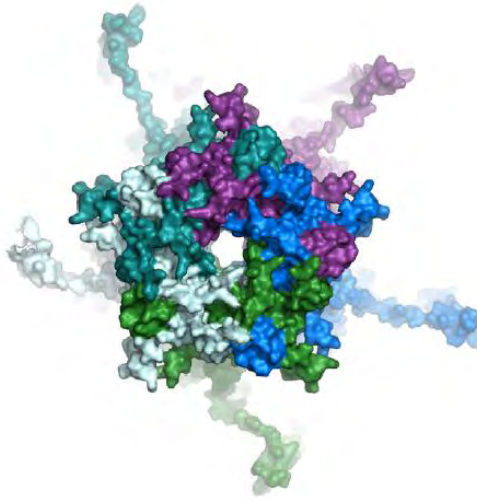


Εικόνα 1.8 : Δομή του καψιδίου των ιών HPV.

1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη L1

Η L1 αποτελεί την κύρια (μείζονα) πρωτεΐνη του ιικού καψιδίου, βάρους 55 kDa, και σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου. Συγκεκριμένα, αριθμούνται περίπου 360 αντίγραφα αυτής στην επιφάνεια του καψιδίου. Η έκφρασή της σε ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης έχει υποδείξει την ικανότητα «αυτοσυναρμολόγησης» της L1 προς σχηματισμό δομών που μοιάζουν με το πρωτότυπο (άδειο) καψίδιο (Virion-Like Particles- VLPs).

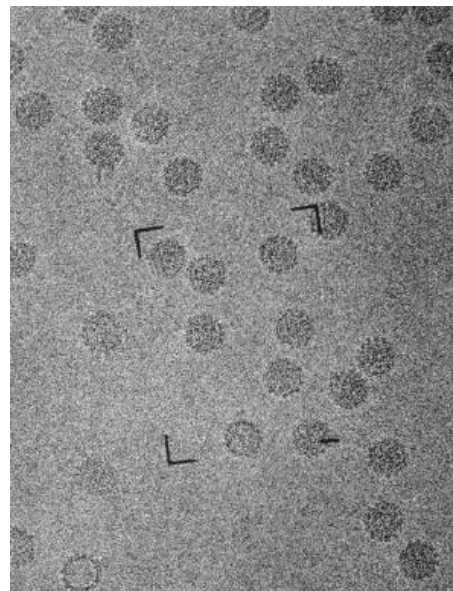
Η είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο από την αλληλεπίδραση και την πρόσδεση της L1 στην κυτταρική επιφάνεια. Επιπλέον, η L1 παίζει ρόλο και στην απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Η πρωτεΐνη συγκροτεί πενταμερή καψομερή σε σχήμα αστεριού και 72 από αυτά συναρμολογούν ένα ώριμο καψίδιο (Εικόνα 1.9) (34).



Εικόνα 1.9 : Η δομή ενός πενταμερούς καψομερούς (34).

1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη L2

Η L2 αποτελεί την ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη, βάρους 55 kDa και μήκους περίπου ίσο με 500 αμινοξέα και φαίνεται να συμμετέχει βοηθητικά σε αρκετές λειτουργίες του ιού. Όπως και η L1, έτσι και η L2 εκφράζεται μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, σε αντίθεση όμως με αυτήν δεν μπορεί να σχηματίσει VLPs και επιπλέον υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες (η αναλογία συγκέντρωσης των δύο πρωτεΐνων στο καψίδιο είναι περίπου 1:5 L2 προς L1, δηλαδή ένα μόριο L2 ανά πενταμερές καψομερούς). Συγκεκριμένα, η L2 αλληλεπιδρά με την L1 μέσω του C-τελικού άκρου και συμβάλλει στην συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων. Η βασικότερη λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 είναι η αλληλεπίδρασή της με τις ικές πρωτεΐνες L1 κατά τη συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων καθώς και η μετάφορά του ιικού DNA στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (7, 61).

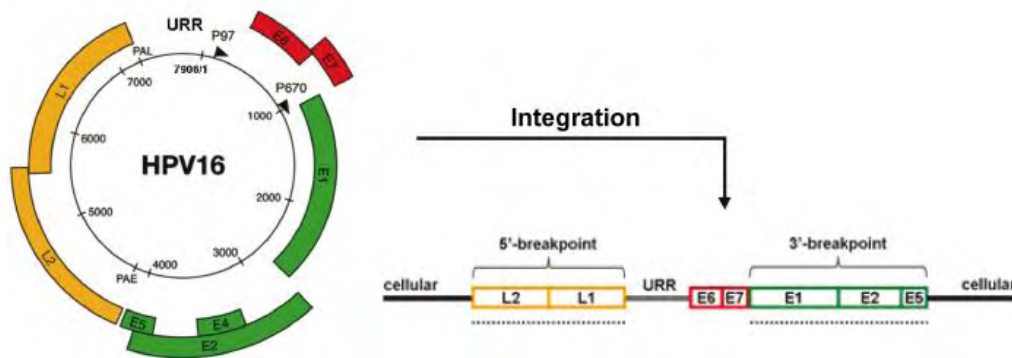


Εικόνα 1.10: Εικόνα ιοσωμάτων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

1.5. Μορφή του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται είτε σε κυκλική μορφή (επίσωμα), είτε ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή, είτε ταυτόχρονα και στις δύο

μορφές. Ο παραγωγικός κύκλος ζωής του ιού χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός σταθερού επισώματος και δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη κακοήθειας και καρκίνου (7). Έχει βρεθεί ότι στις περιπτώσεις υψηλού βαθμού δυσπλασίας και καρκίνου προκαλούμενου από HR-HPVs μειώνεται η ικανότητα του πολλαπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος και κατ' επέκταση μειώνονται και τα περιστατικά επιτυχούς παραγωγικού κύκλου ζωής. Αντιθέτως, τα φαινόμενα ρήξης και ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρικό DNA αυξάνονται με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιείται ρήξη του ιικού γονιδιώματος είναι ακόμα ασαφής. Ένας πιθανός λόγος που μπορεί να συμβαίνει ρήξη κρύβεται στην ενεργοποίηση των κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (DNA Damage Response- DDR). Κατά την μόλυνση από ιούς HPV υψηλού κινδύνου, πέρα από την έκφραση των ισχυρά ογκογόνων πρωτεϊνών E6 και E7, οι HR-HPVs ενεργοποιούν μηχανισμούς DDR καθώς φαίνεται να συμβάλλουν εν μέρει στον κύκλο ζωής του ιού. Παρ' όλα αυτά η παρουσία των μηχανισμών επιδιόρθωσης δημιουργούν γενωμική αστάθεια για το γονιδίωμα του ιού η οποία είναι ικανή να οδηγήσει τελικώς σε δίκλωνες ρήξεις του ιικού γονιδιώματος. Τα τμήματα που προκύπτουν από τις δίκλωνες ρήξεις είναι πολύ πιθανό να ενσωματωθούν στην συνέχεια σε κάποιο χρωμόσωμα του κυττάρου-ξενιστή (35). Μελέτες έχουν υποδείξει ότι οι θέσεις ενσωμάτωσης είναι στην πλειονότητά τους μεταγραφικά ενεργές θέσεις (36).



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των σημείων ρήξεως στο γραμμικό ιικό γονιδίωμα. Επισημαίνεται το 5' σημείο ρήξεως (5' breakpoint) στα γονίδια L1 και L2, καθώς και το 3' σημείο ρήξεως (3' breakpoint) στα γονίδια E1-E2-E5, που είναι και το συχνότερο (37).

Υπάρχουν δύο σημεία ρήξης, το 5' σημείο ρήξης (5' breakpoint) που εντοπίζεται στην περιοχή L1-L2 και το 3' σημείο ρήξης (3' breakpoint) που εντοπίζεται στην περιοχή E1-E2-E5, με το δεύτερο να αποτελεί και το πιο συχνά εμφανιζόμενο (Εικόνα 1.11). Η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος σε κυτταρικό χρωμόσωμα έχει

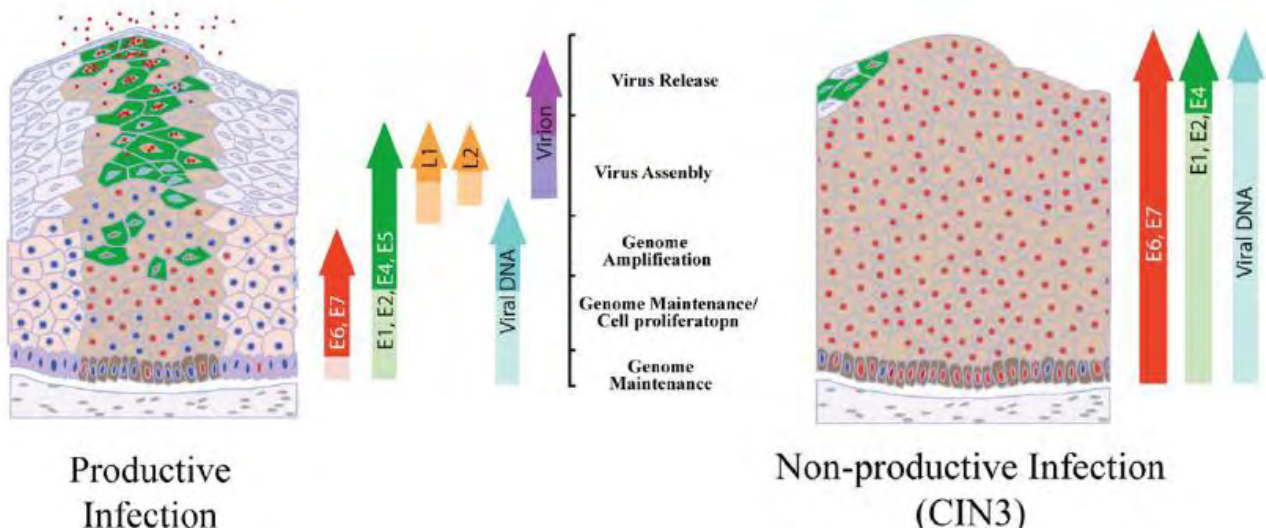
ως αποτέλεσμα την απώλεια τμήματος του ιικού γονιδίου E2. Αντιθέτως, τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντοτε ανέπαφα κατά την διαδικασία της ενσωμάτωσης. Έτσι, η καταστροφή του γονιδίου της E2, η οποία μεταξύ άλλων λειτουργεί και ως αρνητικός ρυθμιστής των ιικών ογκοπρωτεϊνών, με την παράλληλη διατήρηση των τελευταίων, έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή των E6 και E7, γεγονός που συμβάλλει καθοριστικά στην συσσώρευση γενετικών λαθών και εν τέλει στην εμφάνιση κακοήθους φαινοτύπου (7, 37).

1.6 Κύκλος ζωής των HPVs

1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων μολύνουν το πολύστιβο επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου. Η μόλυνση ξεκινά μόλις ο ιός εισβάλλει στο επιθήλιο μέσω μικροτραυματισμών και μολύνει τα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Ο κύκλος ζωής των ιών HPVs ακολουθεί την πρόοδο της διαφοροποίησης του επιθηλίου του ξενιστή. Τα κερατινοκύτταρα διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω, καθώς μόνο τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου έχουν την ικανότητα μίτωσης, έως ότου φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου ή του δέρματος όπου και αποπίπτουν. Ο κύκλος ζωής του ιού ξεκινά με την είσοδο στα κύτταρα της βασικής στιβάδας και εξελίσσεται μέσω της έκφρασης διαφορετικών πρωτεϊνών σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Η ολοκλήρωση του κύκλου λαμβάνει χώρα στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, όπου απελευθερώνονται τα νεοσυντιθέμενα ιοσωμάτια μέσω της απόπτωσης των διαφοροποιημένων πλέον κερατινοκυττάρων στα οποία περιέχονται (Εικόνα 1.12) (14, 38).

Ο ιός HPV εισέρχεται στο κύτταρο μέσω σύνδεσής του με τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαρίνης (Heparan Sulfate Proteoglycans- HSPG) που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη. Μετά την σύνδεση, το ιικό καψίδιο υφίσταται δομικές αλλαγές η οποίες είναι απαραίτητες για πρωτεόλυση της ελάσσονος καψιδιακής πρωτεΐνης L2 (furin cleavage). Αυτή η δεύτερη αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για την διείσδυση του ιού και την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα με τελικό στόχο την μεταφορά του στον πυρήνα (38, 39).



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων του HPV 16 κατά την παραγωγική μόλυνση (αριστερά) και κατά την μη-παραγωγική μόλυνση (δεξιά) που ως αποτέλεσμα έχει την εμφάνιση κακοήθους φαινοτύπου (40).

1.6.2. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Η διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού HPV χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματός του. Η πρώτη φάση αντιγραφής λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την μεταφορά του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Στην φάση αυτή διατηρείται χαμηλός αριθμός επισωματικών αντιγράφων (περίπου 200 αντίγραφα επισώματος ανά κύτταρο). Για την έναρξη της αντιγραφής απαραίτητη είναι η δράση των πρώιμων πρωτεϊνών του ιού E1 και E2. Συγκεκριμένα, ένα διμερές της E1 συνδέεται συνεργατικά με ένα διμερές της E2 στην θέση έναρξης αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος. Στην συνέχεια, η E2 αποδεσμεύεται από το σημείο και η E1 έχοντας δράση ελικάσης ξετυλίγει το DNA, επιτρέποντας τις πρωτεΐνες αντιγραφής να στρατολογηθούν στο σημείο. Η δεύτερη φάση της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος συμβαίνει στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, παράλληλα με την αντιγραφή του γονιδιώματος των κερατινοκυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο, από κάθε παρόν επίσωμα προκύπτουν δύο θυγατρικά αντίγραφα, από τα οποία μεταβιβάζεται ένα σε κάθε θυγατρικό κερατινοκύτταρο και το ιικό γονιδίωμα σταθεροποιείται στο επιθήλιο. Η τρίτη φάση της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος λαμβάνει χώρα στα διαφοροποιημένα πλέον κερατινοκύτταρα. Σε αυτή την φάση παρατηρείται εκθετική αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος προκειμένου τελικώς να πακεταρισθεί στα νεοσυντιθέμενα ισωμάτια και να προκύψουν οι νέοι ιοί (7, 41).

