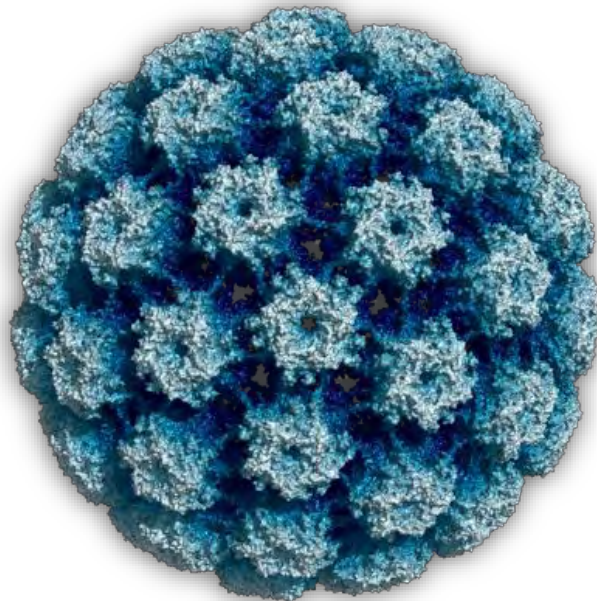


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ p16 ΚΑΙ p53 ΣΕ ΥΨΗΛΟΥ ΚΑΙ
ΧΑΜΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΤΡΑΧΗΛΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ HPV16**



ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΚΟΠΕΛΙΤΗ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2020

ΛΑΡΙΣΑ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ p16 ΚΑΙ p53 ΣΕ ΥΨΗΛΟΥ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΟΥ
ΒΑΘΜΟΥ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΤΡΑΧΗΛΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ HPV16

p16 AND p53 GENE POLYMORPHISMS OF HIGH- AND LOW-GRADE DYSPLASIA
HPV16 POSITIVE CERVICAL SAMPLES

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.) Μοριακή Μικροβιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2019 – Ιούνιος 2020 στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας - Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα της Μοριακής Ιολογίας, αλλά και για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτρη και τον Ε.Δι.Π. κ. Δημητρίου Τηλέμαχο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Δημητρίου Τηλέμαχο και Δάσκου Μαρία για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου έδωσαν, ώστε να μπορέσω να φέρω εις πέρας την εργασία μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Τσακογιάννη Δημήτρη για τη βοήθειά του κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι HPVs ταξινομούνται στην οικογένεια Papillomaviridae και είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί, που δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο. Η μόλυνση με HPV μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων επιθηλιακού καρκίνου, με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας να εμφανίζεται πιο συχνά μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως. Διαφορετικοί υπότυποι HPV προκαλούν διαφορετικού βαθμού αλλοιώσεις στο επιθήλιο. Οι HPVs μπορούν να βρίσκονται είτε σε επισωματική μορφή στο κύτταρο είτε ενσωματωμένοι στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η ενσωμάτωσή τους έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των γονιδίων E6 και E7, η οποία ευθύνεται για την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου.

Εκτός από την υψηλή έκφραση των γονιδίων αυτών, στην ανάπτυξη του καρκίνου σημαντικό ρόλο παίζει το γενετικό υπόβαθρο των ατόμων. Έχουν βρεθεί τρεις πολυμορφισμοί που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, έπειτα από μόλυνση με HPV. Ο πρώτος εντοπίζεται στο γονίδιο της p53 και σχετίζεται με τη μετατροπή του αμινοξέος αργινίνη(Arg) σε προλίνη(Pro), ενώ οι άλλοι δύο εντοπίζονται στο γονίδιο της p16 και συγκεκριμένα στις θέσεις 540 και 580 του εξωνίου 3, όπου η κυτοσίνη(C) μετατρέπεται σε γουανίνη(G) και η κυτοσίνη(C) μετατρέπεται σε θυμίνη(T) αντίστοιχα (C540G και C580T).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των παραπάνω πολυμορφισμών σε δείγματα Ελληνίδων γυναικών θετικά για τον ιό HPV16. Εξετάστηκαν τρεις κατηγορίες δειγμάτων, δείγματα που έφεραν υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες στο επιθήλιο του τραχήλου καθώς και δείγματα που δεν έφεραν αλλοιώσεις στο επιθήλιο αλλά ήταν θετικά για HPV16. Κατά την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των περιοχών των πολυμορφισμών και πέψη των προϊόντων ενίσχυσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Μετά την εργαστηριακή ανάλυση ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης, προκειμένου να υπολογιστεί εάν συσχετίζονται οι πολυμορφισμοί με την ανάπτυξη υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και εάν η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση των πολυμορφισμών Arg72Pro και C540G με την εμφάνιση υψηλού (HSIL) και χαμηλού (LSIL) βαθμού δυσπλασιών στο επιθήλιο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τον πολυμορφισμό C580T, για τον οποίο φάνηκε ότι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο C/C έχουν 4,87 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LSIL).

ABSTRACT

Human Papillomaviruses (HPVs) are classified into the Papillomaviridae family and are nonenveloped DNA viruses. Their genome consists of double-stranded circular DNA. HPV infection can lead to the development of various types of epithelial cancer, with cervical cancer occurring more frequently among women worldwide. Different HPV subtypes cause epithelial lesions of varying degrees. HPV16 genome can be found either episomal or integrated form in the host's genome. Their integration results in increased expression of the E6 and E7 genes, which are responsible for the loss of control of the cell cycle and leads to the development of cancer.

In addition to the high expression of these genes, the genetic background of individuals plays a significant role in the development of cancer. Three polymorphisms have been found to increase the risk of cancer development after HPV16 infection. The former is found in the p53 gene and is involved in the conversion of the amino acid arginine (Arg) to proline (Pro), while the other two are found in the p16 gene and specifically at positions 540 and 580 of exon 3, where cytosine (C) is converted to guanine (G) and cytosine (C) is converted to thymine (T) respectively (C540G and C580T).

The aim of this project was to study the above polymorphisms in HPV16 positive samples of Greek women. Three groups of samples were examined: samples with high- and low-grade lesions in the cervical epithelium as well as samples with no epithelial lesions but positive for HPV16. During the laboratory analysis of the samples, the polymorphic regions were amplified, and the amplification products were digested with appropriate restriction enzymes. The laboratory analysis was followed by a statistical analysis of the results of digestion, in order to estimate the correlation of polymorphisms with the development of high- and low-grade lesions and whether the correlation was statistically significant.

Statistical analysis of digestion results showed that there was no statistically significant association between Arg72Pro and C540G polymorphisms with the appearance of high (HSIL) and low (LSIL) degree of epithelial malformations, in contrast to the results obtained for C580T polymorphism, for which it was shown that women with the C / C phenotype had a 4.87-fold higher risk of developing low-grade dysplasia (LSIL).

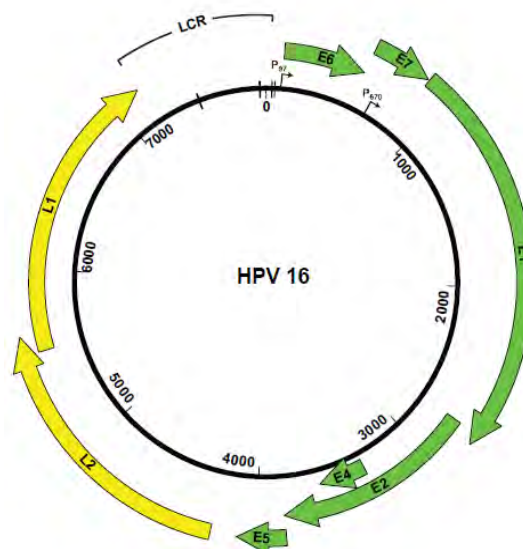
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1	Γενικά για τους HPV.....	7
1.2	Ταξινόμηση.....	8
1.3	Λειτουργίες των ιικών γονιδίων.....	9
1.4	Κύκλος ζωής.....	12
1.4.1	Είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή.....	12
1.4.2	Έκφραση των γονιδίων του ιού.....	14
1.4.3	Συγκρότηση των νέων ιικών σωματίων και απελευθέρωση του ιού.....	15
1.5	Μορφές του ιικού γονιδιώματος.....	15
1.6	HPV και καρκίνος.....	16
1.6.1	Γενετικό υπόβαθρο των ανθρώπων.....	17
2.	ΣΚΟΠΟΣ.....	19
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1	Κλινικά δείγματα.....	20
3.2	Εκχύλιση DNA.....	20
3.2.1	Εκχύλιση DNA από δείγμα τραχηλικού επιχρίσματος.....	20
3.2.2	Εκχύλιση DNA από δείγμα ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη.....	22
3.2.3	Εκχύλιση DNA από δείγμα ThinPrep.....	22
3.3	Έλεγχος της εκχύλισης.....	22
3.4	Ανίχνευση HPV16 στα δείγματα.....	23
3.5	Ανίχνευση του πολυμορφισμών του γονιδίων p53.....	24
3.5.1	Ενίσχυση τμήματος 309bp στο εξόνιο 4 του γονιδίου p53.....	24
3.5.2	Πέψη των ενισχυμένων τμημάτων.....	25
3.6	Ανίχνευση των πολυμορφισμών του γονιδίου p16.....	26
3.6.1	Ενίσχυση τμήματος 181bp στο εξόνιο 3 του γονιδίου p16.....	26
3.6.2	Πέψη των ενισχυμένων τμημάτων.....	27
3.7	Στατιστική ανάλυση.....	29
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
4.1	Ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν στον πολυμορφισμό του γονιδίου p53.....	30
4.1.1	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης του γονιδίου p53 με PCR.....	30
4.1.2	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης.....	31
4.2	Ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν στους πολυμορφισμούς στις θέσεις 540 και 580 του γονιδίου p16.....	33
4.2.1	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης του γονιδίου p16 με PCR.....	33
4.2.2	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης με το ένζυμο MspI.....	33
4.2.3	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης με το ένζυμο HaeIII.....	35
4.2.4	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	37
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τους HPV

Οι ιοί HPV είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί. Το DNA τους έχει μέγεθος 8000bp και είναι συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες, σχηματίζοντας σύμπλοκα παρόμοια με τη χρωματίνη (Zur Hausen, 1996). Δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο και αντιγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, ενώ το καψίδιο τους έχει διάμετρο 50-60nm και παρουσιάζει εικοσαεδρική συμμετρία (Kirnbauer et al., 1992). Το γονιδίωμα τους περιέχει 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNAs που μεταγράφονται μόνο από τον έναν κλώνο DNA (Zheng, 2006). Ανάλογα με τη θέση τους στο γονιδίωμα, τα ORFs διακρίνονται σε πρώιμα και όψιμα. Τα πρώιμα κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7, ενώ τα όψιμα κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες L1 και L2, δηλαδή για τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη συγκρότηση των νέων ιικών καψιδίων (Danos et al., 1982). Τέλος, στο γονιδίωμα υπάρχει και μια περιοχή μεγέθους 1kb που δεν περιλαμβάνει ORFs και ονομάζεται LCR. Η περιοχή αυτή περιέχει το σημείο έναρξης της αντιγραφής, καθώς και στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής (Hebner, 2006).