1.6.3. Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο κύκλος ζωής των ιών HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, γεγονός που σημαίνει ότι τόσο η αντιγραφή όσο και η μεταγραφή ρυθμίζονται αναλόγως το στάδιο διαφοροποίησης. Το γονιδίωμα των HPV διαθέτει δύο υποκινητές, τον P_E που είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων του ιού και τον P_L που είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των όψιμων γονιδίων. Συγκεκριμένα για τον HPV-16 οι υποκινητές είναι γνωστοί ως p97 και p670, αντίστοιχα. Η δράση των δύο αυτών υποκινητών ελέγχεται αυστηρά από τη ρυθμιστική περιοχή LCR, στην οποία συνδέονται τόσο κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όσο και ο ιικός ρυθμιστής E2 (13, 14).

Ο πρώιμος υποκινητής p97 ανιχνεύεται ανοδικά του γονιδίου E6 και είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων του ιού (E1, E2, E4, E5, E6, E7) στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα και τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Ο όψιμος υποκινητής p670 βρίσκεται εντός του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου της E7 και η δράση του ενεργοποιείται στις διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλίου. Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων επάγει την έκφραση των ρυθμιστικών γονιδίων E1 και E2, επιτρέποντας την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ενώ επίσης είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, των οποίων η έκφραση είναι απαραίτητη για την καψιδίωση του ιού και την σύσταση των νεοσυντιθέμενων ισωματίων (13, 14).

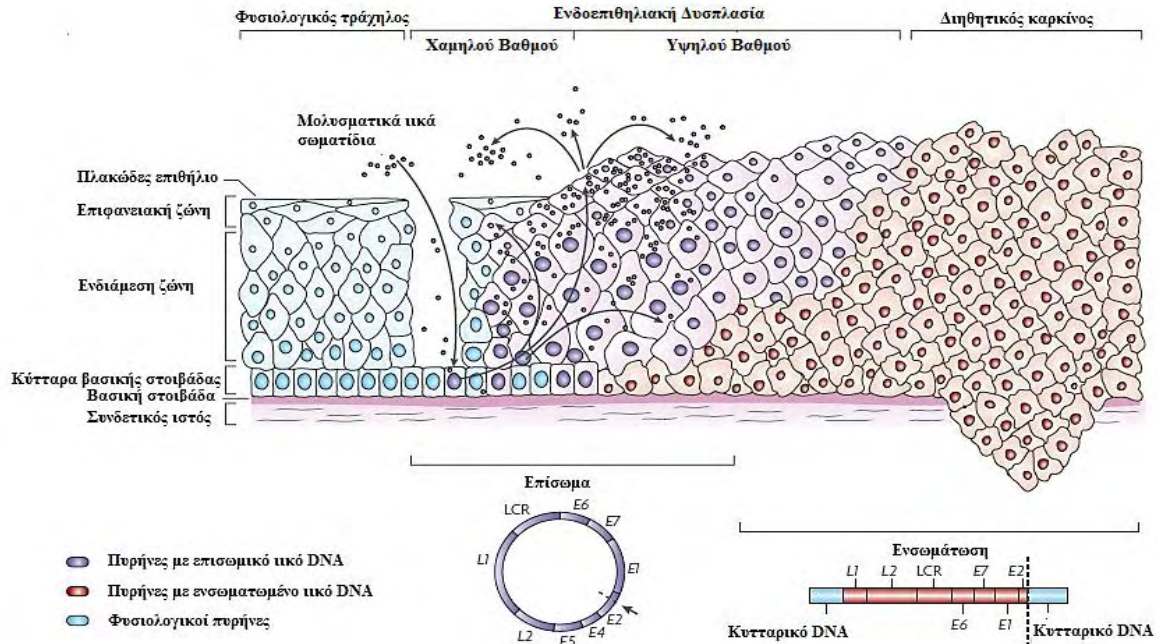
1.6.4. Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής του ιού HPV περιλαμβάνει την συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό των νεοσυντιθέμενων καψιδίων. Η καψιδίωση λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα όπου τα κερατινοκύτταρα είναι πλέον διαφοροποιημένα. Αρχικά, παράγεται η ελάχιστη καψιδιακή πρωτεΐνη L2, ακολουθεί η έξοδος του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και μετά παράγεται η μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη L1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού και είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου. Παράλληλα, η πρωτεΐνη E2 εκτός από μεσολαβητής της αντιγραφής και ρυθμιστής της μεταγραφής συμβάλλει και στην τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό των καψιδίων. Τελικώς ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια με την βοήθεια της πρωτεΐνης E1^{E4}, χωρίς να προκαλέσει λύση των κερατινοκυττάρων (14, 41).

1.7. Κλινικά συμπτώματα – Ιστολογικές αλλοιώσεις

Ανάλογα με τον τύπο, οι ιοί των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων παρουσιάζουν τροπισμό για το επιθήλιο του δέρματος και του βλεννογόνου. Ο τροπισμός του κάθε ιού εξαρτάται από τα μοτίβα της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος, στο οποίο καθοριστικό ρόλο παίζουν τα ρυθμιστικά στοιχεία της ρυθμιστικής περιοχής LCR. Ανάλογα με τον τροπισμό τους προκαλούν ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων που εκτείνεται από τα κοινά κονδυλώματα, που αποτελεί και το πιο σύνηθες σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, μέχρι και νεοπλασίες καλοήθους ή κακοήθους φύσεως του τραχήλου της μήτρας, του πρωκτού και του βλεννογόνου της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας (8).

Μεταξύ των ιών που μολύνουν το επιθήλιο του δέρματος οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι τύποι είναι οι HPV 1, 2, 3, 4, 10, 27, 57, 63 και 65 οι οποίοι αποτελούν και τύπους χαμηλής επικινδυνότητας. Οι ιοί αυτοί είναι δυνατό να προκαλέσουν ασυμπτωματικές μολύνσεις αλλά είναι και υπεύθυνοι για την εκδήλωση κατά κύριο λόγο καλοήθων δερματικών αλλοιώσεων και συναντώνται σχετικά συχνά στον πληθυσμό. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια και τελικά να εξαλειφτούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς (8).



Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων που προκαλούνται από τους HPV. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η κύρια μορφή του ιικού γονιδιώματος στο κάθε στάδιο ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (62).

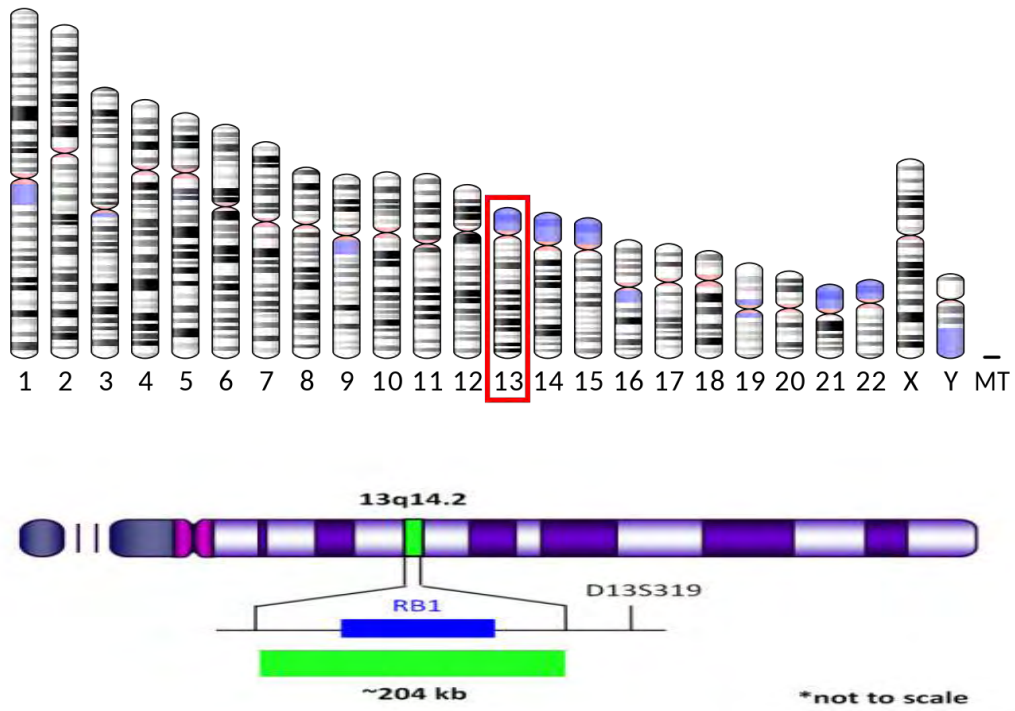
Οι ιοί που μολύνουν το βλεννογόνο επιθήλιο δύναται να προκαλέσουν από κονδυλώματα μέχρι και ανάπτυξη τραχηλικές, στοματοφαρυγγικές και άλλου τύπου νεοπλασίες και καρκίνο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαντικότερος εκπρόσωπος των υψηλού κινδύνου ιών είναι ο HPV 16, ο οποίος είναι συχνά αίτιος αρκετών σοβαρού τύπου καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καρκίνων του ουρογεννητικού συστήματος, καρκίνο του πρωκτού καθώς και καρκίνο της κεφαλής και του λαιμού (14).

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εστιάζεται στις τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον ιό HPV-16. Οι τραχηλικές αλλοιώσεις, μετά το Test Pap, κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες σύμφωνα με το σύστημα Bethesda: χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και την υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) (62).

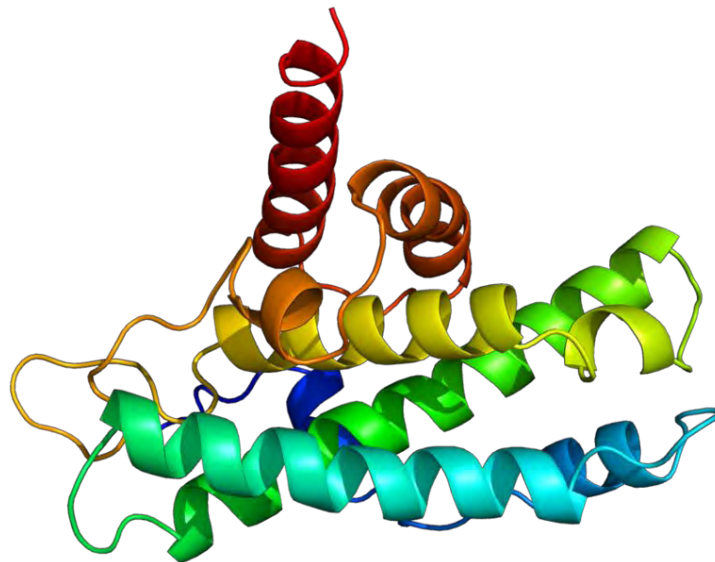
1.8 Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb)

Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος ή οικογένεια των “rocket” proteins, απαρτίζεται από πρωτεΐνες που παίζουν καθοριστικό και καταλυτικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S. Η χαρακτηριστικότερη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η γενετική θέση του γονιδίου (rb1) που κωδικοποιεί την pRb εντοπίζεται στον βραχίονα q του 13^{ου} χρωμοσώματος και πιο συγκεκριμένα στην θέση 13q14.2 (Εικόνα 1.14). Στην οικογένεια των “rocket” proteins συμπεριλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες p107 και p130. Ο ρόλος της pRb ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε μέσα από την μελέτη του γονιδίου rb1 στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου του αμφιβληστροειδούς, γνωστός και ως οικογενές ρετινοβλάστωμα (42).

Το γονίδιο rb1 έχει μήκος 178.144bp, αποτελείται από 27 εξόνια και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 150kDa που αποτελείται από 928 αμινοξέα (42, 43).



Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση της θέσης του γονιδίου RB1.

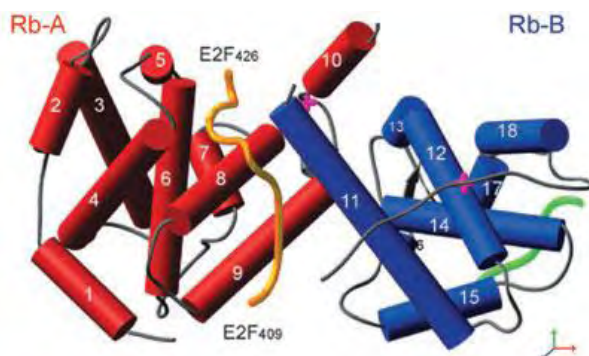


Εικόνα 1.15: Δομή της πρωτεΐνης pRb. Η απεικόνιση της δομής έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.

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

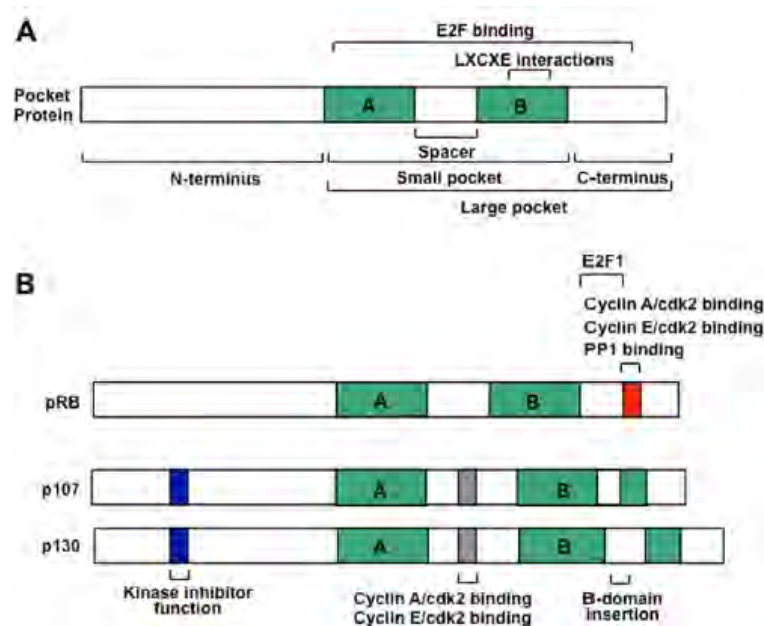
Τα μέλη που επανδρώνουν την οικογένεια των «pocket» proteins χαρακτηρίζονται από αρκετές δομικές ομοιότητες. Η πιο χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των pRb, p107 και p130 αντιστοιχεί σε μία περιοχή που ονομάζεται “small rocket”. Η περιοχή αυτή αποτελείται από τις επικράτειες A και B, οι οποίες χωρίζονται από μία εύκαμπτη περιοχή που ονομάζεται “spacer”. Οι επικράτειες A και B είναι γνωστές και ως “AB rocket” κι έχει βρεθεί ότι σε αυτές προσδένονται διάφορες ικές ογκοπρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων η E7 ογκοπρωτεΐνη του ιού HPV, η E1A πρωτεΐνη του αδενοϊού. Πέρα από τις ικές πρωτεΐνες, το “AB rocket” συνιστά περιοχή πρόσδεσης και πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών που διαθέτουν το σταθερό αμινοξικό μοτίβο LXCXE. Η περιοχή “small rocket” μαζί με το C-τελικό άκρο των πρωτεϊνών συγκροτούν την περιοχή που αναφέρεται και ως “large rocket”(42). Η περιοχή “large rocket” καθορίζει και την ικανότητα ογκοκαταστολής των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής (44).

Συγκεκριμένα, η περιοχή “large rocket” είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τα μόρια της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F. Η οικογένεια των E2F συγκροτείται από 6 μέλη (E2F-1 έως E2F-6), με χαρακτηριστικότερο αυτών να αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1. Γενικά, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Rb με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F συνιστά ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος και σε αυτό κυρίως έγκειται η ικανότητά τους να ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Παρόλο που η θέση σύνδεσης του E2F διαφέρει από την θέση πρόσδεσης της αλληλουχίας LXCXE (άρα και θέση πρόσδεσης των ικών ογκοπρωτεϊνών) είναι δυνατό η σύνδεση της ικής E7 να διαταράξει την ισχύ σύνδεσης του E2F στις πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος. Η διατάραξη της σύνδεσης E2F-pRb κατ’επέκταση διαταράσσει και τις λειτουργίες της pRb αυξάνοντας την πιθανότητα απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (45).



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της pRB. 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 (59).

Η συνολική δομή της περιοχής “large pocket” είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των τριών μελών της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος. Παρ’ όλα αυτά, φαίνεται ότι οι p107 και p130 διαθέτουν μεγαλύτερη ομοιότητα (περίπου 50%) στην αμινοξική αλληλουχία απ’ ότι με την pRb (περίπου 30-35%). Εξίσου παράδοξο είναι και το γεγονός ότι παρ’ όλο που η pRb αποτελεί την σημαντικότερη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη εκ των τριών, ελάχιστα από τα δομικά χαρακτηριστικά που διαθέτει φαίνεται να λείπουν από τις p107 και p130. Τα δύο κύρια και πιο χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία που απουσιάζουν από τις άλλες δύο είναι μία θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1, καθώς και μία βραχεία πεπτιδική περιοχή στο C-τελικό άκρο που λειτουργεί ως θέση σύνδεσης κυκλινών/κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) ή ως θέση σύνδεσης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (PP1). Από την άλλη όμως, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν εξίσου στοιχεία που απουσιάζουν από την pRb. Συγκεκριμένα, στην επικράτεια B των p107 και p130 ανιχνεύονται κάποιες προσθήκες, οι οποίες στην περίπτωση της p130 υφίστανται φωσφορυλίωση για μεγαλύτερη σταθερότητα δομής. Ακόμη, οι p107 και p130 κατέχουν μεγαλύτερες περιοχές “spacer” από την pRb, δίνοντάς τους την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν σταθερά με συμπλέγματα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Τέλος, οι πρωτεΐνες p107 και p130 διαθέτουν μία N-τελική περιοχή που εξυπηρετεί στην αναστολή της δράσης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (45).



Εικόνα 1.17: 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 κίνησης, η θέση δέσμευσης κυκλίνης και μία εισαγωγή στην περιοχή B pocket (45).

1.8.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την pRb

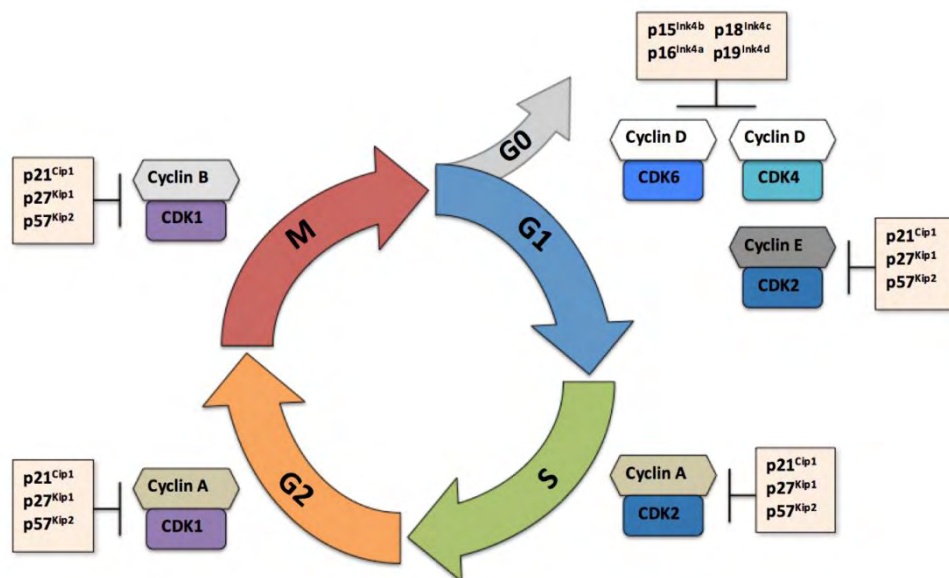
Τα φυσιολογικά κύτταρα ανταποκρίνονται στην επίδραση εξωγενών μιτογόνων και αυξητικών σημάτων σε συγκεκριμένη φάση του κύκλου ζωής τους. Συγκεκριμένα, ένα κύτταρο μπορεί να διεγερθεί από εξωτερικά σήματα μόνο κατά τα πρώτα 2/3 της φάσης G1. Σε αυτό το σημείο καθορίζεται η τύχη του κυττάρου, δηλαδή το αν θα προχωρήσει σε κυτταρική αύξηση και μίτωση ή το αν θα παραμείνει στην φάση G₀. Το σημείο αυτό είναι ένα σημείο-κλειδί καθώς αποτελεί κεντρικό γεγονός για την εξέλιξη της τύχης του κυττάρου και ονομάζεται σημείο περιορισμού (Restriction Point) (43, 47).

Η πρωτεΐνη pRb αποτελεί τον μοριακό «διακόπτη» ελέγχου του σημείου περιορισμού. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή απαντάται σε δύο μορφές: την ενεργό υποφωσφορυλιωμένη μορφή και την ανενεργό υπερφωσφορυλιωμένη μορφή. Στα κύτταρα που βρίσκονται στην φάση G₀, η pRb συναντάται στην ενεργό υποφωσφορυλιωμένη μορφή της. Σε αυτή την μορφή, η pRb προσδένει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου καθώς εμποδίζει την μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από την δράση των E2F. Πρόκειται για γονίδια των οποίων τα προϊόντα εξυπηρετούν την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, η pRb καταστέλλει την έκφραση αυτών των γονιδίων με άμεσο τρόπο, στρατολογώντας στην περιοχή των υποκινητών τους κατασταλτικούς παράγοντες, όπως HDACs και μεθυλοτρανσφεράσες (43).

Η μετάβαση στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου κατευθύνεται από τις κυκλίνες, τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-Dependent Kinases, CDK) και τους αναστολείς αυτών (CDK Inhibitors- CKI). Οι κυκλίνες του κάθε κυτταρικού σταδίου καθοδηγούν τις αντίστοιχες CDK στις κατάλληλες πρωτεΐνες-υποστρώματα που είναι υπεύθυνες για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, προκειμένου να τις φωσφορυλιώσουν. Παρόλο που οι CDK παράγονται καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η σύνδεσή τους με τις κυκλίνες είναι απαραίτητη προκειμένου να ενεργοποιηθούν. Από την άλλη, τα διάφορα είδη κυκλινών συντίθενται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και μόλις ενεργοποιήσουν τις αντίστοιχες CDK-στόχους τα επίπεδά τους ελαττώνονται τάχιστα (43, 48).

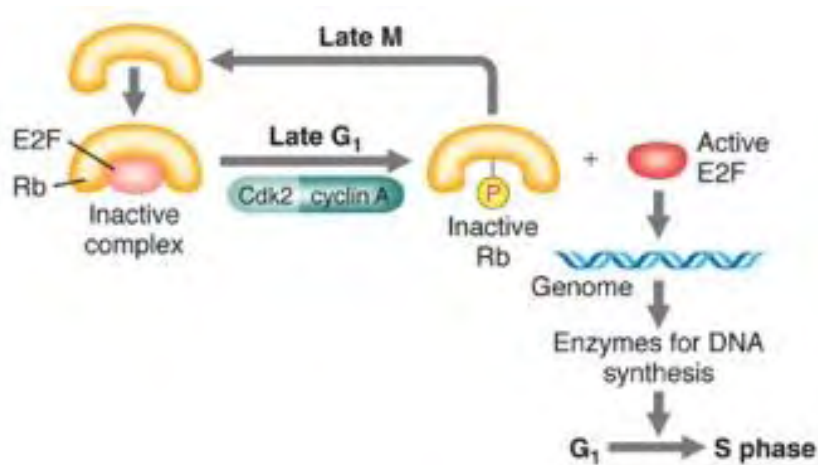
Η δραστηριότητα των CDK ρυθμίζεται επίσης και από δύο ομάδες αναστολέων CKI. Η πρώτη ομάδα αναστολέων αποτελείται από τις πρωτεΐνες p21, p27 και p57 και έχουν μία γενικότερη δράση στις CDK. Η δεύτερη ομάδα αναστολέων απαρτίζεται από τις p15, p 16, p18 και p19 οι οποίες αναφέρονται και ως INK4 πρωτεΐνες (p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, p19INK4d). Η δράση των αναστολέων της δεύτερης ομάδας είναι πιο ειδική, δρώντας στα συμπλέγματα κυκλίνης D/CDK4 και 6 (43, 63).

Στα αρχικά στάδια της φάσης G1, με την επίδραση ενός διεγερτικού σήματος από αυξητικό παράγοντα, επάγεται η σύνθεση των κυκλινών D (D1, D2, D3). Οι D κυκλίνες δημιουργούν συμπλέγματα με τις CDK4 και CDK6, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρώτη και μερική φωσφορυλίωση της υποφωσφορυλιωμένης pRb. Σε επόμενο στάδιο της G1 αυξάνεται η σύνθεση της κυκλίνης E, η οποία δημιουργεί σύμπλεγμα με την CDK2. Το σύμπλεγμα αυτό είναι υπεύθυνο για την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb. Παράλληλα, τα συμπλέγματα κυκλίνης A/CDK2 και κυκλίνης B/CDK1 (η CDK1 αναφέρεται συχνότερα και ως CDC2) διατηρούν την pRb σε κατάσταση υπερφωσφορυλίωσης για τα επόμενα στάδια του κυτταρικού κύκλου, μέχρι αυτή να αποφωσφορυλιωθεί. Η αποφωσφορυλίωση και συνεπώς ενεργοποίηση της pRb λαμβάνει χώρα στο τέλος του κυτταρικού κύκλου, μόλις δηλαδή το κύτταρο ολοκληρώσει την μίτωση και εισέλθει πάλι στην φάση G1 (ή τη G₀) (43, 48, 63).



Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των αντίστοιχων κυκλινών και κυκλινεξαρτώμενων κινασών για κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου καθώς και των CKIs τους (63).

Η υπερφωσφορυλίωση της pRb εξυπηρετεί την απενεργοποίησή της, δηλαδή την απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F. Με αυτόν τον τρόπο, οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F είναι ελεύθεροι να επιτελέσουν την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με α) την σύνθεση του DNA (π.χ. η κινάση θυμιδίνης, απακετυλάση των ιστονών-1, DNA πολυμεράση-α), β) τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (π.χ. κυκλίνη E,A και CDKs 2 και 4), γ) την έκφραση των “rocket” πρωτεϊνών (pRb, p107), δ) τον έλεγχο των πρωτοογκογονιδίων (όπως το myc), ε) την αυτορρύθμιση της μεταγραφής των ίδιων E2F-1 και E2F-2 παραγόντων, και στ) την απόπτωση με σταθεροποίηση της p53 μέσω της έναρξης έκφρασης του p14ARF (46).



Εικόνα 1.20: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της pRB. Η φωσφορυλίωση της pRB από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος με την σειρά του επάγει την μεταγραφή γονιδίων που καθοδηγούν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S.