Εικόνα 1.1.1: Δομή του ιικού γονιδιώματος του HPV16. Peter M. Howley, John Schiller, Douglas Lowy, *Papillomaviruses*, Fields Virology: chapter 54 (1662-1703)

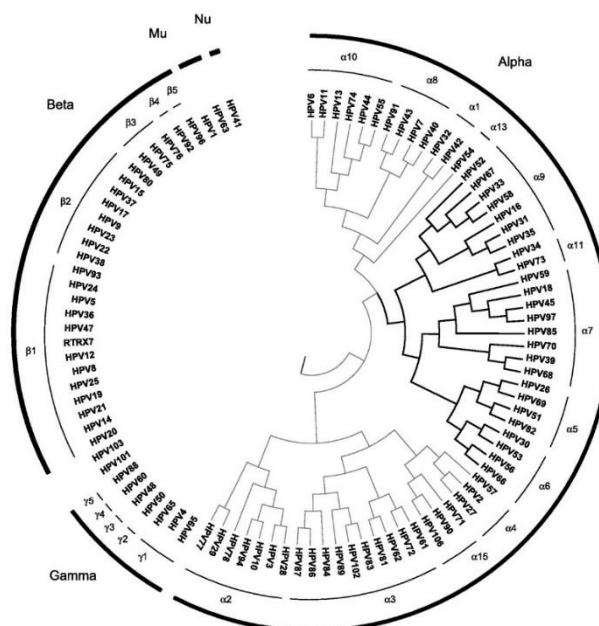
1.2 Ταξινόμηση

Οι HPV ανήκουν στην οικογένεια Papillomaviridae (van Regenmortel et al., 2002). Υπάρχουν περίπου 150 υπότυποι HPV, από τους οποίους οι περισσότεροι δημιουργούν καλοήθεις όγκους και χαρακτηρίζονται ως χαμηλού κινδύνου (low risk), ενώ υπάρχουν και άλλοι που έχουν συσχετιστεί με κακοήθεις νεοπλασίες και χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου (high risk) (Bernard et al., 2010).

High-risk HPV subtypes	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Low-risk HPV subtypes	6, 11, 42, 44, 51, 53, 83

Εικόνα 1.2.1: Ταξινόμηση των HPV σε high risk και low risk. Heather P. Adams et al. *HPV Infection and Cervical Cancer Prevention*. Clinician Reviews September 2013

Οι HPV ταξινομούνται σε 5 γένη, τα alpha, beta, gamma, mu και nu, με βάση την ανάλυση του γονιδιώματος, με τους διαφορετικούς τύπους να παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά στον κύκλο ζωής τους και να προκαλούν διαφορετικού βαθμού αλλοιώσεις στο επιθήλιο (Doorbar, 2006, Bosch et al., 2008, Bernard et al., 2010, Ekström et al., 2011). Τα επιμέρους γένη χωρίζονται περαιτέρω σε τύπους και υπότυπους με βάση την ομοιότητα που παρατηρείται στην αλληλουχία του γονιδίου L1 (Bernard et al., 2010). Το γένος alpha περιλαμβάνει δυο από τους πλέον υψηλού κινδύνου HPV, τους HPV16 και HPV18.

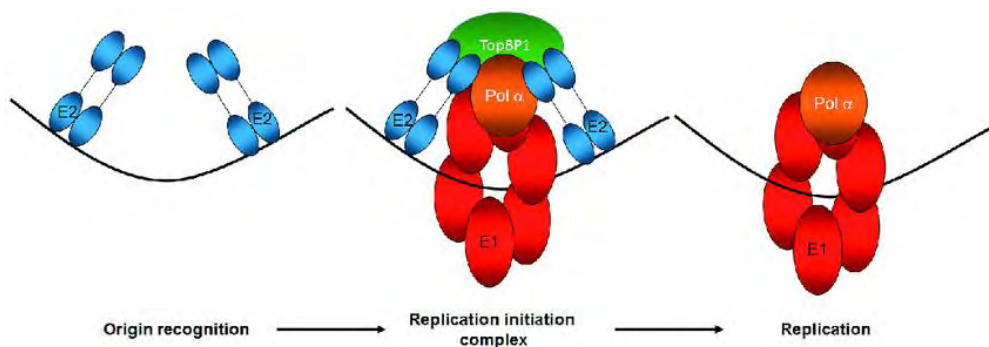


Εικόνα 1.2.2: Ταξινόμηση των HPV με βάση το γονιδιώμα τους σε 5 γένη. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. *The biology and life cycle of human papillomaviruses*. Vaccine 2012

1.3 Λειτουργίες των ικών γονιδίων

Ο ιός ακολουθεί τον κύκλο διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή. Στους HPV έχουν αναγνωριστεί δυο υποκινητές, εκ των οποίων ο ένας, P97, βρίσκεται ανοδικά του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις πρώιμες πρωτεΐνες και ο άλλος, P670, βρίσκεται καθοδικά του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις όψιμες πρωτεΐνες (Zheng, 2006, Buck et al., 2004).

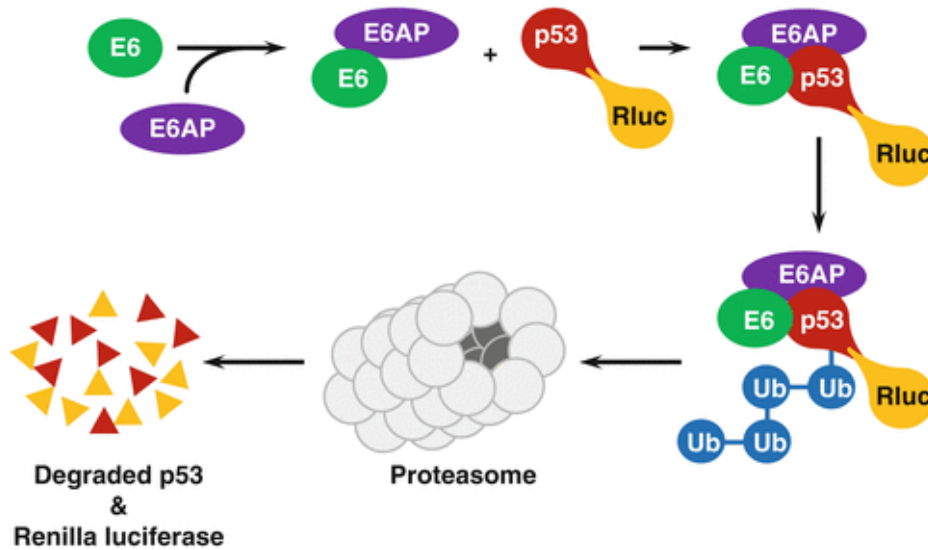
Ο HPV μολύνει αρχικά τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Στα κύτταρα αυτά επάγεται η έκφραση των πρώιμων γονιδίων από τον υποκινητή P97 (Zheng, 2006). Παράγονται πολυκιστρονικά mRNAs, από τα οποία, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, προκύπτουν οι έξι πρώιμες πρωτεΐνες, E1, E2, E4, E5, E6 και E7. Από τις πρωτεΐνες αυτές, η E1 και E2 έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ικού γονιδιώματος, η οποία λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την αντιγραφή του DNA του κυττάρου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, η E1 εμφανίζει δράση ATPάσης και 3'-5' ελικάσης και προσδέεται ισχυρά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA, αφού πρώτα δημιουργήσει σύμπλοκο με την E2 (Liu, 1995). Μόλις η E1 προσδεθεί στο DNA σχηματίζει έναν εξαμερή δακτύλιο διαμέσου του οποίου περνά το DNA του ιού και ξετυλίγεται. Ακόμα, η δημιουργία του συμπλόκου E1 - E2 και η πρόσδεσή του στο DNA συμβάλλουν στη στρατολόγηση της DNA πολυμεράσης και άλλων πρωτεϊνών, με σκοπό την έναρξη της αντιγραφής (Sedman et al., 1998, D'Abramo and Archambault, 2011). Εκτός από τον ρόλο της στην αντιγραφή, η E2 εμπλέκεται και στη ρύθμιση της μεταγραφής του ικού γονιδιώματος από τον υποκινητή P97, ρόλος που θα συζητηθεί παρακάτω πιο αναλυτικά.



Εικόνα 1.3.1: Συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης της αντιγραφής του ιού από τις πρωτεΐνες E1-E2. Molly L. Bristol et al., *Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling*. September 2017

Οι πρωτεΐνες E6 και E7 μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Στα φυσιολογικά κύτταρα, κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου είναι η πρωτεΐνη p53. Όταν προκαλούνται βλάβες στο DNA, η έκφραση της p53 αυξάνεται

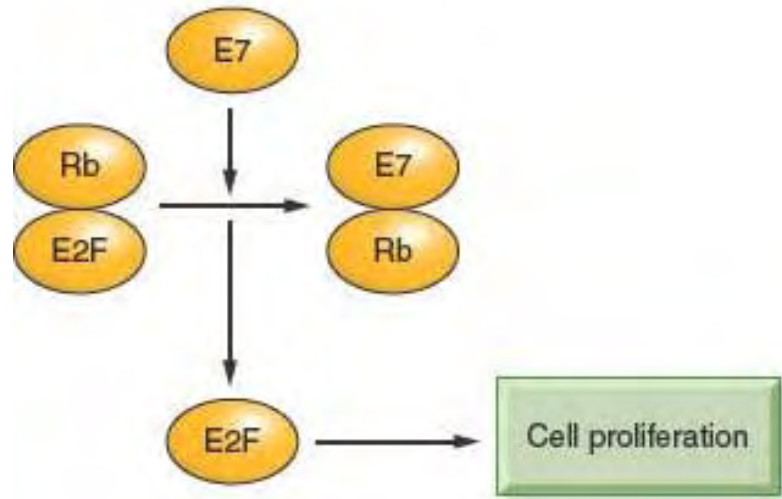
και κατόπιν επάγεται η έκφραση της p21, μιας πρωτεΐνης που αποτελεί καταστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdks). Η ενεργοποίηση της p21 προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Μόνο όταν διορθωθεί η βλάβη, είναι δυνατή η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου στη φάση S (Artandi et al., 2005). Η E6 σχηματίζει σύμπλοκο με την E3 λιγάση της ουβικιτίνης και αλληλεπιδρά με την p53. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της p53 από το 26S πρωτεάσωμα και άρα την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου από το κύτταρο (Pim et al., 2010, Fu et al., 2010).



Εικόνα 1.3.2: Αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 από το σύμπλοκο E6-E6AP **Gagnon D. et al., A High-Throughput Cellular Assay to Quantify the p53-Degradation Activity of E6 from Different Human Papillomavirus Types. Cervical Cancer, 2015**

Μια ακόμα πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb. Φυσιολογικά, σε αδρανή κύτταρα ή σε κύτταρα που βρίσκονται στο πρώτο στάδιο της φάσης G1, η Rb στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκφραση γονιδίων που είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Η μετάβαση στη φάση S είναι δυνατό να επιτευχθεί έπειτα από τη φωσφορυλίωση της Rb από το σύμπλοκο cdk4,6-κυκλίνηD. Η φωσφορυλίωση της Rb παρεμποδίζεται από την p16, η οποία αποτελεί αναστολέα των cdk4,6, καθώς εμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους με την κυκλίνη D. Η Rb στη φωσφορυλιωμένη της μορφή αποικοδομείται, προκαλώντας την απελευθέρωση του παράγοντα E2F, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση του DNA (Wang et al., 2001). Παρουσία της E7, η Rb απομακρύνεται από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον παράγοντα E2F, λόγω πρόσδεσης της στην E7. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου,

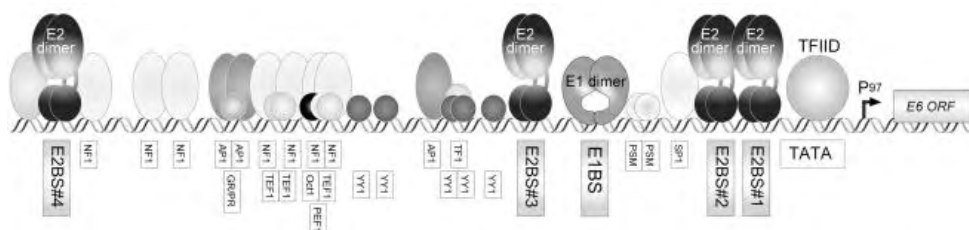
λόγω της συνεχούς έκφρασης των γονιδίων που σηματοδοτείται από την απελευθέρωση του E2F (Roman, 2006, Barrow et al., 2010). Επιπλέον, η E7 αναστέλλει τη δράση των αναστολέων cdk p21 και p27, γεγονός που ενισχύει τη φωσφορυλίωση της Rb και άρα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Nguyen, 2008).