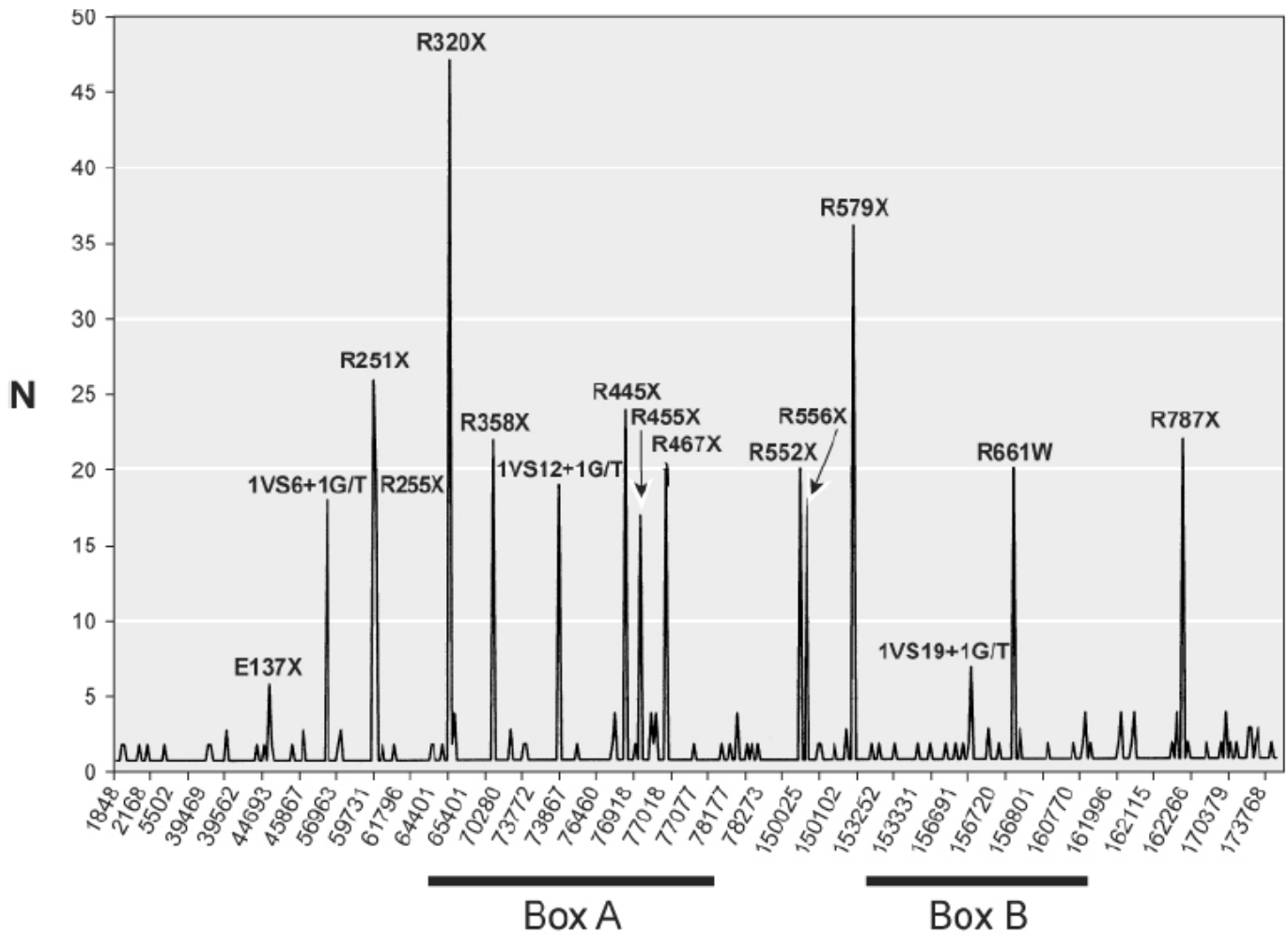
1.8.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου RB1

Γενικότερα, μεταλλάξεις του γονιδίου RB1 έχουν ελεγχθεί κατά κύριο λόγο στον καρκίνο του ρετινοβλαστώματος αλλά και σε κάποιους άλλους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας.

Από την ανάλυση των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί στο γονίδιο RB1 έχουν προκύψει τα εξής συμπεράσματα:

- Η λειτουργία της πρωτεΐνης pRb συχνά απενεργοποιείται από ελλείψεις (deletions) και από nonsense μεταλλάξεις. Παρ' όλα αυτά στις περισσότερες γενετικές ασθένειες, η απώλεια της λειτουργίας της οφείλεται σε missense μεταλλάξεις.
- Ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (περίπου 40%) των μεταλλάξεων του RB1 είναι επαναλαμβανόμενες και συγκεντρώνονται σε 16 "hotspots". Σε αυτές τις μεταλλάξεις συμπεριλαμβάνονται 12 nonsense μεταλλάξεις, δύο missense μεταλλάξεις και 3 μεταλλάξεις ματίσματος. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις που έχουν καταγραφεί κατά μήκος του γονιδίου είναι διάσπαρτες και εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στα εξόνια 9, 10, 14, 17, 18, 20 και 23.
- Η ανάλυση των μεταλλάξεων του RB1 λαμβάνοντας υπ' όψιν την 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 πιθανή εμπλοκή προδιάθεσης λόγω εθνικής προέλευσης.
- Οι περισσότερες από τις καταγεγραμμένες μεταλλάξεις χωρίζονται σε 3 ομάδες: α) μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή του RB1 με αποτέλεσμα την διατάραξη των φυσιολογικών επιπέδων έκφρασης της pRb, β) missense μεταλλάξεις σε μη βασικά μοτίβα της αλληλουχίας της πρωτεΐνης pRb, που έχουν σαν αποτέλεσμα την μερική απενεργοποίηση των λειτουργιών της, γ) μεταλλάξεις ματίσματος που επηρεάζουν το φυσιολογικό

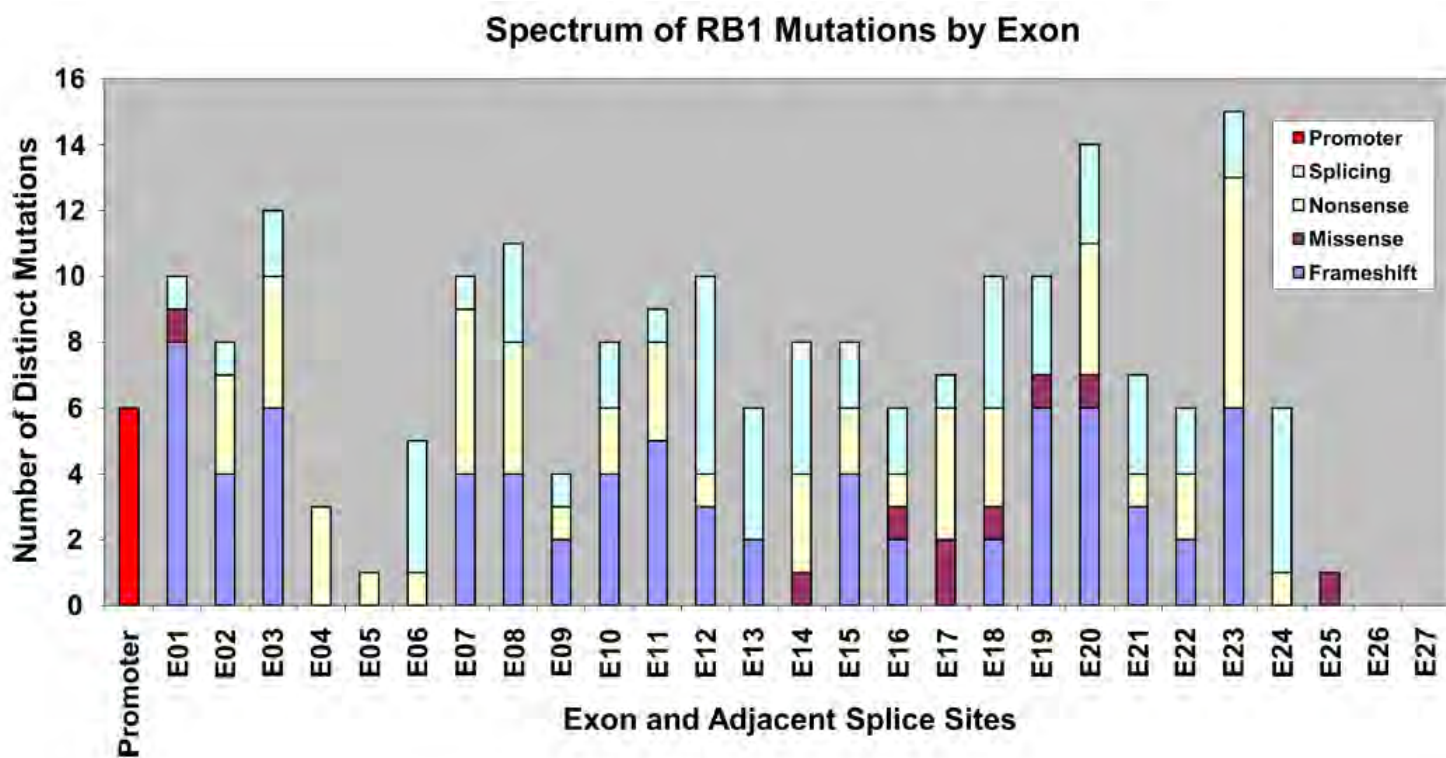
μάτισμα ή οδηγούν σε εναλλακτικό μάτισμα και κατ' επέκταση σε ασθενή αλληλόμορφα (49).



Εικόνα 1.21: Σχηματική αναπαράσταση του RB1 όπου παρουσιάζονται οι θέσεις των συχνότερων μεταλλάξεων (hotspots) (49).

Είναι ευνόητο ότι εκτός των θερμών σημείων (“hotspots”) έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις διάσπαρτες κατά μήκος των υπόλοιπων περιοχών του γονιδίου RB1, οι οποίες αποτελούν μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου (frameshift), είτε μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων είτε σε διατάραξη του φυσιολογικού ματίσματος. Μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου εντοπίζονται σε όλο το μήκος του γονιδίου, με μικρότερη συχνότητα στα εξόνια 5, 14, 15, 24, 25 καθώς και στα εξαιρετικά συντηρημένα εξόνια 26 και 27. Από την άλλη, οι μεταλλάξεις ματίσματος φαίνονται να είναι κατανομημένες σε όλο το μήκος της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου RB1, δείχνοντας περισσότερη

προτίμηση για τις γειτονικές περιοχές ιντρονίων στα εξόνια 6, 12, 16, 17, 19, και 24, τρεις από αυτές ανήκουν και σε θέσεις θερμών σημείων όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα. Γενικά, οι περισσότερες missense μεταλλάξεις εντοπίζονται στις επικράτειες A και B, αλλά κυρίως στην επικράτεια B, η οποία έχει και καθοριστική σημασία για την δομή της “τσέπης” της pRb και κωδικοποιείται από τα εξόνια 19-23 (50, 51).



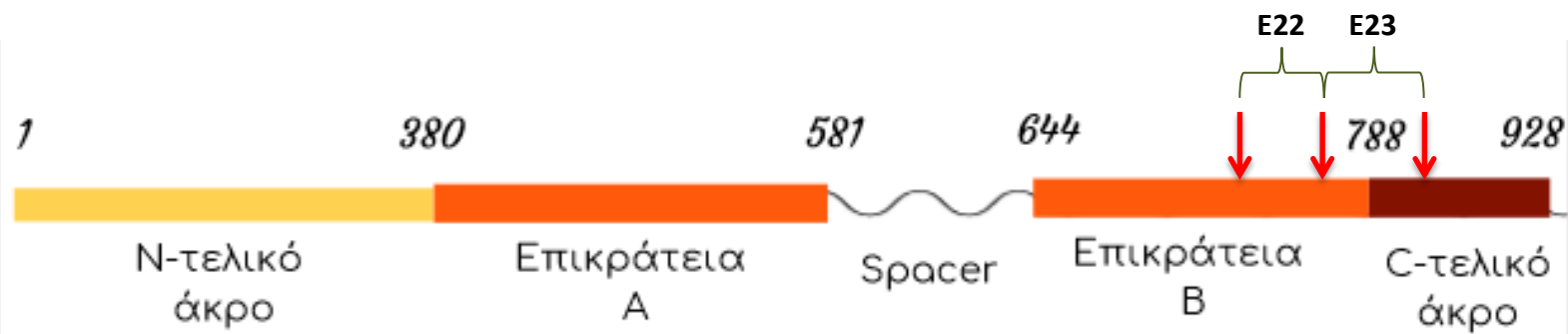
Εικόνα 1.22: Διαγραμματική απεικόνιση της συχνότητας των διαφορετικών τύπων μεταλλάξεων σε κάθε ένα εξόνιο του γονιδίου RB1 (50).

1.8.4 Εξόνια 22 και 23 της πρωτεΐνης pRb

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη ελέγχθηκε η ύπαρξη πολυμορφισμών στα εξόνια 22 και 23 της πρωτεΐνης pRb. Η πρωτεΐνη pRb αποτελείται από τις εξής δομικές περιοχές:

- Το N-τελικό άκρο: αμινοξέα 1-379
- Α επικράτεια (domain A): αμινοξέα 380-581
- Ενδιάμεση περιοχή spacer: αμινοξέα 582-643
- Β επικράτεια (domain B): αμινοξέα 644-787
- Το C-τελικό άκρο: αμινοξέα 788-928

Το εξόνιο 22 κωδικοποιεί την περιοχή της πρωτεΐνης pRb που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 738-775 (38 αμινοξέα). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η περιοχή αυτή εντοπίζεται στην επικράτεια Β. Αντιστοίχως, το εξόνιο 23 κωδικοποιεί την περιοχή που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 776-829 (54 αμινοξέα) και εντοπίζεται στο τέλος της επικράτειας Β μέχρι την αρχή της C-τελικής περιοχής της πρωτεΐνης.