Εικόνα 1.3.3: Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών E7-Rb Kay J. Park MD *Neoplastic Lesions of the Cervix*. Surgical Pathology Clinics, March 2011

Τέλος, οι πρωτεΐνες E4 και E5 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών (McIntosh et al., 2010).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η E2 συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιικού γονιδιώματος από τον υποκινητή P97. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή LCR του ιικού DNA υπάρχουν τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2. Η πρόσδεση της E2 σε αυτές σηματοδοτεί το πέρας της πρώιμης φάσης και την έναρξη της όψιμης φάσης μόλυνσης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή (Bouvard. et al., 1994).

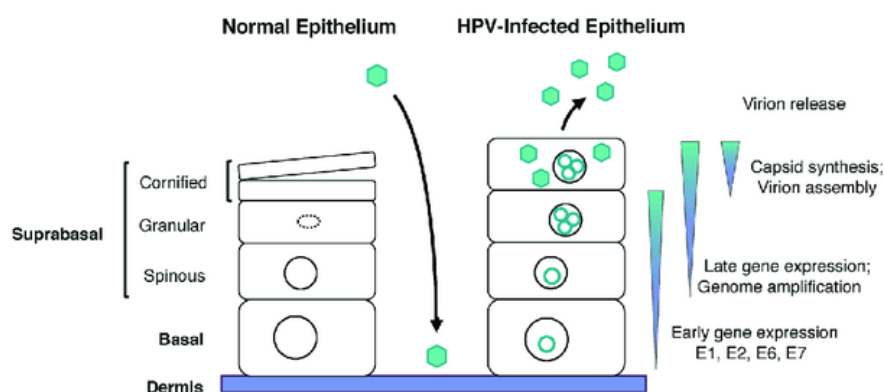


Εικόνα 1.3.4: Θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 στην περιοχή LCR του ιού. Kajitani N. et al., *Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation*. Frontiers in Microbiology, April 2012

Το τελευταίο στάδιο της αντιγραφής συμβαίνει στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, όπου λαμβάνει χώρα η έκφραση των πρωτεϊνών L1 και L2 από τον υποκινητή P670. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 είναι υπεύθυνες για τη συγκρότηση των νέων ικών καψιδίων (Buck et al., 2004).

1.4 Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του ιού περιλαμβάνει πέντε στάδια: την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή, την έκφραση των ικών γονιδίων, την αντιγραφή του γονιδιώματος, τη συγκρότηση των νέων ικών σωματίων και την απελευθέρωση από το κύτταρο. Καθώς ο ιός ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή, η έναρξη του κύκλου ζωής του λαμβάνει χώρα στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα του της βασικής στιβάδας του επιθηλίου και ολοκληρώνεται στα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων που είναι πλήρως διαφοροποιημένα. Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά τα επιμέρους στάδια του κύκλου ζωής του ιού.

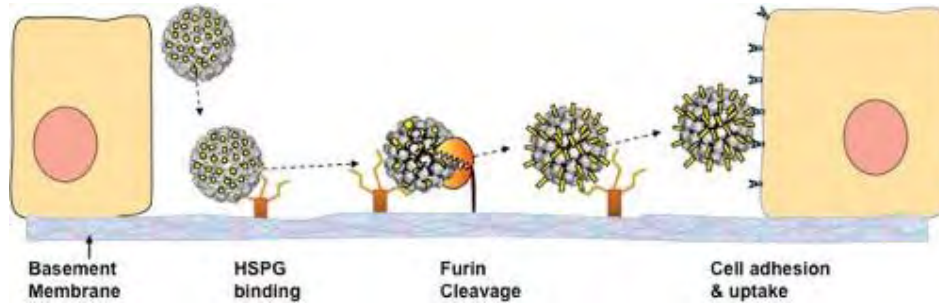


Εικόνα 1.4.1: Κύκλος ζωής του ιού HPV. Chelsey C. Spriggs et al., *Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication*. Viruses 2017

1.4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή

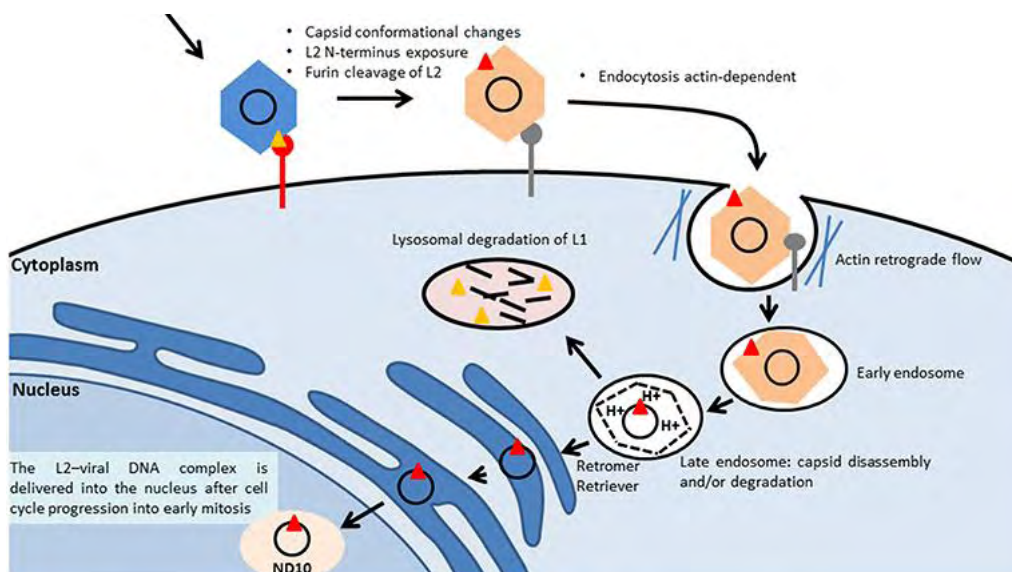
Ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου. Ο υποδοχέας για την είσοδο του ιού παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστος. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα ιικά σωματίδια προσδέονται σε ειδικές γλυκοπρωτεΐνες HSPGs στη μεμβράνη των κυττάρων της βασικής στιβάδας, οι οποίες εκτίθενται στις κυτταρικές επιφάνειες μετά από κάποιο μικροτραυματισμό. Η πρόσδεση των ικών σωματίων στη μεμβράνη των κυττάρων της

βασικής στιβάδας προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του καψιδίου, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αποκοπή ενός τμήματος από το N-τελικό άκρο της L2 από μια πρωτεάση. Αν και δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το πώς το ιικό σωματίο εισέρχεται στα κύτταρα της βασικής στιβάδας, φαίνεται ότι η κοπή του N-τελικού άκρου είναι καθοριστική για την είσοδο του ιού σε αυτά (Shafti-Keramat et al., 2003).



Εικόνα 1.4.1.1: Πρόσδεση του ιικού σωματίου στη μεμβράνη των κυττάρων της βασικής στιβάδας. John T Schiller et al., *The Role of Furin in Papillomavirus Infection*. Future Microbiol. 2009

Έχουν αναπτυχθεί δυο μοντέλα που εξηγούν τον καθοριστικό ρόλο της πρωτεολυτικής αυτής κοπής για τη μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, αυτή η κοπή εκθέτει ένα σημείο πρόσδεσης του καψιδίου σε έναν άγνωστο μέχρι στιγμής υποδοχέα, ενώ το δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι τα ιικά σωματίδια αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές επιφάνειες ως μεγαλομοριακά σύμπλοκα με αυξητικούς παράγοντες, που προσδένονται σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (Johnson et al., 2009).



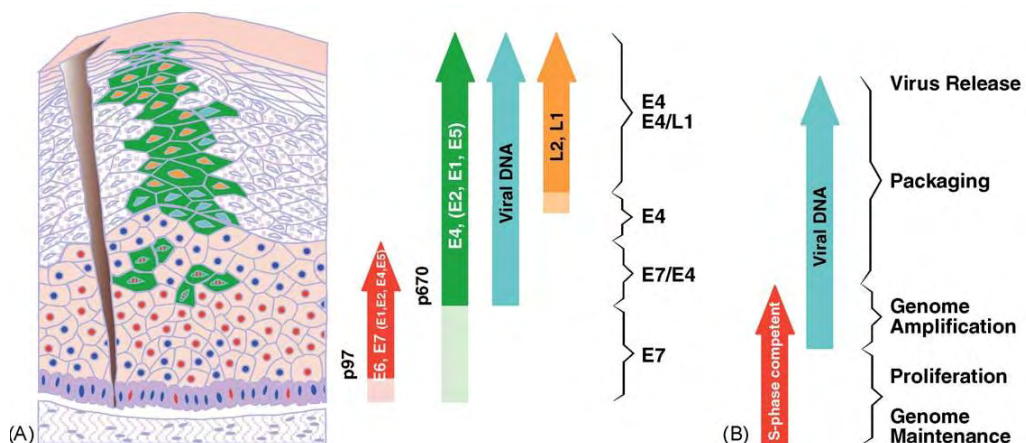
Εικόνα 1.4.1.2: Είσοδος του DNA του ιού HPV στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Tarik Gheit, *Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology*. Front. Oncol. May 2009

Μετά την είσοδο τους στο κυτταρόπλασμα με ενδοκύτωση σε κυστίδια κλαθρίνης, τα ιικά σωμάτια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης L2 (Bousarghin et al., 2003). Η πρωτεΐνη L1 αποικοδομείται στα ενδοσώματα, ενώ η είσοδος του συμπλόκου L2-DNA στον πυρήνα φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω διάρρηξης του πυρηνικού φακέλου και όχι με ενδοκύτωση μέσω των πυρηνικών πόρων (Schelhaas et al., 2012).

1.4.2 Έκφραση των γονιδίων του ιού

Η έκφραση των γονιδίων του ιού ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή. Ο ιός προσβάλλει τα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στιβάδας, στα οποία επάγεται η έκφραση των πρώιμων γονιδίων από τον υποκινητή P97, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ρυθμιστικών πρωτεϊνών E1, E2, E4, E5, E6 και E7. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της μόλυνσης και την πραγματοποίηση των πρώτων σταδίων του κύκλου αντιγραφής του ιού (Zheng, 2006).

Μόλις η E2 προσδεθεί στις θέσεις πρόσδεσής της στην περιοχή LCR, τότε δίνεται το σήμα για την ολοκλήρωση της πρώιμης φάσης μόλυνσης και την έναρξη της όψιμης, με τον υποκινητή P670 να επάγει την έκφραση των δομικών πρωτεϊνών L1 και L2. Η έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι καθοριστική για τον σχηματισμό των ιικών καψιδίων και το πακετάρισμα του γονιδιώματος του ιού στα νεοσυντιθέμενα ιικά σωμάτια, γεγονός που πυροδοτεί και την απελευθέρωση του ιού από το κύτταρο (Doorbar et al., 2012).