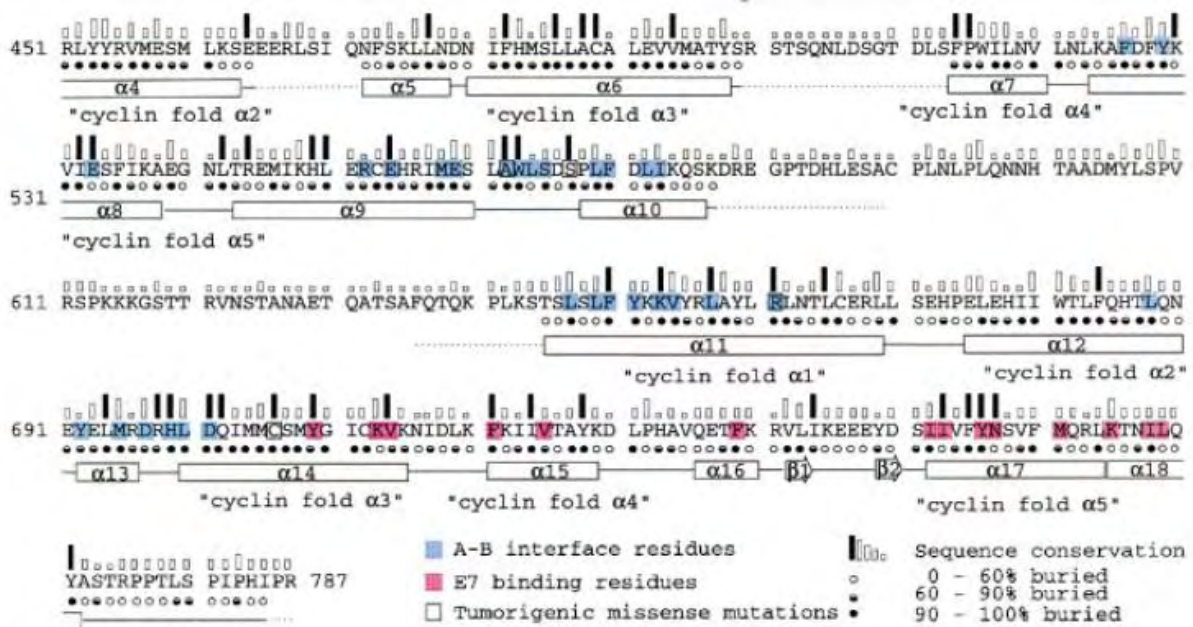
Εικόνα 1.23: Σχηματική αναπαράσταση της pRB όπου με κόκκινα βέλη απεικονίζεται η αμινοξική περιοχή που κωδικοποιείται από τα εξόνια 22 και 23.

Η πρωτεΐνη Rb διαθέτει 16 πιθανές θέσεις για φωσφορυλίωση από τα συμπλέγματα κυκλινών/CDKs. Οι θέσεις αυτές είναι οι ακόλουθες (η αρίθμηση ξεκινά από το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης): 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) (51). Οι θέσεις φωσφορυλίωσης που ανιχνεύονται στην περιοχή που μελετάται στην παρούσα εργασία, δηλαδή την περιοχή που κωδικοποιείται από τα εξόνια 22 και 23, είναι οι εξής: Ser 780, Ser 788, Ser 795, Ser 807, Ser 811, T 821 και T 826. Συγκεκριμένα, οι προαναφερθείσες θέσεις φωσφορυλίωσης εντοπίζονται μόνο στην περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο 23, καθώς το εξόνιο 22 δεν φαίνεται να κωδικοποιεί πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης.

Δεν φωσφορυλιώνουν όλες οι CDKs 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. Τα 3 συμπλέγματα κυκλινών/CDKs δρουν συμπληρωματικά μεταξύ τους προκειμένου να φωσφορυλιωθεί πλήρως η πρωτεΐνη pRb, με την κάθε φωσφορυλίωση από διαφορετικό σύμπλεγμα να έχει διαφορετική επίδραση στην βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης. Όπως έχει ήδη

αναφερθεί, η υπερφωσφορυλίωση της Rb οδηγεί στην «απελευθέρωση» του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 και κατ'επέκταση στην έναρξη της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών E2F από τον αρνητικό ρυθμιστή τους, την pRb, μπορεί να γίνει με 2 διαφορετικούς μηχανισμούς. Στην πρώτη περίπτωση, η φωσφορυλίωση των θέσεων φωσφορυλίωσης που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 23 (exon 23 - phosphorylation sites) οδηγεί σε αποδέσμευση των πρωτεϊνών E2F. Στη δεύτερη περίπτωση, η φωσφορυλίωση στις θέσεις Ser608 ή/και Ser612 στην περιοχή spacer (exon 19) αναστέλλει επίσης τη σύνδεση των E2F με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (52).

Όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί, το εξόνιο 22 κωδικοποιεί ένα τμήμα 37 αμινοξέων που εντοπίζεται προς το τέλος της επικράτειας B, ενώ το εξόνιο 23 κωδικοποιεί το τμήμα που απαρτίζεται από το τέλος της επικράτειας B και ένα αρχικό τμήμα της C-τελικής περιοχής. Συγκεκριμένα, η περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο 23 διαθέτει αρκετά κατάλοιπα σερίνης κι δύο κατάλοιπα θρεονίνης που φωσφορυλιώνονται (**Ser 780, Ser 788, Ser 795, Ser 807, Ser 811, Thr 821 και Thr 826**). Η φωσφορυλίωση της pRb στις διάφορες θέσεις επηρεάζει την βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικά, η φωσφορυλίωση στις θέσεις Ser 788, Ser 795 (καθώς και των Thr 373 και Ser 608/Ser 612 που όμως δεν εντοπίζονται στο τμήμα που μελετάται στην παρούσα εργασία) μετέχει στην απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F.



Εικόνα 1.24: Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος της pRb 451-770, στο οποίο απεικονίζονται τα κατάλοιπα στα οποία προσδένεται το LXCXE μοτίβο (με ροζ), τα κατάλοιπα τα οποία σχηματίζουν την A-B επιφάνεια (με γαλάζιο). Οι μπάρες επάνω από τα κατάλοιπα υποδεικνύουν το ποσοστό συντήρησης των καταλοίπων (53).

Ακόμη, η φωσφορυλίωση των Thr 821 και Thr 826 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της πρόσδεσης του LXCXE μοτίβου και άρα της E7 ογκοπρωτεΐνης του ιού HPV 16. Έχουν προταθεί δύο πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό: είτε η φωσφορυλίωση μπλοκάρει τις θέσεις πρόσδεσης του μοτίβου, είτε προκαλεί αλλαγή στην διαμόρφωση μέσω της οποίας οι θέσεις πρόσδεσης δεν είναι πλέον προσβάσιμες από το μοτίβο. Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης των θέσεων Ser 780, Ser 807 και Ser 811 δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός (64).

Πέρα από τις θέσεις φωσφορυλίωσης που διαθέτει, σε αυτή την περιοχή εντοπίζονται και τα αμινοξέα στα οποία συνδέεται το πεπτιδικό μοτίβο LXCXE. Το μοτίβο αυτό εντοπίστηκε αρχικά σε ικές ογκοπρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά όμως, φαίνεται ότι προσδένονται σε αυτή την περιοχή και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως ένζυμα τροποποίησης των ιστονών και σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (64). Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην σύνδεση του LXCXE μοτίβου είναι τα εξής: **Y 709, K 713, V 714, F 721, V 725, F 739, I 752, I 753, Y 756, N 757, M 761, K 765, I 768 και L 769** (Εικόνα 1.24) (53). Τα αμινοξέα που αναγράφονται με έντονη γραφή εντοπίζονται στην περιοχή που μελετάται στην παρούσα εργασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο έλεγχος των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών των εξονίων 22 και 23 του γονιδίου RB1 σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό με στόχο την εύρεση πιθανών πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλινικά δείγματα

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν 43 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό, εκ των οποίων τα 34 είναι θετικά για τον HPV-16 και τα 9 αρνητικά για τον HPV-16. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2010-2016 από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας» και από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε υγρό υλικό συντήρησης Thin Prep.

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν στις εξής κατηγορίες:

- 1 καρκινικό δείγμα θετικό για HPV-16
- 21 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16
- 12 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16
- 9 δείγματα, αρνητικά για HPV-16

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
10732-14	Καρκίνος	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Πίνακας 3.1: Καρκινικό δείγμα θετικό για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το υλικό μέσο συλλογής και το Νοσοκομείο προέλευσης.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
HG 626-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
HG 889-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
HG 162-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
HG 1411-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
HG 1083-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
HG 158-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑΤΤ80	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10645-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10647-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10693-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10682-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
10694-14	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΑG 3591	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας»
ΑG 3629	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας»
PNL1	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL4	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL6	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL10	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

PNL12	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
PNL15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 3.2: Δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το υλικό μέσο συλλογής και το Νοσοκομείο προέλευσης των δειγμάτων.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
LG 159-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 212-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 900-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 912-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 1089-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 1759-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 2085-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
LG 2192-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ATT4	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ATT45	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ATT51	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
AG 3670	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Thin Prep	Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας»

Πίνακας 3.2: Δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το υλικό μέσο συλλογής και το Νοσοκομείο προέλευσης των δειγμάτων.

Κωδικοποίηση δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
WNL 1941-14	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 555-15	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 1100-14	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 1229-14	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 2418-14	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 2087-14	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 209-16	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 212-16	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
WNL 215-16	Αρνητικό για HPV-16	Thin Prep	Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Πίνακας 3.3: Δείγματα αρνητικά για HPV-16 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον πίνακα παρουσιάζονται περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το υλικό μέσο συλλογής και το Νοσοκομείο προέλευσης των δειγμάτων.

3.2 Εκχύλιση του DNA από υγρό υλικό συντήρησης Thin Prep

Η απομόνωση του DNA των εν λόγω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (65).

Πειραματική διαδικασία μεθόδου:

Σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml τοποθετήθηκαν κατά σειρά 10μl γλυκογόνου (100mg/ml), 300μl Lysis Buffer (με σύσταση: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol, 25mM sodium citrate) και τέλος 100μl δείγματος, με επακόλουθη ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση στους -20° C, για 20 λεπτά. Μετά την δεύτερη επώαση, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 14.000rcf, για 10 λεπτά, απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% (-20° C). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση στις 14.000rcf, για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τέλος, το ίζημα (που περιείχε

και το DNA) επαναδιαλύθηκε σε 100μl δις απεσταγμένου νερού, ελεύθερου DNAασών και RNAασών. Το εκχύλισμα του DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C ώστε να είναι διαθέσιμο για μελλοντική χρήση.

3.3. Έλεγχος εκχύλισης

Ο έλεγχος για την διαπίστωση της επιτυχούς και ορθής εκχύλισης του DNA, καθώς και ο έλεγχος για την παρουσία αναστολέων της αντίδρασης πολυμεράσης διενεργήθηκε με PCR. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών ειδικό για το γονίδιο της β-ακτίνης. Η αλληλουχία των εν λόγω εκκινητών παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα καθώς και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος της PCR.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' – 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
β-ακτίνη	b-actinF	AGCCATGTACGTTGCTATCC	485 bp
	b-actinR	TTGGCGTACAGGTCTTTGC	

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl. Η σύσταση της τελικής αντίδρασης περιελάμβανε 1mM dNTPs, τους εκκινητές b-actinF σε τελική συγκέντρωση 25pmol και b-actinR 25pmol, 1.25U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (DreamTaq™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA) καθώς και το αντίστοιχο DreamTaq™ Buffer (1X, σε αυτή την συγκέντρωση το ρυθμιστικό παρέχει στην αντίδραση 2mM MgCl₂).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min
40 κύκλοι	Αποδιάταξη	95 °C	30 sec
	Υβριδισμός εκκινητών	55 °C	30sec
	Πολυμερισμός	72 °C	1 min
	Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε γέλη αгарόζης 2%.

3.4. Ανάλυση πολυμορφισμών των εξονίων 22 και 23 του RB1

3.4.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RB1 που περιλαμβάνει τα εξόνια 22 και 23

Το τμήμα του γονιδίου RB1 το οποίο περιέχει ολόκληρο το εξόνιο 22, το ιντρόνιο 22, το εξόνιο 23 και μέρος του ιντρονίου 23 ενισχύθηκε μέσω PCR με παραγωγή ενός τελικού προϊόντος μεγέθους 439bp.