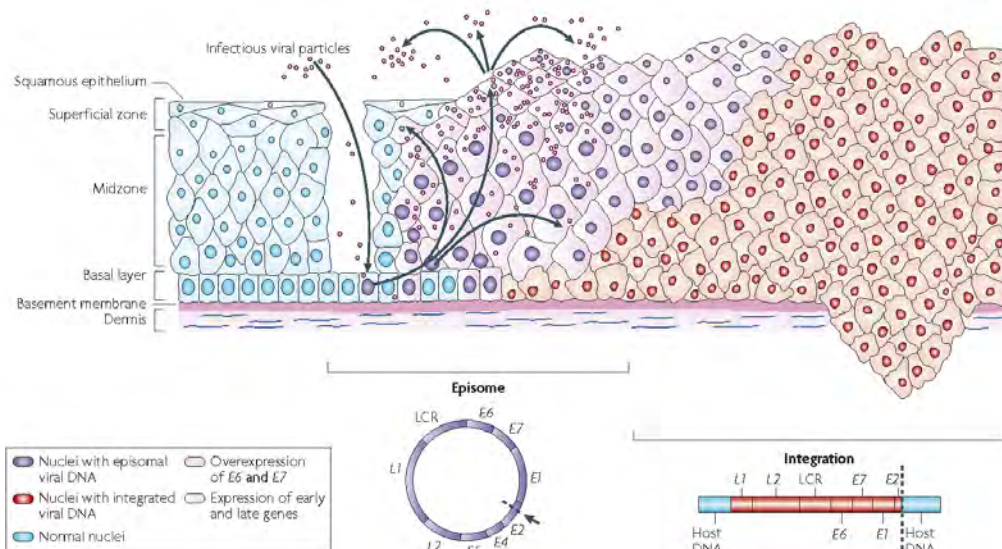
Εικόνα 1.4.2.1: Έκφραση των ιικών γονιδίων Doorbar J., *The Papillomavirus life cycle*, Journal of clinical virology, 2005

1.4.3 Συγκρότηση των νέων ιικών σωματίων και απελευθέρωση του ιού

Η ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού περιλαμβάνει τη σύνθεση των νέων ιικών σωματίων και το πακετάρισμα εντός αυτών των αντιγράφων του ιικού DNA. Για τη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων, η οποία πραγματοποιείται στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες L1 και L2, καθώς και η E2. Οι δυο πρώτες θα κατασκευάσουν το καψίδιο, ενώ η τελευταία θα συμβάλει στην είσοδο του DNA μέσα σε αυτό (Buck et al., 2004). Τη συγκρότηση των ιικών σωματίων ακολουθεί η ωρίμανσή τους και τελικά η απελευθέρωση του ιού με τη βοήθεια του συμπλόκου E1⁺E4, χωρίς να προκαλείται λύση των κυττάρων του ξενιστή (Lehr E. et al., 2004).

1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος

Ο HPV 16 μπορεί να βρίσκεται σε επισωματική μορφή στο κύτταρο, ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δυο μορφές (Andersson et al., 2005). Στην περίπτωση που βρίσκεται σε επισωματική μορφή, τότε ακολουθείται η διαδοχή των γεγονότων, όπως αυτή αναλύθηκε παραπάνω. Αρχικά ο ιός προσβάλλει τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα της βασικής στιβάδας, επάγεται η έκφραση των πρώιμων γονιδίων που τερματίζεται με την πρόσδεση της E2 στην LCR και τελικά επάγεται η έκφραση των όψιμων γονιδίων στα διαφοροποιημένα κύτταρα στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, που συνοδεύεται από τη δημιουργία νέων ιικών σωματίων.

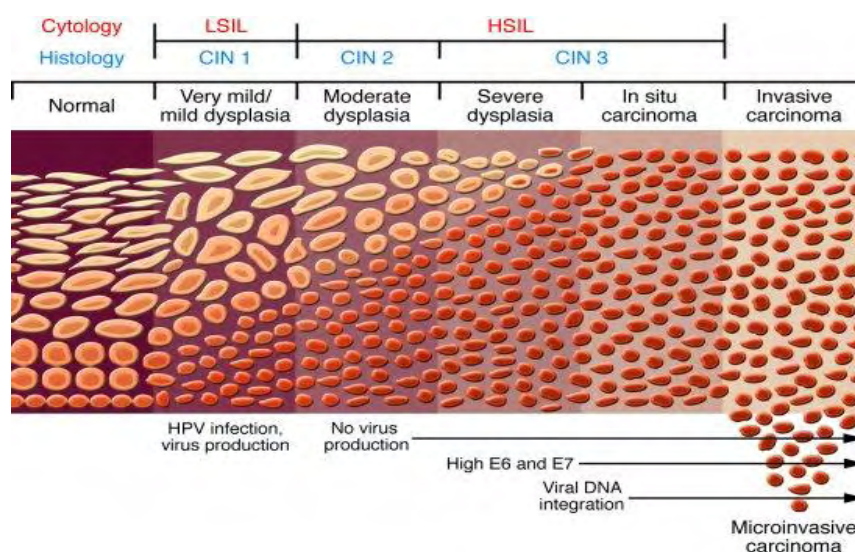


Εικόνα 1.5.1: Μορφές του ιικού γονιδιώματος Woodman CB et al., *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*, Nature Reviews Cancer 2007

Η ενσωμάτωση του ιού επιφέρει σημαντικές αλλαγές που αφορούν στον κύκλο ζωής του. Ο HPV 16 ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή λόγω διάρρηξης του γονιδίου E2 (Cricca et al., 2009). Έτσι, καταστρέφεται μέρος των γονιδίων E2 και L2, ενώ τα γονίδια E4 και E5 χάνονται. Καθώς πλέον δεν είναι δυνατή η παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών E2, οι θέσεις πρόσδεσης της E2 στην LCR δεν μπορούν να καλυφθούν, με αποτέλεσμα ο ιός να μην αναγνωρίζει το σήμα ότι η πρώιμη φάση ολοκληρώθηκε. Ο κύκλος ζωής του ιού παραμένει στάσιμος στην πρώιμη φάση, γεγονός που πυροδοτεί την υπερέκφραση των πρωτεϊνών E6 και E7. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν συνεχώς με τις p53 και Rb αντίστοιχα, οδηγώντας το κύτταρο σε απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και προοδευτικά στην ανάπτυξη καρκίνου (Arias Pulido et al., 2006).

1.6 HPV και καρκίνος

Η μόλυνση με HPV μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων επιθηλιακών καρκίνων, με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας να αποτελεί τον μεγαλύτερο κίνδυνο για την υγεία των γυναικών παγκοσμίως (Zur Hausen, 1996). Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας κατέχει την 3^η θέση μεταξύ των πιο συχνών ασθενειών που εκδηλώνονται στον γυναικείο πληθυσμό (Jemal, 2011). Η εκδήλωση του καρκίνου μετά από μόλυνση με HPV απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών E6 και E7. Αρχικά εμφανίζονται αλλοιώσεις στο επιθήλιο, οι οποίες ταξινομούνται σε χαμηλού (low-grade) και υψηλού (high-grade) βαθμού, ανάλογα με τον βαθμό με τον οποίο τα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου αντικαθίστανται από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας (Solomon et al., 2012).



Εικόνα 1.6.1: Βαθμός αλλοίωσης του επιθηλίου έπειτα από μόλυνση με HPV, **Lowy D. et al.**, *Prophylactic human papillomavirus vaccines*, Journal of clinical investigation, May 2006

1.6.1 Γενετικό υπόβαθρο των ανθρώπων

Εκτός από τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων E6 και E7, η ανάπτυξη καρκίνου έπεται από μόλυνση με HPV σχετίζεται με το γενετικό υπόβαθρο των ανθρώπων. Έχουν βρεθεί τρεις πολυμορφισμοί που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Ο πρώτος εντοπίζεται στο γονίδιο της p53, και πιο συγκεκριμένα στο κωδικόνιο 72, και σχετίζεται με τη μετατροπή του αμινοξέος αργινίνη(Arg) σε προλίνη(Pro), ενώ οι άλλοι δύο εντοπίζονται στο γονίδιο της p16 και συγκεκριμένα στις θέσεις 540 και 580 του εξωνίου 3, όπου η κυτοσίνη(C) μετατρέπεται σε γουανίνη(G) και η κυτοσίνη(C) μετατρέπεται σε θυμίνη(T) αντίστοιχα (C540G και C580T) (Moschonas et al., 2017, Tsakogiannis et al., 2017).

Οι παραπάνω πολυμορφισμοί και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν μελετηθεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς γυναικών σε όλο τον κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός Arg72Pro, που εντοπίζεται στο γονίδιο της p53, έχει μελετηθεί σε πληθυσμούς γυναικών από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική (Inserra et al., 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, οι γυναίκες που είναι ομόζυγες για την αργινίνη εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης δυσπλασιών στο επιθήλιο του τραχήλου (Storey et al., 1998). Όσον αφορά στον γυναικείο κινέζικο πληθυσμό, έχει βρεθεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες ομόζυγες για την προλίνη (Li B et al., 2015), ενώ καμία συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας δεν έχει βρεθεί σε πληθυσμούς γυναικών από την κεντρική και βόρεια Αφρική, το Μαρόκο, την Ταϊλάνδη και την ανατολική Ασία (El Khair et al., 2010, Assoumou SZ et al., 2015, Zhou X et al., 2012).

Όσον αφορά στους πολυμορφισμούς που εντοπίζονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p16, η συσχέτισή τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί σε πληθυσμούς γυναικών από την Ταϊλάνδη, την Ινδία και τη Βραζιλία (Thakur N et al., 2012, Chansaenroj J et al., 2013, Vargas-Torres et al., 2014). Σύμφωνα με μελέτες, δεν υπάρχει καμία συσχέτιση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε γυναίκες από την Ταϊλάνδη (Chansaenroj et al., 2013). Αντίθετα, στην Ινδία έχει βρεθεί ότι σε γυναίκες που φέρουν το νουκλεοτίδιο G στη θέση 540 και το νουκλεοτίδιο T στη θέση 580 του εξωνίου 3, είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση, υπάρχει προστασία έναντι του καρκίνου (Thakur N et al., 2012). Τέλος, η κατάσταση παρουσιάζεται διαφορετική στον γυναικείο πληθυσμό της Βραζιλίας, καθώς οι γυναίκες που φέρουν το νουκλεοτίδιο G στη θέση 540 και το νουκλεοτίδιο T στη θέση 580 του εξωνίου 3 είτε σε

ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Vargas-Torres et al., 2014).

Είναι εμφανές λοιπόν, οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις p53 και p16 παρουσιάζουν διαφορετική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στους διαφορετικούς πληθυσμούς γυναικών. Η συσχέτιση αυτή εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών, καθώς και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες στους οποίους εκτίθενται (Settheetham-Ishida W et al., 2004).

Οι παραπάνω πολυμορφισμοί και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στον γυναικείο ελληνικό πληθυσμό αποτελούν το κεντρικό θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών των γονιδίων p53 και p16 με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Για την διεξαγωγή της, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από γυναίκες που εμφάνισαν υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες έπειτα από μόλυνση με HPV16, καθώς και δείγματα που δεν έφεραν αλλοιώσεις στο επιθήλιο του τραχήλου, παρόλο που ήταν HPV16 θετικά. Τα δείγματα αρχικά υποβλήθηκαν σε κατάλληλη εργαστηριακή ανάλυση, προκειμένου να βρεθεί ο πολυμορφισμός που έφεραν και στα δυο προαναφερθέντα γονίδια. Την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων ακολούθησε στατιστική ανάλυση, με στόχο να υπολογιστεί αν η συσχέτιση των πολυμορφισμών Arg72Pro, C540G και C580T με την εμφάνιση δυσπλασιών υψηλού και χαμηλού βαθμού ήταν στατιστικά σημαντική.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλινικά δείγματα

Για την διεξαγωγή της εργαστηριακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα, που προέρχονταν από Ελληνίδες γυναίκες που είχαν βρεθεί θετικές για μόλυνση με HPV16. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Αθηνών “Άγιος Σάββας”, το εργαστήριο Κυτταροπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “ΑΤΤΙΚΟΝ” και από ένα ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο. Συνολικά μελετήθηκαν 74 δείγματα, τα οποία προέρχονταν από βιοψίες τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη, από τραχηλικά επιχρίσματα και από ThinPrep. Ανάλογα με τον βαθμό δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας, 30 από τα ανωτέρω δείγματα έφεραν υψηλού βαθμού δυσπλασίες(HSIL), 26 χαμηλού βαθμού(LSIL), ενώ σε 18 από αυτά δεν βρέθηκαν αλλοιώσεις στο επιθήλιο(normal), παρόλο που είχαν βρεθεί θετικά για μόλυνση με HPV16.

Στον πίνακα της επόμενης σελίδας (Πίνακας 3.1.1) φαίνονται συνολικά τα δείγματα, ταξινομημένα ως προς το βαθμό δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας, το είδος και την προέλευσή τους.

3.2 Εκχύλιση DNA

Για την απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, ανάλογα με το είδος του δείγματος (τραχηλικό επίχρισμα, μονιμοποιημένος ιστός σε παραφίνη, ThinPrep).

3.2.1 Εκχύλιση DNA από δείγμα τραχηλικού επιχρίσματος

Η εκχύλιση DNA έγινε με τη χρήση πρωτεΐνάσης K (Puranen et al., 1996). Κύτταρα, τα οποία είχαν μονιμοποιηθεί σε κατάλληλη πλάκα, τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με 0,5-1,5ml διαλύματος 10mM Tris Base και 1mM EDTA, ποσότητα ανάλογη αυτής των κυττάρων που απομονώθηκαν. Κατόπιν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1 λεπτό στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα επαναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 1ml διαλύματος 10mM Tris Base και 1mM EDTA και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 1 ώρα. Έπειτα, πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και ακολουθεί επαναδιάλυση του

Πίνακας 3.1.1: Συγκεντρωτικά τα HPV16 θετικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στα παρούσα εργασία

HSIL			LSIL			NORMAL		
ΟΝΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΟΝΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΟΝΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΠΝΛ5	ThinPrep	ΠΓΝΛ	A17	Τραχηλικό Επίχρισμα	ΠΓΝΛ	N1	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ7	ThinPrep	ΠΓΝΛ	A24	Τραχηλικό Επίχρισμα	ΠΓΝΛ	N2	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ9	ThinPrep	ΠΓΝΛ	ΑΤΤ1	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N3	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ11	ThinPrep	ΠΓΝΛ	ΑΤΤ8(124)	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N4	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ13	ThinPrep	ΠΓΝΛ	ΑΤΤ8	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N5	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ5	ThinPrep	Άγιος Σάββας	ΑΤΤ12	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N6	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ9	ThinPrep	Άγιος Σάββας	ΑΤΤ13	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N8	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ16	ThinPrep	Άγιος Σάββας	ΑΤΤ98	ThinPrep	Άγιος Σάββας	N10	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
ΑΤΤ80	ThinPrep	Άγιος Σάββας	s92-17	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	N11	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
A3	Τραχηλικό επίχρισμα	ΠΓΝΛ	s102-17	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	N12	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ16	Ιστός σε παραφίνη	Ιδ. Εργαστήριο	s1213-4	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	S352-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ63	Ιστός σε παραφίνη	Ιδ. Εργαστήριο	2121	ThinPrep	Άγιος Σάββας	S1099-13	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ64	Ιστός σε παραφίνη	Ιδ. Εργαστήριο	2127	ThinPrep	Άγιος Σάββας	S1177-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ65	Ιστός σε παραφίνη	Ιδ. Εργαστήριο	2148	ThinPrep	Άγιος Σάββας	S1202-10	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
Δ66	Ιστός σε παραφίνη	Ιδ. Εργαστήριο	2209	ThinPrep	Άγιος Σάββας	9988-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
s386-17	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	2216	ThinPrep	Άγιος Σάββας	10696-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
s1220-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	2290	ThinPrep	Άγιος Σάββας	10730-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
s1225-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	9969-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10735-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ
s1426-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	9972-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
s2186-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	9983-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
9974-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10021-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
9981-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10030-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
9992-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10644-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
10000-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10693-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
10029-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10715-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
10036-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ	10720-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ			
10647-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ						
10658-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ						
10713-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ						
10732-14	ThinPrep	ΑΤΤΙΚΟΝ						

ιζήματος με 50μl διαλύματος 50mM KCl, 10mM Tris Base και 2.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween 20, pH 8.3. Στη συνέχεια, προστίθεται 1μl πρωτεΐνάσης K (20μg/μl) και το διάλυμα επώαζεται στους 55°C για 1 ώρα. Για την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K πραγματοποιείται επώαση του μείγματος στους 95°C για 10 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 13.000gpm για 5 λεπτά στους 4°C και συλλογή του υπερκλειμένου. Το DNA των δειγμάτων αποθηκεύεται στους -20°C.

3.2.2 Εκχύλιση DNA από δείγμα ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη

Η εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πρωτεΐνάσης K. τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη, διαμέτρου 5-10μm τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με 400μl ξυλόζης και φυγοκέντρηση στις 13.000gpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αναδεύεται ισχυρά με 400μl 96% αιθανόλης. Κατόπιν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000gpm για 5 λεπτά στους 4°C με το υπερκείμενο να απορρίπτεται μετά το πέρας αυτής. Ακολουθεί προσθήκη 50-200μl διαλύματος εκχύλισης 1X και ολονύχτια επώαση στους 37°C. Για την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K πραγματοποιείται επώαση στους 95°C για 15 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του διαλύματος στους 4°C, συλλογή του υπερκλειμένου και αποθήκευση DNA στους -20°C.

3.2.3 Εκχύλιση DNA από δείγμα ThinPrep

Η εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του χαστροπικού παράγοντα θειοκυανιούχο γουανιδίνη (GuSCN) (Casas et al., 1996). Σε πλαστικό σωλήνα των 2ml προστίθενται 100μl δείγματος, 10μl γλυκογόνο (100mg/ml) και 300μl διάλυμα λύσης GuSCN. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 400μl παγωμένης ισοπροπυλικής αλκοόλης με επακόλουθη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14.000gcf, απόρριψη του υπερκλειμένου και προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 14.000gcf για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl ddH₂O. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C.

3.3 Έλεγχος της εκχύλισης

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία κυτταρικού DNA στα εκχυλισμένα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος μεγέθους 498bp του

γονιδίου της β-ακτίνης, χρησιμοποιώντας το εκκινητικό ζεύγος β-actin F 5'-AGCCATGTACGTTGCTATCC-3' / β-actin R 5'-TTGGCGTACAGGTCTTTGC-3'. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 50pmol εκκινητικών μορίων (25pmol από τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (DreamTaq buffer), περιεκτικότητας 2mM MgCl₂, 1mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 1,5 Units DreamTaq DNA πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 55°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 40 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Αμέσως μετά την PCR, τα ενισχυμένα τμήματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος ήταν επιτυχής.

3.4 Ανίχνευση HPV16 στα δείγματα

Η ανίχνευση του DNA του ιού HPV16 στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω PCR. Πιο συγκεκριμένα, ενισχύθηκαν τμήματα των γονιδίων E6 και L1 μήκους 202bp και 292bp αντίστοιχα.

Η PCR για το γονίδιο E6 πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μL. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 50pmol του εκκινητικού ζεύγους HPV16 E6 F3 5'-ATGCACCAAAAAGAGAACTGC-3' / HPV16 E6 B3 5'-ACAGCATATGGATTCCCATCTC-3' (25pmol από τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (DreamTaq buffer), περιεκτικότητας 2mM MgCl₂, 1mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 1,5 Units DreamTaq DNA πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 50°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 40 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Η PCR για το γονίδιο L1 πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μL. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 50pmol του εκκινητικού ζεύγους HPV16 L1F 5'-CACTATTTTGGAGGACTGGAAT-3' / HPV16 L1R 5'-GATGAGGTGGTGGGTGTAGC-3' (25pmol από

τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (DreamTaq buffer), περιεκτικότητας 2mM MgCl₂, 1mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 1,5 Units DreamTaq DNA πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 58°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 40 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Αμέσως μετά την PCR, τα ενισχυμένα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων ήταν επιτυχής.

3.5 Ανίχνευση του πολυμορφισμών του γονιδίου p53

3.5.1 Ενίσχυση τμήματος 309bp στο εξώνιο 4 του γονιδίου p53

Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p53 οφείλεται στην αλλαγή του νουκλεοτιδίου γουανίνη σε κυτοσίνη (G→C) στην αλληλουχία του εξωνίου 4, με αποτέλεσμα το αμινοξύ αργινίνη (Arg) που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο 72 να μετατρέπεται σε προλίνη (Pro). Η ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε μέσω PCR-RFLP. Πιο συγκεκριμένα, ένα τμήμα μήκους 309bp στο εξώνιο 4 του γονιδίου p53 ενισχύθηκε μέσω PCR με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών p53 F Bur 5'-TTCACCCATCTACAGTCC-3' / p53 R Bur 5'-CTCAGGGCAACTGACCGT-3'. Μετά το τέλος της PCR, τα ενισχυμένα τμήματα υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstU1.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 50pmol εκκινητικών μορίων (25pmol από τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (DreamTaq buffer), περιεκτικότητας 2mM MgCl₂, 1mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 2 Units DreamTaq DNA πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 45 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 52°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 45 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Αμέσως μετά την PCR, τα ενισχυμένα τμήματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος ήταν επιτυχής.

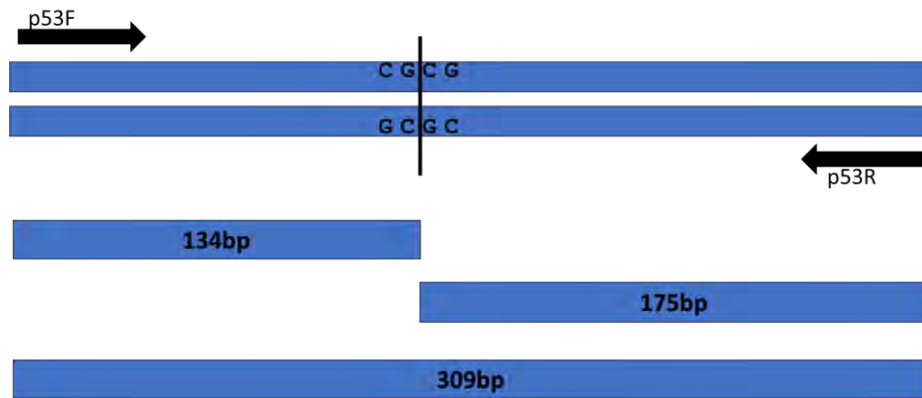
3.5.2 Πέψη των ενισχυμένων τμημάτων

Την ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων δειγμάτων, ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI. Ανάλογα με την ένταση της ζώνης που έδωσε καθένα από τα ανωτέρω δείγματα, εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα πέψης.

Η αντίδραση πέψης για τα δείγματα που έδωσαν έντονη ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10μl DNA από τα ενισχυμένα δείγματα, 1X ρυθμιστικού διαλύματος CutSmart buffer, 10U ενζύμου περιορισμού BstUI και ddH₂O έως τα 25μl. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 60°C. Μετά την επώαση, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 5μl 10X loading buffer, προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση πέψης. Τέλος, ακολούθησε διαχωρισμός των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να καθοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν.

Όσον αφορά στα δείγματα που έδωσαν αχνή ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση, η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 20μl DNA από τα ενισχυμένα δείγματα, 1X ρυθμιστικού διαλύματος CutSmart buffer, 10U ενζύμου περιορισμού BstUI και ddH₂O μέχρι τα 25μl. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 60°C. Μετά την επώαση, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 5μl 10X loading buffer, προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση πέψης. Τέλος, ακολούθησε διαχωρισμός των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να καθοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν.

Ανάλογα με τον πολυμορφισμό που φέρουν τα δείγματα αναμένονται και διαφορετικού μεγέθους τμήματα μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI. Το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{CGCG} \dots 3'$ και κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων G και C, $3' \dots \text{GCGC} \dots 5'$ δίνοντας κατά την ηλεκτροφόρηση δυο τμήματα μεγέθους 134bp και 175bp, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.2.1. Στην περίπτωση που στο εξώνιο 4 του γονιδίου p53 το νουκλεοτίδιο G έχει μετατραπεί σε C, τότε το ένζυμο δεν κόβει την αλληλουχία κι έτσι κατά την ηλεκτροφόρηση προκύπτει ένα τμήμα μεγέθους 309bp. Τέλος, στην περίπτωση ετεροζυγωτίας, προκύπτουν τρία τμήματα μεγέθους 134bp, 175bp και 309bp.