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' – 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
Τμήμα RB1	RBLC	CTGTTCTTCCTCAGACATTCAAAC	439 bp
	RBRC	TCAAATAATCCCCCTCTCA	

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl. Η σύσταση της τελικής αντίδρασης περιελάμβανε 1mM dNTPs, τους εκκινητές RBLC σε τελική συγκέντρωση 25pmol και RBRC 25pmol, 1.5U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (DreamTaq™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA) καθώς και το αντίστοιχο DreamTaq™ Buffer (1X, σε αυτή την συγκέντρωση το ρυθμιστικό παρέχει στην αντίδραση 2mM MgCl₂).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min
40 κύκλοι	Αποδιάταξη	95 °C	30 sec
	Υβριδισμός εκκινητών	48 °C	30sec
	Πολυμερισμός	72 °C	1 min
	Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min

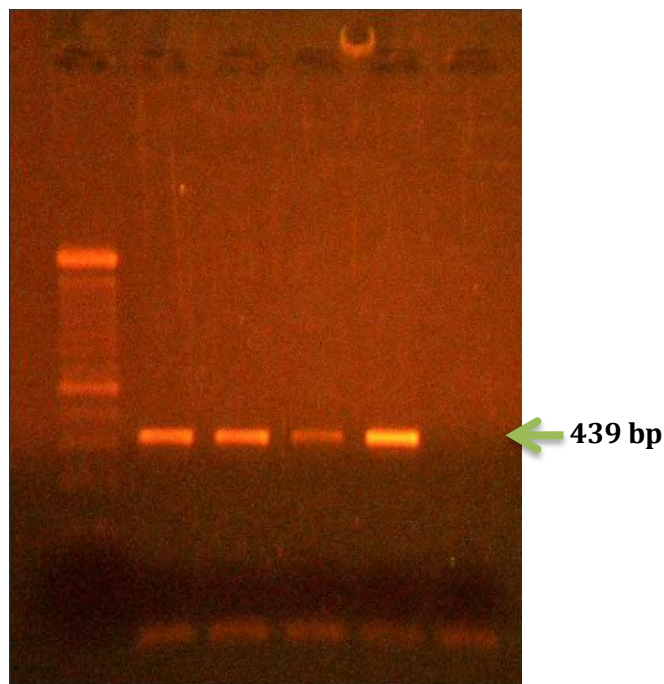
3.4.2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων

Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης PCR τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Για την παραγωγή του πηκτώματος, 1.4gr αγαρόζης διαλύθηκαν σε 70ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) μέσα σε κωνική φιάλη των 250ml. Το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων

για 1 min περίπου προκειμένου να λιώσει η αγαρόζη και να ομογενοποιηθεί. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40 °C, προστέθηκε σε αυτό ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Τέλος, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη (tray) ώστε να πήξει.

Η ιδιότητα του βρωμιούχου αιθιδίου να παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA σε συνδυασμό με τον φθορισμό του σε μήκος κύματος ίσο με 290nm, καθιστά δυνατή την οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR.

Επειδή το προϊόν που θα ηλεκτροφορηθεί θα απομονωθεί στην συνέχεια για να χρησιμοποιηθεί στην μοριακή κλωνοποίηση που περιγράφεται παρακάτω, ηλεκτροφορούνται 40μl από κάθε αντίδραση PCR. Για την ηλεκτροφόρηση, αυτά τα 40 μl αναμειγνύονται με 6 ml χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης (10X Loading Buffer). Το κυανό της βρωμοφαινόλης περιέχει κατά 50% σουκρόζη η οποία δίνει το απαραίτητο βάρος στο DNA ώστε να 'πέσει' στην ειδική θέση της γέλης. Ακολουθεί προσθήκη όλων των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος καθώς και προσθήκη 5μl ενός μάρτυρα μοριακών βαρών. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία αξιοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 Volts, σε ένταση 50mA, για περίπου 30min. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και τέλος φωτογραφήθηκε. Δεξιά, παρατίθεται μία ενδεικτική φωτογραφία του πηκτώματος (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ενδεικτική φωτογραφία του αποτελέσματος της PCR όπου φαίνονται τα ειδικά προϊόντα στις 439 bp.

3.4.3. Απομόνωση των προϊόντων από το πηκτώμα αγαρόζης

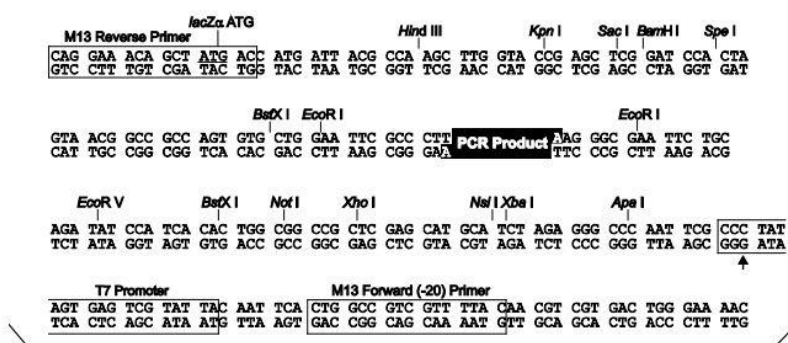
Μετά την έκθεση του πηκτώματος αγαρόζης σε υπεριώδες φως, ακολούθησε η απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων της PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια με πώμα των 2ml. Ο επακόλουθος καθαρισμός των προϊόντων από την γέλη επετεύχθη με την χρήση του NucleoSpin®

Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον έλεγχο της επιτυχούς απομόνωσης της επιθυμητής ζώνης ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 8 μl του καθαρισμένου προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Όλα τα επιτυχώς καθαρισμένα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν στην επακόλουθη μοριακή κλωνοποίηση, η οποία θα αναλυθεί στην συνέχεια.

3.4.4 Μοριακή κλωνοποίηση

Για την αλληλούχηση των επιθυμητών τμημάτων DNA είναι απαραίτητη η εξασφάλιση ότι δεν υπάρχουν μείγματα, καθώς σε αυτή την περίπτωση αλλοιώνεται η ποιότητα του χρωματογραφήματος. Για τον λόγο αυτό, πριν την αλληλούχηση, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR υποβάλλονται σε μοριακή κλωνοποίηση. Η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης αποτελείται από τα εξής στάδια: i. Αντίδραση τοποϊσομεράσης, ii. Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, iii. Colony PCR (προαιρετικό στάδιο), iv. Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών, v. Απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων, vi. Επιβεβαίωση της ύπαρξης του ενθέματος μέσω πέψης με ένζυμο περιορισμού EcoRI.

i. Αντίδραση τοποϊσομεράσης: Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε κατά την PCR (DreamTaq™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA) χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα να προσθέτει νουκλεοτίδια αδενίνης (dA) στα 3' άκρα του νεοσυντιθέμενου προϊόντος, με αποτέλεσμα να προκύπτει προϊόν PCR με μονόκλωνα 3'-dA άκρα.



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) και των θέσεων κοπής του ενζύμου EcoRI.

Με την αντίδραση τοποϊσομεράσης επιτυγχάνεται η σύνδεση του επιθυμητού τμήματος DNA (ένθεμα) σε έναν φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pCR™2.1-TOPO (Εικόνα 3.2) ο οποίος περιέχεται στο kit κλωνοποίησης TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, by Life Technologies, USA). Ο φορέας παρέχεται σε γραμμική μορφή που διαθέτει μονόκλιωνα άκρα θυμίνης (3' -dT). Κατά την αντίδραση τοποϊσομεράσης, τα μονόκλιωνα συμπληρωματικά άκρα του πλασμιδίου και του προϊόντος της PCR συνδέονται και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση του τελευταίου στον φορέα κλωνοποίησης. Το μείγμα της αντίδρασης περιλάμβανε 1μl pCR™2.1-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt Solution), 1μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) και 3μl καθαρισμένου προϊόντος PCR. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15min.

ii. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E. coli JM109, τα οποία είχαν καταστεί δεκτικά έπειτα από χημική κατεργασία. Για την διαδικασία μετασχηματισμού, προστέθηκε σε 200μl δεκτικών κυττάρων (τα οποία περιέχονταν σε πλαστικό σωλήνα των 2ml με πώμα) ολόκληρη η ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης (6μl). Ο σωλήνας ανακινήθηκε ελαφρώς και ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min. Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία του “Heat Shock”, κατά το οποίο οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε προθερμασμένο στους 42 °C υδατόλουτρο, για ακριβώς 90sec και μετά ξανά στον πάγο για 2min. Μετά το “Heat Shock”, προστέθηκαν 800μl LB Broth σε κάθε σωλήνα και αυτοί επώαστηκαν στους 37 °C για 1h, υπό ανάδευση 180 στροφές/min. Μετά το πέρας αυτής της επώασης, επιστρώθηκαν 100μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλία με LB Agar εμπλουτισμένα με 100μg/ml αμπικιλίνη. Επιπλέον, κατά την επιστροφή προστέθηκαν στο τρυβλίο και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA). Τα επιστρωμένα τρυβλία επώαστηκαν ολονύκτια στους 37 °C.

iii. Colony PCR: Όπως προαναφέρθηκε, η πραγματοποίηση της Colony PCR είναι προαιρετικό βήμα. Ήδη η προσθήκη του X-gal αποτελεί ένα πρώτο βήμα ελέγχου της ένθεσης, καθώς οι αποικίες οι οποίες διαθέτουν το επιθυμητό ένθεμα αποκτούν λευκό χρώμα, σε αντίθεση με τις αποικίες χωρίς το ένθεμα οι οποίες γίνονται μπλε. Η Colony PCR αποτελεί ένα επιπλέον βήμα ελέγχου του ανασυνδυασμού. Για την μέθοδο αυτή, επιλέξαμε 2 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και συνεχίσαμε προς σχηματισμό εναιωρήματος σε 15μl δις απεσταγμένου νερού. Τα 3μl από αυτά μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες και θερμάνθηκαν στους 95 °C για 10min, προκειμένου να υποστούν λύση τα βακτηριακά κύτταρα και να απελευθερωθούν τα πλασμίδια. Μετά την δεκάλεπτη θέρμανση ακολούθησε spin down των σωλήνων και τοποθέτηση στον πάγο για μερικά δευτερόλεπτα. Έπειτα προστέθηκε σε κάθε σωλήνα το Mix της Colony PCR και τότε οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στον

θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR. Η αντίδραση της Colony PCR γίνεται σε τελικό όγκο 25μl. Η σύσταση της τελικής αντίδρασης περιελάμβανε 1mM dNTPs, τους εκκινητές RBLC σε τελική συγκέντρωση 25pmol και RBRC 25pmol, 1.25U θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (DreamTaq™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA) καθώς και το αντίστοιχο DreamTaq™ Buffer (1X,σε αυτή την συγκέντρωση το ρυθμιστικό παρέχει στην αντίδραση 2mM MgCl₂).

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min
25 κύκλοι	Αποδιάταξη	95 °C	30 sec
	Υβριδισμός εκκινητών	48 °C	30sec
	Πολυμερισμός	72 °C	1 min
	Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min

Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της Colony PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης με συγκέντρωση 2%. Η επιτυχής ένθεση εξακριβώνεται με την παρουσία μόνο της ειδικής ζώνης στο μέγεθος του ενθέματος (439bp).

iv. Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών: Εννοείται ότι μόνο οι αποικίες στις οποίες επιβεβαιώθηκε η ένθεση προχώρησαν σε υγρή καλλιέργεια. Για την δημιουργία των υγρών καλλιιεργειών, ολόκληρη η ποσότητα του εναιωρήματος που απέμεινε μεταφέρθηκε σε 2ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth, το οποίο περιείχε αμπικιλίνη 1μl/ml. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν ολονύκτια στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 στροφές/min.

v. Απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων: Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων από τις εν λόγω υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με χρήση του EXTRACTME PLASMID DNA KIT (DNA-GDAŃSK, Poland), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

vi. Επιβεβαίωση της ύπαρξης του ενθέματος μέσω πέψης με ένζυμο περιορισμού EcoRI: Για την επιβεβαίωση ότι το ένθεμα έχει εισαχθεί στην θέση πολυσυνδέτη του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Όπως διαπιστώνεται και από την Εικόνα 3.2, οι θέσεις αναγνώρισης του συγκεκριμένου ενζύμου εντοπίζονται μόνο εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης στον πολυσυνδέτη. Το

μείγμα της αντίδρασης πέψης περιλάμβανε 0.8μl ενζύμου περιορισμού EcoRI (MINOTECH Biotechnology, Greece), 2μl 10X H Buffer (του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου) και 2μl πλασμιδιακού DNA. Η επακόλουθη επώαση πραγματοποιήθηκε για 1h, στους 37 °C. Για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 4μl 10X Loading Buffer και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Αναφορικά με την εικόνα του πηκτώματος, η ύπαρξη του ενθέματος στο πλασμίδιο επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη της ειδικής ζώνης μεγέθους περίπου 439bp.

3.4.5. Αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρεία Macrogen (Amsterdam, The Netherlands). Για την διαδικασία της αλληλούχησης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι προαγωγείς T7 του πλασμιδιακού φορέα, οι οποίοι εντοπίζονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του ενθέματος.

3.4.6. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Σε πρώτη φάση, μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από την Macrogen, εκτιμήθηκε η ποιότητα του κάθε χρωματογραφήματος. Στην συνέχεια ακολούθησε η διερεύνηση της ειδικότητας των αλληλουχιών αρχικά μέσω επεξεργασίας τους με το πρόγραμμα Gene Runner κι έπειτα μέσω πολλαπλής ομοπαράθεσης με το πρόγραμμα MEGA-X με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδιώματος του RB1, η οποία βρίσκεται διαθέσιμη στην νουκλεοτιδική βάση δεδομένων NCBI. Επιπλέον, με το πρόγραμμα MEGA-X μελετήθηκε η παρουσία μεταλλάξεων τόσο στα εξόνια 22 και 23 όσο και στα ιντρόνια 22 και 23 (μέρος του ιντρονίου). Επιπρόσθετα, ελέγχθηκαν και οι μεταλλάξεις στην πρωτεϊνική αλληλουχία των εξονίων 22 και 23. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εξελικτική ανάλυση του κάθε εξονίου (22 και 23) ξεχωριστά για την ανίχνευση πιθανών νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών μεταλλαγών οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

3.4.7 Ανάλυση επιλεκτικής πίεσης

Για τον προσδιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εξονίων 22 και 23 αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση της αλληλουχίας του κάθε εξονίου ξεχωριστά και πολλαπλή ομοπαράθεση των απομονωμένων αλληλουχιών των δειγμάτων με τις πρότυπες αλληλουχίες των αντίστοιχων εξονίων του γονιδίου RB1. Για τον προσδιορισμό της επιλεκτικής πίεσης στα εξόνια πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του ρυθμού dN/dS με την μέθοδο Fixed Effects Likelihood (FEL). Η FEL χρησιμοποιεί την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood- ML) για να υπολογίσει τα ποσοστά μη-συνώνυμων (dN) και συνώνυμων (dS) υποκαταστάσεων για κάθε θέση της δοθείσας ομοπαράθεσης. Η μέθοδος αυτή λαμβάνει ως δεδομένο ότι η επιλεκτική πίεση για την κάθε θέση ξεχωριστά είναι σταθερή (66).