Εικόνα 3.5.2.1: Τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI

3.6 Ανίχνευση των πολυμορφισμών του γονιδίου p16

3.6.1 Ενίσχυση τμήματος 181bp στο εξώνιο 3 του γονιδίου p16

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p16 οφείλονται στην αλλαγή του νουκελοτιδίου κυτοσίνη σε γουανίνη στη θέση 540 (C540G) και στην αλλαγή του νουκλεοτιδίου κυτοσίνη σε θυμίνη στη θέση 580 (C580T). Η ανίχνευση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε μέσω PCR-RFLP. Πιο συγκεκριμένα, ένα τμήμα μήκους 181bp στο εξώνιο 3 του γονιδίου p16 ενισχύθηκε μέσω PCR με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών p16 F 5'-GATGTGCCACACATCTTTGACCT-3' / p16 R 5'-CTACGAAAGCGGGGTGGGTTGT -3'. Μετά το τέλος της PCR, τα ενισχυμένα τμήματα υποβλήθηκαν σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού MspI και HaeIII.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 50pmol εκκινητικών μορίων (25pmol από τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (DreamTaq buffer), περιεκτικότητας 2mM MgCl₂, 1mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 1,5 Units DreamTaq DNA πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης στους 62°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 40 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Αμέσως μετά την PCR, τα ενισχυμένα τμήματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος ήταν επιτυχής.

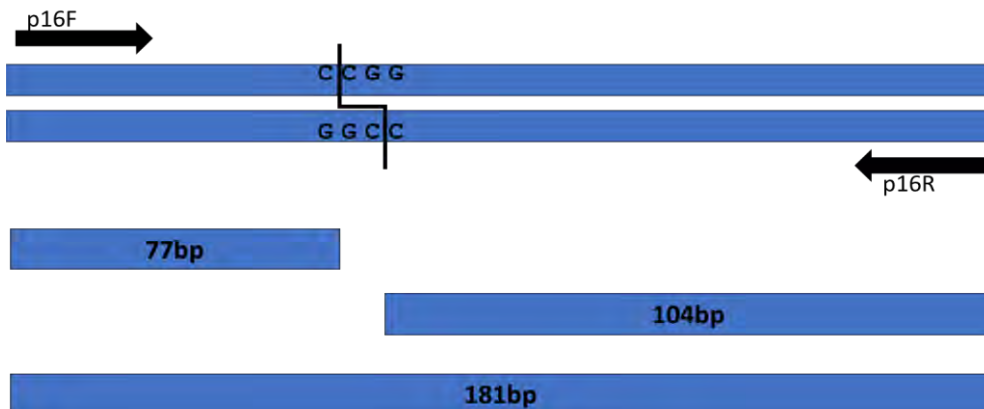
3.6.2 Πέψη των ενισχυμένων τμημάτων

Την ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων δειγμάτων, ακολούθησε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού MspI και HaeIII. Ανάλογα με την ένταση της ζώνης που έδωσε καθένα από τα ανωτέρω δείγματα, εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα πέψης.

Η αντίδραση πέψης για τα δείγματα που έδωσαν έντονη ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 8μl DNA από τα ενισχυμένα δείγματα, 1X ρυθμιστικού διαλύματος CutSmart buffer, 10U ενζύμου περιορισμού MspI και ddH₂O έως 25μl. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 37°C. Μετά την επώαση, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 5μl 10X loading buffer, προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση πέψης. Τέλος, ακολούθησε διαχωρισμός των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να καθοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν. Το ίδιο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε και για το ένζυμο HaeIII.

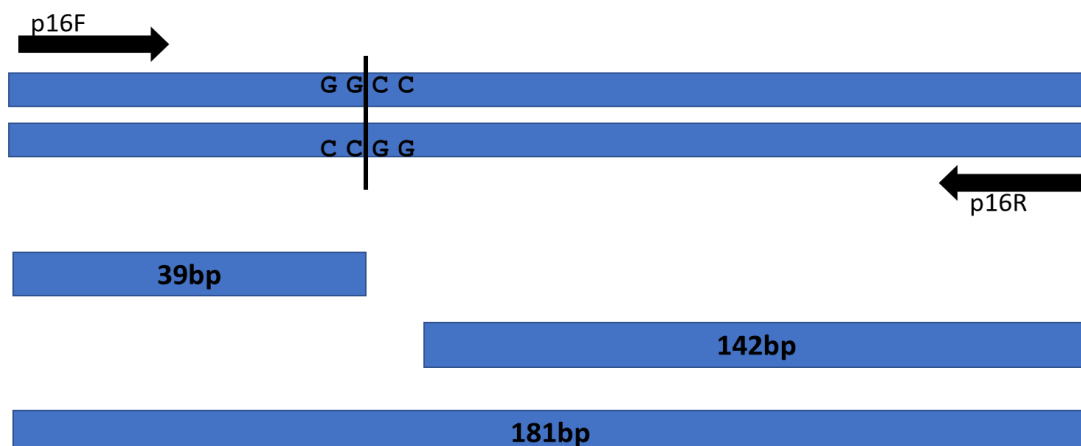
Όσον αφορά στα δείγματα που έδωσαν αχνή ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση, η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 20μl DNA από τα ενισχυμένα δείγματα, 1X ρυθμιστικού διαλύματος CutSmart buffer, 10U ενζύμου περιορισμού MspI και ddH₂O μέχρι 25μl. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 37°C. Μετά την επώαση, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 5μl 10X loading buffer, προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση πέψης. Τέλος, ακολούθησε διαχωρισμός των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, προκειμένου να καθοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν. Το ίδιο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε και για το ένζυμο περιορισμού HaeIII.

Ανάλογα με τον πολυμορφισμό που φέρουν τα δείγματα στη θέση 540 του εξωνίου 3 στο γονίδιο p16, αναμένονται και διαφορετικού μεγέθους τμήματα μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI. Το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{CCGG} \dots 3'$ και $3' \dots \text{GGCC} \dots 5'$ κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων C, δίνοντας κατά την ηλεκτροφόρηση δύο τμήματα μεγέθους 104bp και 77bp, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6.2.1. Στην περίπτωση που στη θέση 540 του εξωνίου 3 του γονιδίου p16 το νουκλεοτίδιο C έχει μετατραπεί σε G, τότε το ένζυμο δεν κόβει την αλληλουχία κι έτσι κατά την ηλεκτροφόρηση προκύπτει ένα τμήμα μεγέθους 181bp. Τέλος, στην περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία τμήματα μεγέθους 77bp, 104bp και 181bp.



Εικόνα 3.6.2.1: Τα τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI

Ανάλογα με τον πολυμορφισμό που φέρουν στη θέση 580 του εξωνίου 3 στο γονίδιο p16 αναμένονται και διαφορετικού μεγέθους τμήματα μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού HaeIII. Το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...GGCC...3' και κόβει 3'...CCGG...5' μεταξύ των νουκλεοτιδίων G και C, δίνοντας κατά την ηλεκτροφόρηση δύο τμήματα μεγέθους 142bp και 39bp, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6.2.2. Στην περίπτωση που στη θέση 580 του εξωνίου 3 του γονιδίου p16 το νουκλεοτίδιο C έχει μετατραπεί σε T, τότε το ένζυμο δεν κόβει την αλληλουχία κι έτσι προκύπτει ένα τμήμα μεγέθους 181bp. Τέλος, στην περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία τμήματα μεγέθους 39bp, 142bp και 181bp.



Εικόνα 3.6.2.2: Τα τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού HaeIII

3.7 Στατιστική ανάλυση

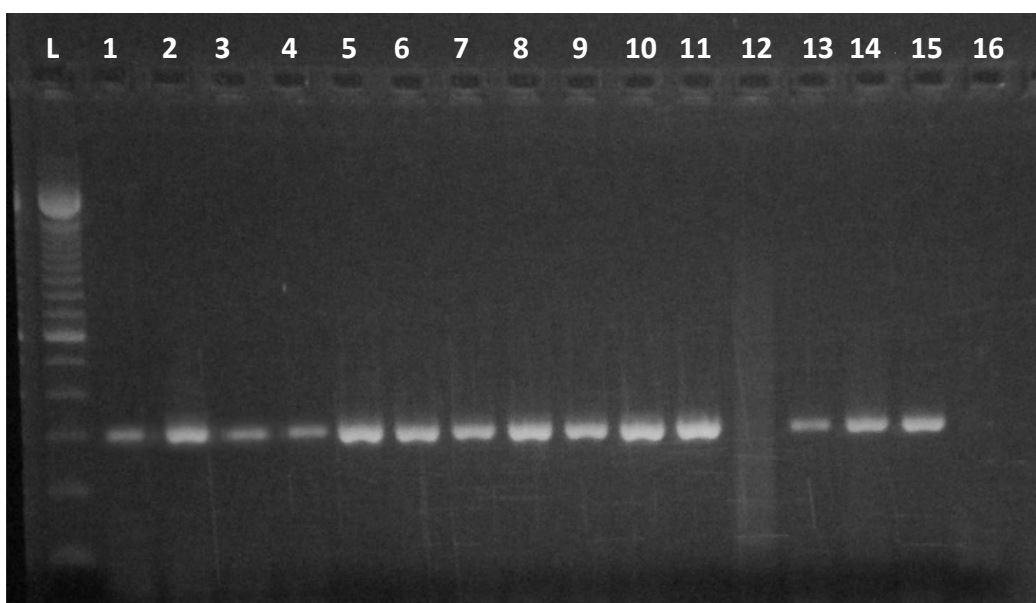
Η συσχέτιση τόσο του πολυμορφισμού στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p53, όσο και των πολυμορφισμών στις θέσεις 540 και 580 του εξωνίου 3 στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p16 με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εκφράστηκε ως πιθανότητα (odds ratio, OR) με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του τεστ χ^2 , με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism version 4.00 for Windows, (GraphPad Software, San Diego, CA). Όλα τα τεστ ήταν two-tailed και η τιμή p-value 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν στον πολυμορφισμό του γονιδίου p53

4.1.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης του γονιδίου p53 με PCR

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.5, προκειμένου να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν τα δείγματα στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p53, πραγματοποιήθηκε αρχικά ενίσχυση με PCR ενός τμήματος μήκους 309bp που εντοπίζεται στο εξόνιο 4 του συγκεκριμένου γονιδίου, με τη χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητικών μορίων. Μετά το πέρας της PCR, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος ήταν επιτυχής. Ενδεικτικά, στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 4.1.1.1) φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR σε 15 από τα 74 δείγματα, με τον μάρτυρα μοριακού βάρους να επιβεβαιώνει την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος.

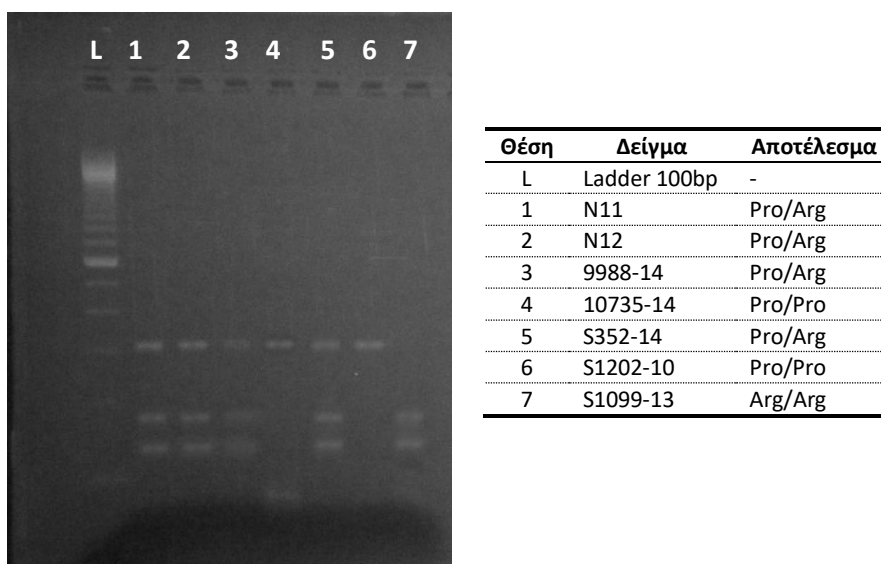


Εικόνα 4.1.1.1: Ενίσχυση τμήματος μήκους 309bp στο γονίδιο της p53. Στην εικόνα παρατηρείται η ενίσχυση του τμήματος 309bp, που αντιστοιχεί σε τμήμα του εξωνίου 4 του γονιδίου της p53. L: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, 1-15: θετικά δείγματα, 16: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας

4.1.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης

Την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI. Όπως έχει αναφερθεί, το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{CGCG} \dots 3'$ και $3' \dots \text{GCGC} \dots 5'$ κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων G και C, δίνοντας δύο τμήματα μεγέθους 134bp και 175bp.

Κατά την πέψη, χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα των δειγμάτων, ανάλογα με την ένταση της ζώνης που έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως αυτή φαίνεται στην εικόνα 4.1.1.1. Μόλις η αντίδραση πέψης έλαβε τέλος, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, προκειμένου να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν. Στην εικόνα 4.1.2.1 φαίνονται η σειρά των δειγμάτων, όπως ακριβώς αυτά φορτώθηκαν στις ειδικές θέσεις του gel ηλεκτροφόρησης, καθώς και ο διαχωρισμός των δειγμάτων μετά την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 4.1.2.1: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI

Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στο κωδικόνιο 72, όπου το νουκλεοτίδιο G μετατρέπεται σε C, με αποτέλεσμα το αμινοξύ Arg να μετατρέπεται σε Pro. Επομένως, μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI αναμένονται τα εξής αποτελέσματα: αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο G στο κωδικόνιο 72, οπότε και κωδικοποιείται το αμινοξύ Arg, τότε κατά την πέψη θα προκύψουν δύο τμήματα μήκους 134bp και 175bp. Αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο C στο κωδικόνιο 72, οπότε και κωδικοποιείται το αμινοξύ Pro, τότε προκύπτει ένα τμήμα μήκους 309bp, ενώ αν το δείγμα είναι ετερόζυγο τότε προκύπτουν τρία τμήματα μήκους 134bp, 175bp και 309bp. Με βάση τα παραπάνω και τα

αποτελέσματα της εικόνας 4.1.2.1, γίνεται φανερό ότι το δείγμα στη θέση 7 του gel είναι ομόζυγο για την Arg, τα δείγματα στις θέσεις 4 και 6 είναι ομόζυγα για την Pro, ενώ τα δείγματα στις θέσεις 1-3 και 5 είναι ετερόζυγα. Στον πίνακα 4.1.2.1 φαίνονται συνολικά τα δείγματα ταξινομημένα ανάλογα με τον βαθμό δυσπλασίας και τον πολυμορφισμό που φέρουν για το γονίδιο p53.

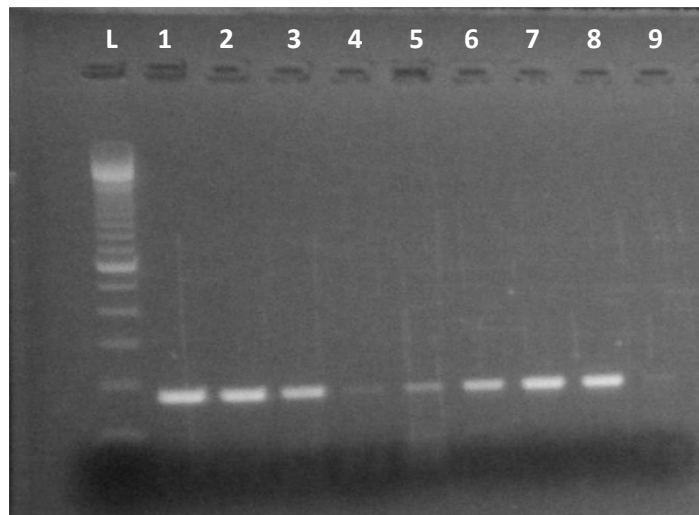
Πίνακας 4.1.2.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αλληλομόρφων των δειγμάτων που προέκυψαν έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BstUI

HSIL		LSIL		NORMAL	
ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ
ΠΝΛ5	Arg/Pro	A17	Arg/Pro	N1	Arg/Arg
ΠΝΛ7	Arg/Arg	A24	Arg/Arg	N2	Arg/Arg
ΠΝΛ9	Arg/Pro	ATT1	Arg/Arg	N3	Arg/Arg
ΠΝΛ11	Arg/Arg	ATT8(124)	Arg/Arg	N4	Arg/Arg
ΠΝΛ13	Arg/Arg	ATT8	Arg/Arg	N5	Arg/Arg
ATT5	Arg/Pro	ATT12	Arg/Pro	N6	Arg/Arg
ATT9	Arg/Arg	ATT13	Pro/Pro	N8	Arg/Pro
ATT16	Arg/Pro	ATT98	Arg/Pro	N10	Arg/Arg
ATT80	Arg/Arg	s92-17	Arg/Pro	N11	Arg/Pro
A3	Arg/Arg	s102-17	Arg/Arg	N12	Arg/Pro
Δ16	Arg/Pro	s1213-4	Arg/Arg	S352-14	Arg/Pro
Δ63	Arg/Pro	2121	Arg/Pro	S1099-13	Arg/Arg
Δ64	Arg/Pro	2127	Arg/Pro	S1177-14	Arg/Arg
Δ65	Arg/Arg	2148	Arg/Pro	S1202-10	Pro/Pro
Δ66	Arg/Arg	2209	Arg/Pro	9988-14	Arg/Pro
s386-17	Arg/Pro	2290	Arg/Pro	10696-14	Arg/Arg
s1220-14	Pro/Pro	9969-14	Arg/Arg	10730-14	Pro/Pro
s1225-14	Pro/Pro	9972-14	Arg/Arg	10735-14	Pro/Pro
s1426-14	Arg/Arg	9983-14	Arg/Arg		
s2186-14	Arg/Arg	10021-14	Arg/Pro		
9974-14	Arg/Arg	10030-14	Arg/Arg		
9981-14	Arg/Arg	10644-14	Arg/Pro		
9992-14	Arg/Arg	10693-14	Pro/Pro		
10000-14	Arg/Arg	10715-14	Pro/Pro		
10029-14	Arg/Arg	10720-14	Arg/Pro		
10036-14	Pro/Pro				
10647-14	Arg/Pro				
10658-14	Arg/Arg				
10713-14	Pro/Pro				
10732-14	Arg/Arg				

4.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν στους πολυμορφισμούς στις θέσεις 540 και 580 του γονιδίου p16

4.2.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης του γονιδίου p16 με PCR

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.6, προκειμένου να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν τα δείγματα στις θέσεις 540 και 580 του εξωνίου 3 στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p16, πραγματοποιήθηκε αρχικά ενίσχυση με PCR ενός τμήματος μήκους 181bp, με τη χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητικών μορίων. Μετά το πέρας της PCR, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος ήταν επιτυχής. Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 4.2.1.1) επιβεβαιώνεται η επιτυχία της PCR, με τον μάρτυρα μοριακού βάρους να επιβεβαιώνει την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος.



Εικόνα 4.2.1.1: Ενίσχυση τμήματος μήκους 181bp στο γονίδιο της p16

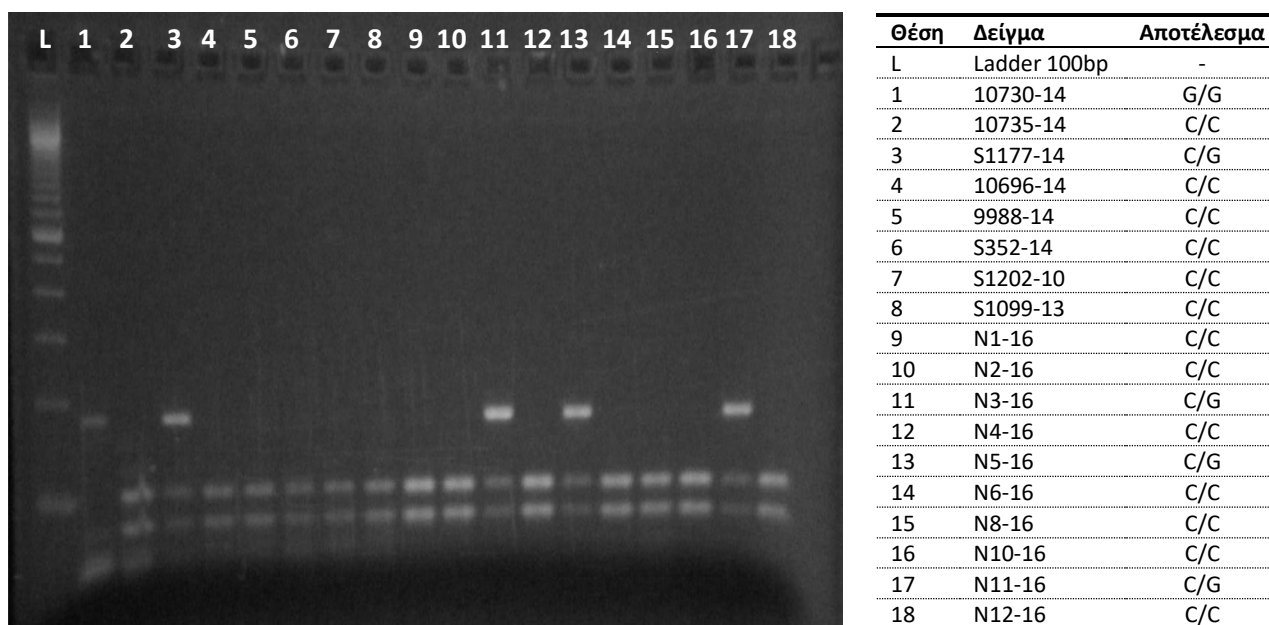
4.2.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης με το ένζυμο MspI

Την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολούθησε αρχικά πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI. Όπως έχει αναφερθεί, το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία
5'...CCGG...3'
3'...GGCC...5'

και κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων C, δίνοντας δύο τμήματα μήκους 77bp και 104bp.

Κατά την πέψη, χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα των δειγμάτων, ανάλογα με την ένταση της ζώνης που έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως αυτή φαίνεται στην εικόνα 4.2.1.1. Μόλις η αντίδραση πέψης έλαβε τέλος, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, προκειμένου να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν στη θέση 540 του εξωνίου 3. Στην εικόνα 4.2.2.1 φαίνονται η

σειρά των δειγμάτων, όπως ακριβώς αυτά φορτώθηκαν στις ειδικές θέσεις του gel ηλεκτροφόρησης, καθώς και ο διαχωρισμός των δειγμάτων μετά την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 4.2.2.1: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI

Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στη θέση 540 του εξωνίου 3, όπου το νουκλεοτίδιο C μετατρέπεται σε G. Επομένως, μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI αναμένονται τα εξής αποτελέσματα: αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο C, τότε κατά την πέψη θα προκύψουν δύο τμήματα μήκους 77bp και 104bp. Αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο G, τότε προκύπτει ένα τμήμα μήκους 181bp, ενώ αν το δείγμα είναι ετερόζυγο τότε προκύπτουν τρία τμήματα μήκους 77bp, 104bp και 181bp. Με βάση τα παραπάνω και τα αποτελέσματα της εικόνας 4.2.2.1, γίνεται φανερό ότι τα δείγματα στις θέσεις 2, 4-10, 12, 14-16 και 18 του gel είναι ομόζυγα για το νουκλεοτίδιο C, το δείγμα στη θέση 1 είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο G, ενώ τα δείγματα στις θέσεις 3, 11, 13 και 17 είναι ετερόζυγα. Στον πίνακα 4.2.2.1 φαίνονται συνολικά τα δείγματα ταξινομημένα ανάλογα με τον βαθμό δυσπλασίας και τον πολυμορφισμό που φέρουν στη θέση 540 του εξωνίου 3 στο γονίδιο p16.