Ο υπολογισμός του ρυθμού dN/dS αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη, απλή και αξιόπιστη στατιστική μέθοδο. Συγκεκριμένα, αποτελεί τον λόγο του αριθμού των μη συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά μη συνώνυμη θέση (dN) προς τον αριθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων ανά συνώνυμη θέση (dS). Ο λόγος αυτός είναι ενδεικτικός της επιλεκτικής πίεσης που δρα επάνω σε ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη. Αν η τιμή του λόγου είναι μεγαλύτερη από το 1, τότε αυτό ερμηνεύεται ως άσκηση θετικής ή δαρβινιακής επιλογής στην συγκεκριμένη θέση. Αντιθέτως, αν η τιμή του λόγου είναι μικρότερη από το 1 υποδεικνύει άσκηση αρνητικής επιλογής στην συγκεκριμένη θέση. Τιμή του λόγου ίση με το 1 είναι ενδεικτική της ουδέτερης επιλογής (54).

Μία συνώνυμη υποκατάσταση είναι η νουκλεοτιδική μετάλλαξη η οποία δεν αλλάζει την αμινοξική αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης και συχνά αποκαλείται και ως σιωπηλή μετάλλαξη. Παρ' όλα αυτά, οι συνώνυμες υποκαταστάσεις μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν κάποιες διαδικασίες όσον αφορά για παράδειγμα την μεταγραφή, το μάτισμα και την μετάφραση.

Μία μη συνώνυμη υποκατάσταση είναι η νουκλεοτιδική μετάλλαξη που μεταποιεί την φυσιολογική αμινοξική αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης και είναι γνωστή και ως παρανοηματική μετάλλαξη. Στην περίπτωση που μία μετάλλαξη δημιουργεί πρόωρο κωδικόνιο λήξης, τότε πρόκειται για μη νοηματική μετάλλαξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ενισχύθηκε μέσω PCR το τμήμα του γονιδίου RB1 το οποίο περιέχει ολόκληρο το εξόνιο 22, το ιντρόνιο 22, το εξόνιο 23 και μέρος του ιντρονίου 23 (με παραγωγή ενός τελικού προϊόντος μεγέθους 439bp) σε 43 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Από αυτά, τα 34 είναι θετικά για τον ιό HPV-16, ενώ τα υπόλοιπα 9 αρνητικά για τον ιό. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η εξής ομαδοποίηση:

- 1 καρκινικό δείγμα θετικό για HPV-16
- 21 δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16
- 12 δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, θετικά για HPV-16
- 9 δείγματα, αρνητικά για HPV-16

Ακολούθησε αλληλούχηση των ενισχυμένων προϊόντων κι έπειτα μέσω πολλαπλής ομοπαράθεσης με την βοήθεια του προγράμματος MEGA-X με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου RB1 μελετήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στην νουκλεοτιδική αλληλουχία τόσο των εξονίων 22 και 23 όσο και των ιντρονίων 22 και 23 (τμήμα αυτού).

Από την πολλαπλή ομοπαράθεση δεν ανιχνεύθηκε κάποιος συγκεκριμένος πολυμορφισμός που να συνδέεται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός τυχαίων διάσπαρτων μεταλλάξεων σε όλο το μήκος της ενισχυμένης περιοχής στα κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας συγκριτικά με τα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και τα δείγματα που ταυτοποιήθηκαν ως αρνητικά για τον ιό HPV-16.

Αρχικά, παρατηρήθηκε ο αριθμός των μεταλλάξεων στο συνολικό τμήμα μεγέθους 439bp και στη συνέχεια ξεχωριστά για την περιοχή του εξονίου 22 (15bp – 128bp του προϊόντος της PCR), για την περιοχή του ιντρονίου 22 (129bp – 221bp του προϊόντος της PCR), για την περιοχή του εξονίου 23 (222bp – 385 bp του προϊόντος της PCR) και τέλος για το τμήμα του ιντρονίου 23 (386bp – 439 bp του προϊόντος της PCR).

Κλινική εικόνα	Πλήθος μεταλλάξεων	Πλήθος δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις	Ποσοστό δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Καρκίνος	2	1/1	-
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	21	12/21	57,1 %
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	3	3/12	25 %
Αρνητικά για τον ιό HPV-16	5	3/9	33,3 %

Πίνακας 4.1 : Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται για την κάθε κατηγορία δειγμάτων ξεχωριστά, το πλήθος των μεταλλάξεων που βρέθηκαν και το πλήθος των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις σε **ολόκληρο το μήκος του ενισχυμένου τμήματος (439 bp)**. Όπως είναι φανερό και από τα δεδομένα του πίνακα, η συχνότητα των μεταλλάξεων καθώς και το ποσοστό των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις είναι σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα των δειγμάτων με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας και των αρνητικών για HPV-16.

Κλινική εικόνα	Πλήθος μεταλλάξεων	Πλήθος δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις	Ποσοστό δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Καρκίνος	1	1/1	-
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	6	4/21	19,05 %
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	1	1/12	8,33 %
Αρνητικά για τον ιό HPV-16	0	0/9	-

Πίνακας 4.2 : Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται για την κάθε κατηγορία δειγμάτων το πλήθος μεταλλάξεων που βρέθηκαν, καθώς και το πλήθος των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις **στην περιοχή του εξονίου 22 (15bp – 128bp του προϊόντος της PCR)**. Όπως φαίνεται και στον πίνακα το ποσοστό των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες.

Κλινική εικόνα	Πλήθος μεταλλάξεων	Πλήθος δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις	Ποσοστό δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Καρκίνος	0	0/1	-
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	6	5/21	23,81 %
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	1	1/12	8,33 %
Αρνητικά για τον ιό HPV-16	0	0/9	-

Πίνακας 4.3 : Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται για την κάθε κατηγορία δειγμάτων το πλήθος μεταλλάξεων που βρέθηκαν, καθώς και το πλήθος των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις για την περιοχή του ιντρονίου 22 (129bp – 221bp του προϊόντος της PCR). Τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας κατέχουν και πάλι το υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων, καθώς βρέθηκε μόνο μία μετάλλαξη στο ιντρόνιο 18 των χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δειγμάτων και καμία στα αρνητικά για τον ιό κλινικά δείγματα.

Κλινική εικόνα	Πλήθος μεταλλάξεων	Πλήθος δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις	Ποσοστό δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Καρκίνος	0	0/1	-
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	5	4/21	19,05 %
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	0	0/12	-
Αρνητικά για τον ιό HPV-16	2	2/9	22,2 %

Πίνακας 4.4 : Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται για την κάθε κατηγορία δειγμάτων το πλήθος μεταλλάξεων που βρέθηκαν, καθώς και το πλήθος των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις για την περιοχή του εξονίου 23 (222bp – 385 bp του προϊόντος της PCR). Παρομοίως, τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας κατέχουν και πάλι το υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων, καθώς βρέθηκαν μόνο 2 επιπλέον μεταλλάξεις σε 2 δείγματα αρνητικά για τον ιό και καμία στις υπόλοιπες κατηγορίες κλινικών δειγμάτων.

Κλινική εικόνα	Πλήθος μεταλλάξεων	Πλήθος δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις	Ποσοστό δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις
Καρκίνος	1	1/1	-
Υψηλού βαθμού δυσπλασία	3	3/21	14.29 %
Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	0	0/12	-
Αρνητικά για τον ιό HPV-16	3	2/9	22,2 %

Πίνακας 4.5 : Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται για την κάθε κατηγορία δειγμάτων το πλήθος μεταλλάξεων που βρέθηκαν, καθώς και το πλήθος των δειγμάτων που φέρουν μεταλλάξεις για το τμήμα του ιντρονίου 23 (386bp – 439 bp του προϊόντος της PCR).

4.2 Έλεγχος αμινοξικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 22 του RB1

Με την βοήθεια του προγράμματος MEGA-X και την πρότυπη αλληλουχία του εξονίου 22 ελέγχθηκαν τυχόν αμινοξικές μεταλλάξεις στην περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο 22, σε όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκεντρώνονται στις παρακάτω εικόνες των πολλαπλών ομοπαραθέσεων για τα δείγματα της κάθε κλινικής εικόνας, ξεχωριστά.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΧΑΜΗΛΟ ΒΑΘΜΟ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑΣ

Species/Abbrv	* *
1. EXON_22	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
2. BBV17_(LG_900-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
3. BBV18_(LG_1089-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
4. BBV19_(LG_2192-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
5. BBV20_(LG_159-15)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
6. BBV21_(LG_212-15)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
7. BBV22_(LG_2085-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
8. BBV23_(LG_912-15)	T F K R V L I K E E E Y N S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
9. BBV24_(ATT_2)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
10. BBV31_(ATT45)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
11. BBV32_(ATT51)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
12. BBV41_(LG_1759-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
13. BBV42_(AG_3670)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R

Εικόνα 4.2 : Στην εικόνα παρουσιάζεται η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από το **εξόνιο 22**, των **δειγμάτων χαμηλού βαθμού δυσπλασίας**. Στην θέση 1 εντοπίζεται η πρότυπη αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 22, ενώ στις θέσεις 2-13 τα κλινικά δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας. Επισημαίνονται με χρώμα οι θέσεις των αμινοξικών υποκαταστάσεων. Στα δείγματα με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας, στο εξόνιο 22 εντοπίστηκε μόνο μία αμινοξική μετάλλαξη: **D750N**.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ HPV-16

Species/Abbrv	* *
1. EXON 22	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
2. BBV25 (WNL 1941-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
3. BBV26 (WNL 555-15)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
4. BBV27 (WNL 1100-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
5. BBV28 (WNL 1229-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
6. BBV29 (WNL 2418-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
7. BBV37 (WNL 209/16)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
8. BBV38 (WNL 212/16)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
9. BBV39 (WNL 215/16)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R
10. BBV40 (WNL 2087-14)	T F K R V L I K E E E Y D S I I V F Y N S V F M Q R L K T N I L Q Y A S T R

Εικόνα 4.3 : Στην εικόνα παρουσιάζεται η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από το **εξόνιο 22**, των **αρνητικών για τον ιό HPV-16 δειγμάτων**. Στην θέση 1 εντοπίζεται η πρότυπη αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 22, ενώ στις θέσεις 2-10 τα κλινικά δείγματα αρνητικά για τον ιό. Επισημαίνονται με χρώμα οι θέσεις των αμινοξικών υποκαταστάσεων. Στα αρνητικά για τον ιό δείγματα δεν εντοπίστηκε **καμία νουκλεοτιδική μετάλλαξη**, και κατ' επέκταση **καμία αμινοξική υποκατάσταση**.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω:

Αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στην σύνδεση του μοτίβου LXCXE	Δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις
F739	Κανένα
I752	Κανένα
I753	Κανένα
Y756	Κανένα
N757	Κανένα
M761	Κανένα
K765	10645-14
I768	Κανένα
L769	HG 889-14

Πίνακας 4.6 : Στον πίνακα αναγράφονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης Rb που εντοπίζονται στο τμήμα που μελετάται στην παρούσα εργασία και εμπλέκονται στην πρόσδεση του μοτίβου LXCXE. Και τα δύο δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα αποτελούν κλινικά δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας.

Πίνακας 4.7 : Στον πίνακα αναγράφονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης Rb που εντοπίζονται στο τμήμα που μελετάται στην παρούσα εργασία και αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης. Σε κανένα δείγμα δεν εντοπίστηκε αμινοξική υποκατάσταση σε αμινοξέα που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb.

Αμινοξικά κατάλοιπα που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης	Δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις
S780	Κανένα
S788	Κανένα
S795	Κανένα
S807	Κανένα
S811	Κανένα
T821	Κανένα
T826	Κανένα

4.3 Εξελικτική ανάλυση των εξονίων 22 και 23 του γονιδίου RB1

4.3.1 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 22 του γονιδίου RB1

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 22 πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του ρυθμού dN/dS με την μέθοδο Fixed Effects Likelihood (FEL). Η FEL χρησιμοποιεί την μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood- ML)

για να υπολογίσει τα ποσοστά μη-συνώνυμων (dN) και συνώνυμων (dS) υποκαταστάσεων για κάθε θέση της δοθείσας ομοπαράθεσης (66).

Για τον έλεγχο της επιλεκτικής πίεσης στο εξόνιο 22 ελέγχθηκαν από το FEL αρχικά όλα τα δείγματα (και τα 43) και στη συνέχεια ξεχωριστά τα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας. Να σημειωθεί ότι στα δείγματα αρνητικά για τον ιό HPV-16 δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστεί ο ρυθμός dN/dS δεδομένου ότι δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη.

Παρά την ύπαρξη μεταλλάξεων υπεύθυνων για μη συνώνυμες αμινοξικές υποκαταστάσεις, με βάση τις τιμές του λόγου dN/dS που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα FEL, με p-value 0.1, **δεν βρέθηκε ένδειξη θετικής ή αρνητικής επιλεκτικής πίεσης**, σε κανένα από τα 38 κωδικόνια της ομοπαράθεσης του **εξονίου 22** του γονιδίου RB1, στο σύνολο των 43 δειγμάτων, καθώς πρόκειται για τυχαία και διάσπαρτα γεγονότα μεταλλάξεων.

4.3.2 Εξελικτική ανάλυση στο εξόνιο 23 του γονιδίου RB1

Ο προσδιορισμός της επιλεκτικής πίεσης του εξονίου 23 πραγματοποιήθηκε με αντίστοιχο τρόπο όπως και στην περίπτωση του εξονίου 22.

Για τον έλεγχο της επιλεκτικής πίεσης στο εξόνιο 23 ελέγχθηκαν από το FEL αρχικά όλα τα δείγματα (και τα 43) και στη συνέχεια ξεχωριστά για τα δείγματα της ομάδας υψηλού βαθμού δυσπλασίας και για τα δείγματα αρνητικά για τον ιό. Να σημειωθεί ότι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστεί ο ρυθμός dN/dS δεδομένου ότι δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη.

Παρόμοια με το εξόνιο 22, παρά την ύπαρξη μεταλλάξεων υπεύθυνων για μη συνώνυμες αμινοξικές υποκαταστάσεις, με βάση τις τιμές του λόγου dN/dS που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα FEL, με p-value 0.1, **δεν βρέθηκε ένδειξη θετικής ή αρνητικής επιλεκτικής πίεσης**, σε κανένα από τα 55 κωδικόνια της ομοπαράθεσης του **εξονίου 23** του γονιδίου RB1, στο σύνολο των 43 δειγμάτων, καθώς πρόκειται για τυχαία και διάσπαρτα γεγονότα μεταλλάξεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPVs) χαρακτηρίζονται από έναν εξαιρετικά ποικιλόμορφο τροπισμό, καθώς η μόλυνση από αυτούς μπορεί να είναι πλήρως ασυπτωματική, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση κονδυλωμάτων ή ακόμη και σε επιθετικό καρκίνο. Η εμμένουσα μόλυνση από ιούς HPV με ογκογόνο δυναμικό είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη ποικίλου βαθμού επιθηλιακής δυσπλασίας και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Πέρα από την ίδια την μόλυνση από HPV, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου διαδραματίζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (67).

Στα φυσιολογικά κύτταρα, το γονιδίωμα των HPVs αντιγράφεται σε επισωματική μορφή. Εν αντιθέσει, στον καρκίνο το ιικό γονιδίωμα ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο ενσωματωμένο σε κάποιο κυτταρικό χρωμόσωμα του ξενιστή αποτρέποντας έτσι την επίτευξη παραγωγικής λοίμωξης από τον ιό. Σε αυτήν την περίπτωση, σημειώνεται αυξημένη και ανεξέλεγκτη έκφραση των ιικών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες αλληλεπιδρούν και καταστέλλουν τις πρωτεΐνες p53 και pRb, αντίστοιχα, κατευθύνοντας σε απώλεια της επιδιόρθωσης του DNA που μεσολαβείται από την p53 και συνεχή είσοδο του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S. Συγκεκριμένα, η ογκοπρωτεΐνη E7 δεσμεύεται στην πρωτεΐνη pRb κυρίως μέσω της περιοχής LXCXE, η οποία προσδέεται σε αμινοξέα της περιοχής B της pRb. Η ισχυρή σύνδεση του αμινοξικού μοτίβου LXCXE στην περιοχή B της pRb, επιτρέπει την αλληλεπίδραση της CR3 περιοχής της E7 με την C-τελική περιοχή της pRb καθώς και με την C-τελική περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Η τριπλή αυτή αλληλεπίδραση της E7 με τις κυτταρικές πρωτεΐνες απαιτείται ώστε να αποσταθεροποιηθεί το σύμπλοκο E2F-pRb, απομακρύνοντας τον E2F από την pRb (56, 57).

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η νουκλεοτιδική και αμινοξική ανάλυση των εξονίων 22 και 23 της πρωτεΐνης pRb, καθώς αυτά διαθέτουν πολλά αμινοξέα που μετέχουν στην πρόσδεση της LXCXE περιοχής της ιικής ογκοπρωτεΐνης E7, σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας ελλήνων γυναικών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχουν μεταλλάξεις που συνδέονται με τον βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

Κατά την νουκλεοτιδική ανάλυση ελέγχθηκαν μεταλλάξεις στην νουκλεοτιδική αλληλουχία των εξονίων 22 και 23, καθώς και των ιντρονίων 22 και 23 που

εντοπίζονται εκατέρωθεν των εξονίων. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι η εμφάνιση μεταλλάξεων στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας ήταν συχνότερη (57,1% των δειγμάτων) απ' ό,τι στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και στα αρνητικά για τον ιό HPV-16 δείγματα (25% και 33,3% , αντίστοιχα).

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 31 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 8 στο εξόνιο 22 και οι 7 στο εξόνιο 23. Στην περιοχή πρόσδεσης του μοτίβου LXCXE της ιικής ογκοπρωτεΐνης E7 στην pRb, που αποτελείται από αμινοξικές θέσεις που κωδικοποιούνται από κωδικόνια του εξονίου 22, ανιχνεύτηκαν αμινοξικές υποκαταστάσεις σε δύο δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας (δείγμα 10645-14: K765R και δείγμα HG 889-14: L769S). Από την άλλη, αρκετά κωδικόνια του εξονίου 23 κωδικοποιούν αμινοξέα που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης της pRb (Ser 780, Ser 788, Ser 795, Ser 807, Ser 811, T 821, T 826). Από την νουκλεοτιδική μελέτη του εξονίου 23 δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη σε αντίστοιχη θέση.

Από την μελέτη της εξελικτικής πίεσης ξεχωριστά για τα εξόνια 22 και 23, στα δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας μόνα τους καθώς και στο σύνολο των δειγμάτων, δεν παρατηρήθηκε άσκηση θετικής ή αρνητικής επιλεκτικής πίεσης σε κανένα από τα δύο εξόνια του γονιδίου RB1 και σε κανένα συγκεκριμένο κωδικόνιο των εξονίων, καθώς πρόκειται για τυχαία και διάσπαρτα γεγονότα μεταλλάξεων.

Συμπερασματικά, στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία δεν ανιχνεύθηκε ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός που να σχετίζεται με τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Παρ' όλα αυτά ανιχνεύθηκαν πολλές διάσπαρτες παρανοηματικές μεταλλάξεις σε τυχαίες θέσεις των εξονίων 22 και 23, .

Από έρευνες που έχουν γίνει στο παρελθόν προέκυψε ότι το εύρος και το είδος των μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί για το γονίδιο RB1 ποικίλει εξαιρετικά. Εκτός των παρανοηματικών μεταλλάξεων, έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις που σχηματίζουν πρόωρο κωδικόνιο λήξης, μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μάτισμα του μεταγράφου, μεταλλάξεις στον υποκινητή που επιδρούν στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, αλλά ακόμη και απαλοιφές ολόκληρων περιοχών του γονιδίου. Επιπλέον, από αντίστοιχες έρευνες που έχουν γίνει για την μελέτη πολυμορφισμών στο γονίδιο RB1, σε διάφορους τύπους καρκίνου, προέκυψε ότι μεταξύ άλλων (εξόνια 14, 17, 20) το εξόνιο 23 αποτελεί "hotspot" σημειακών μεταλλάξεων, ενώ το εξόνιο 22 φαίνεται να είναι πιο συντηρημένο καθώς εμφανίζει μεταλλάξεις σε μικρότερη συχνότητα. Συγκεκριμένα, στο εξόνιο 23, έχουν καταγραφεί κατά κύριο λόγο παρανοηματικές μεταλλάξεις, ακολουθούν οι μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου και σε μικρότερο βαθμό μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μάτισμα (50). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο τύπος και το εύρος των μεταλλάξεων του γονιδίου RB1 διαφέρει μεταξύ των διάφορων τύπου καρκίνου αλλά και μεταξύ των διάφορων εθνικών πληθυσμών (50, 58, 59).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε η ύπαρξη αυξημένης συχνότητας διάσπαρτων μεταλλάξεων στα εξόνια 22 και 23 του γονιδίου RB1 στα δείγματα με υψηλό βαθμό δυσπλασίας. Δυνητικά, οι μεταλλάξεις αυτές θα μπορούσαν να επηρεάζουν την σύνδεση της ικκής ογκοπρωτεΐνης E7 στην πρωτεΐνη pRb, είτε λόγω δομικής αλλαγής της pRb, είτε λόγω του ιοντικού περιβάλλοντος που δημιουργείται γύρω από την περιοχή πρόσδεσης του μοτίβου LXCXE, καθιστώντας τα άτομα που τις φέρουν πιο επιρρεπείς σε ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Για την αύξηση της ισχύος των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν αυτά τα πειράματα σε μεγαλύτερο πλήθος δειγμάτων. Δεδομένου ότι στο εργαστήριο που εκπονήθηκε η παρούσα πτυχιακή εργασία έχουν ήδη γίνει μελέτες στην περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F, θα μπορούσε να ελεγχθεί μελλοντικά η ικκή ογκοπρωτεΐνη E7 και συγκεκριμένα η περιοχή LXCXE ή ακόμη και η CR3 περιοχή που αλληλεπιδρά με τα C-τελικά άκρα των pRb και E2F και οδηγεί τελικώς σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου pRb-E2F.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* Oct;445 (1-2):11-20
2. Bzhalava, D., Eklund, C., & Dillner, J. (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341-344.
3. Belnap, D. M., Olson, N. H., Cladel, N. M., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Kreider, J. W., Baker, T. S. (1996). Conserved Features in Papillomavirus and Polyomavirus Capsids. *Journal of Molecular Biology*, 259(2), 249–263.
4. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* Jun 20;324(1):17-27
5. Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E.-M. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*, 401(1), 70–79.
6. Graham, S. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5(10), 1493–1506.
7. Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*, 110(5):525–41.
8. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25(Suppl Suppl 1), 2–23.
9. Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17.
10. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*, 445(1–2):224–31.
11. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. (2011) Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*, 6(5).
12. Pinidis, P., Tsikouras, P., Iatrakis, G., Zervoudis, S., Koukouli, Z., Bothou, A., Vladareanu, S. (2016). Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Mædica*, 11(1), 48–54.
13. Zheng ZM, Baker CC. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. Sep 1;11:2286-302

14. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.
15. Wilson, V.G., West, M., Woytek, K. et al. *Virus Genes* (2002) 24: 275.
16. Hughes, F. J., & Romanos, M. A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research*, 21(25), 5817–5823.
17. 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
18. 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
19. 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
20. Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* Oct;445(1-2):80-98
21. 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*
22. DiMaio D, Petti LM. (2013) The E5 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):99-114
23. Maufort, J. P., Shai, A., Pitot, H., & Lambert, P. F. (2010). A Role for HPV 16 E5 in Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res*. 70(7), 2924–2931.
24. Hausen, H.Z. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92 (9), 690-8.
25. DiMaio D, Mattoon D.(2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* Nov 26;20(54):7866-73
26. Vande Pol SB, Klingelutz AJ.(2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. Oct;445(1-2):115-37
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. Roman A, Munger K.(2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* Oct;445(1-2):138-68

29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C., & Brown, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60(6), 1445–1456.
34. Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* Oct;445(1-2):169-74
35. Morgan, I. M., DiNardo, L. J., & Windle, B. (2017). Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift? *Viruses*, 9(8), 208
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. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863–3890
41. McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* ;72:155-205

42. 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
43. C Giacinti and A Giordano. RB and cell cycle progression. *Oncogene* (2006) 25, 5220–5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
44. Dyson, N., Guida, P., Münger, K., & Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of Virology*, 66(12), 6893–6902
45. Dick, F. A., & Dyson, N. J. (2002). Three Regions of the pRB Pocket Domain Affect Its Inactivation by Human Papillomavirus E7 Proteins. *Journal of Virology*, 76(12), 6224–6234
46. Pardee, AB. (1989). G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science* (New York, N.Y.). 246. 603-8
47. 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
48. Dick, Frederick & M Rubin, Seth. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews. Molecular cell biology*.
49. Valverde, J. R., Alonso, J., Palacios, I., & Pestaña, Á. (2005). RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet*. 6:1-9
50. Elizabeth A Price et al. Spectrum of RB1 mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *Cancer genetics* 2014
51. Knudsen, E. S., & Wang, J. Y. (1997). Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 5771–5783.
52. Zarkowska, T., & Mittnacht, S. (1997). Differential Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein by G1/S Cyclin-dependent Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12738-12746
53. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*. 1998;391(6670):859–65.
54. Kryazhimskiy, S., & Plotkin, J. B. (2008). The Population Genetics of dN/dS. *PLoS Genetics*, 4(12)
55. Liu, Xin & Clements, Adrienne & Zhao, Kehao & Marmorstein, Ronen. (2006). Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. *The Journal of biological chemistry*. 281. 578-86

56. Dahiya, A., Gavin, M. R., Luo, R. X., & Dean, D. C. (2000). Role of the LXCXE Binding Site in Rb Function. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6799-6805
57. Richter, S., Vandezande, K., Chen, N., Zhang, K., Sutherland, J., Anderson, J., Gallie, B. (2003). Sensitive and Efficient Detection of RB1 Gene Mutations Enhances Care for Families with Retinoblastoma. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), 253-269
58. Tomar, S., Sethi, R., Sundar, G., Quah, T. C., Quah, B. L., & Lai, P. S. (2017). Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *Plos One*, 12(6):1-23
59. Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., Ali-Khan, N., Mitnacht, S., Broceno, C., .Gamblin, S. J. (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2363-2368
60. Yugawa, T. and Kiyono, T. (2009), Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev. Med. Virol.*, 19: 97-113
61. Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(0), 175-186
62. 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*
63. Mikhail V. Blagosklonny and Arthur B. Pardee. The Restriction Point of the Cell Cycle. *Madame Curie Bioscience Database*
64. Rubin, S. M. (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(1), 12-19
65. 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*
66. Pond, S. L., & Frost, S. D. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208-1222
67. Bravo IG, Sanchez MF.(2015) Papillomaviruses Viral Evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health Jan: 32-51*