Πίνακας 4.2.2.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του πολυμορφισμού C540G των δειγμάτων που προέκυψαν έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI

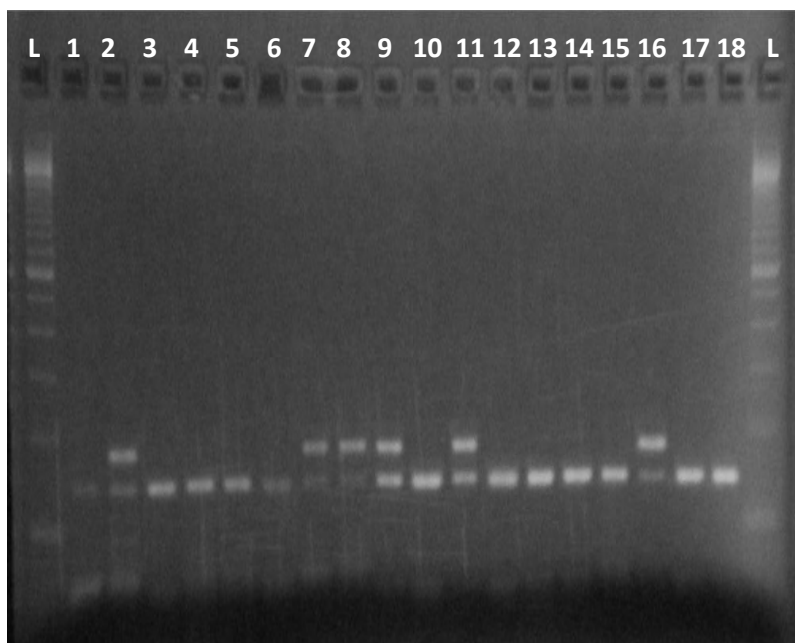
HSIL		LSIL		NORMAL	
ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ
ΠΝΛ5	C/G	A17	C/C	N1	C/C
ΠΝΛ7	C/C	A24	C/C	N2	C/C
ΠΝΛ9	G/G	ATT1	C/C	N3	C/G
ΠΝΛ11	C/C	ATT8(124)	C/C	N4	C/C
ΠΝΛ13	C/G	ATT8	C/C	N5	C/G
ATT5	C/G	ATT12	C/C	N6	C/C
ATT9	C/C	ATT13	C/C	N8	C/C
ATT16	C/G	ATT98	C/C	N10	C/C
ATT80	G/G	s92-17	C/C	N11	C/G
A3	C/C	s102-17	C/C	N12	C/C
Δ16	C/C	s1213-4	C/C	S352-14	C/C
Δ63	C/G	2121	C/C	S1099-13	C/C
Δ64	C/C	2127	C/C	S1177-14	C/G
Δ65	C/C	2148	C/G	S1202-10	C/C
Δ66	C/C	2209	C/G	9988-14	C/C
s386-17	C/G	2216	G/G	10696-14	C/C
s1220-14	C/C	2290	C/G	10730-14	G/G
s1225-14	G/G	9969-14	C/C	10735-14	C/C
s1426-14	C/G	9972-14	C/G		
s2186-14	C/C	9983-14	C/C		
9974-14	C/C	10021-14	C/G		
9981-14	C/C	10030-14	G/G		
9992-14	C/C	10644-14	C/C		
10000-14	C/C	10693-14	C/C		
10029-14	C/C	10715-14	C/C		
10036-14	C/C	10720-14	C/C		
10647-14	C/C				
10658-14	C/C				
10713-14	G/G				
10732-14	C/C				

4.2.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης με το ένζυμο HaeIII

Μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού MspI, τα δείγματα υποβλήθηκαν εκ νέου σε πέψη με το ένζυμο HaeIII. Το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{GGCC} \dots 3'$
 $3' \dots \text{CCGG} \dots 5'$
και κόβει μεταξύ των νουκλεοτιδίων G και C, δίνοντας κατά την ηλεκτροφόρηση δύο τμήματα μεγέθους 39bp και 142bp.

Κατά την πέψη, χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα των δειγμάτων, ανάλογα με την ένταση της ζώνης που έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως αυτή φαίνεται στην εικόνα 4.2.1.1. Μόλις η αντίδραση πέψης έλαβε τέλος, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, προκειμένου να προσδιοριστεί ο

πολυμορφισμός που έφεραν στη θέση 580 του εξωνίου 3. Στην εικόνα 4.2.3.1 φαίνεται η σειρά των δειγμάτων, όπως ακριβώς αυτά φορτώθηκαν στις ειδικές θέσεις του gel ηλεκτροφόρησης, καθώς και ο διαχωρισμός των δειγμάτων μετά την ηλεκτροφόρηση.



Θέση	Δείγμα	Αποτέλεσμα
L	Ladder 100bp	-
1	10730-14	C/C
2	10735-14	C/T
3	S1177-14	C/C
4	10696-14	C/C
5	9988-14	C/C
6	S352-14	C/C
7	S1202-10	C/T
8	S1099-13	C/T
9	N1-16	C/T
10	N2-16	C/C
11	N3-16	C/T
12	N4-16	C/C
13	N5-16	C/C
14	N6-16	C/C
15	N8-16	C/C
16	N10-16	C/T
17	N11-16	C/C
18	N12-16	C/C
L	Ladder 100bp	-

Εικόνα 4.2.3.1: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού HaeIII

Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στη θέση 580 του εξωνίου 3, όπου το νουκλεοτίδιο C μετατρέπεται σε T. Επομένως, μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού HaeIII αναμένονται τα εξής αποτελέσματα: αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο C, τότε κατά την πέψη θα προκύψουν δύο τμήματα μήκους 39bp και 142bp. Αν το δείγμα είναι ομόζυγο για το νουκλεοτίδιο T, τότε προκύπτει ένα τμήμα μήκους 181bp, ενώ αν το δείγμα είναι ετερόζυγο τότε προκύπτουν τρία τμήματα μήκους 39bp, 142bp και 181bp. Με βάση τα παραπάνω και τα αποτελέσματα της εικόνας 4.2.3.1, γίνεται φανερό ότι τα δείγματα στις θέσεις 1, 3-6, 10, 12-15, 17 και 18 του gel είναι ομόζυγα για το νουκλεοτίδιο C, ενώ τα δείγματα στις θέσεις 2, 7-9, 11 και 16 είναι ετερόζυγα. Στον πίνακα 4.2.3.1 φαίνονται συνολικά τα δείγματα ταξινομημένα ανάλογα με τον βαθμό δυσπλασίας και τον πολυμορφισμό που φέρουν στη θέση 580 του εξωνίου 3 στο γονίδιο p16.

Πίνακας 4.2.3.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του πολυμορφισμού C580T των δειγμάτων που προέκυψαν έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού HaeIII

HSIL		LSIL		NORMAL	
ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ
ΠΝΛ5	C/T	A17	C/C	N1	C/T
ΠΝΛ7	C/C	A24	C/C	N2	C/C
ΠΝΛ9	C/C	ATT1	C/C	N3	C/T
ΠΝΛ11	C/C	ATT8(124)	C/C	N4	C/C
ΠΝΛ13	C/C	ATT8	C/C	N5	C/C
ATT5	C/C	ATT12	C/C	N6	C/C
ATT9	C/T	ATT13	C/C	N8	C/C
ATT16	C/T	ATT98	C/C	N10	C/T
ATT80	C/C	s92-17	C/C	N11	C/C
A3	C/C	s102-17	C/C	N12	C/C
Δ16	C/C	s1213-4	C/C	S352-14	C/C
Δ63	C/C	2121	C/C	S1099-13	C/T
Δ64	C/C	2127	C/C	S1177-14	C/C
Δ65	C/C	2148	C/C	S1202-10	C/T
Δ66	C/T	2209	C/T	9988-14	C/C
s386-17	C/T	2216	C/C	10696-14	C/C
s1220-14	C/T	2290	C/T	10730-14	C/C
s1225-14	C/C	9969-14	C/C	10735-14	C/T
s1426-14	C/C	9972-14	T/T		
s2186-14	C/C	9983-14	C/C		
9974-14	C/T	10021-14	C/C		
9981-14	C/C	10030-14	C/C		
9992-14	C/T	10644-14	C/C		
10000-14	C/C	10693-14	C/C		
10029-14	C/C	10715-14	C/C		
10036-14	C/C	10720-14	C/C		
10647-14	C/C				
10658-14	C/C				
10713-14	T/T				
10732-14	C/C				

4.2.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη συσχέτιση των πολυμορφισμών που εντοπίζονται στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες p53 και p16 με τον κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού (HSIL) και χαμηλού (LSIL) βαθμού δυσπλασιών στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δειγμάτων HSIL και LSIL με τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για τον ιό HPV16 αλλά δεν έφεραν αλλοιώσεις στο επιθήλιο (normal). Επομένως, τα δείγματα normal αποτελούν τα δείγματα αναφοράς (control) με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BstUI, MspI και HaeIII έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική σύνδεση μεταξύ των συγκεκριμένων πολυμορφισμών που εντοπίζονται στα γονίδια p53 και p16 με τον βαθμό αλλοίωσης του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στον πολυμορφισμό Arg72Pro που εντοπίζεται στο γονίδιο της p53, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση αυτού με την εμφάνιση υψηλού (HSIL) και χαμηλού (LSIL) βαθμού δυσπλασιών στο επιθήλιο, όταν τα δείγματα που φέρουν αυτού του βαθμού τις δυσπλασίες συγκρίνονται με τα δείγματα control. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και για τον πολυμορφισμό C540G που εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p16.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, διαφορετικά ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τον πολυμορφισμό C580T που εντοπίζεται στο γονίδιο p16. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πέψης έδειξε ότι οι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο C/C έχουν 4,87 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LSIL), όταν τα δείγματά τους συγκρίνονται με τα δείγματα αναφοράς, φαινόμενο που είναι στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση του φαινοτύπου C/C με τον κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού δυσπλασίας, παρόλο που οι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο C/C έχουν 1,48 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης HSIL, όταν τα δείγματά τους συγκρίνονται με τα control.

Τέλος, έγινε ομαδοποίηση των δειγμάτων που φέρουν χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες σε μια ομάδα LSIL⁺. Με βάση αυτή την ομαδοποίηση βρέθηκε ότι οι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο C/C έχουν 2,33 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης LSIL⁺ αλλοίωσης, όταν τα δείγματά τους συγκρίνονται με τα δείγματα αναφοράς, αλλά και σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί (Zur Hausen, 1996). Το γονιδιώμά τους περιέχει 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNAs που μεταγράφονται από τον έναν κλώνο DNA (Zheng, 2006). Ανάλογα με τη θέση τους στο γονιδίωμα, τα ORFs διακρίνονται σε πρώιμα που κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 και σε όψιμα, που κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 (Danos et al., 1982). Τέλος, το γονιδίωμα τους περιλαμβάνει και μια περιοχή που ονομάζεται LCR, η οποία εμπλέκεται τόσο στην αντιγραφή όσο και τη μεταγραφή του γονιδιώματος του ιού (Hebner, 2006).

Οι HPVs ταξινομούνται σε 5 γένη, με το κάθε γένος να ταξινομείται επιμέρους σε υπότυπους με βάση την ομοιότητα που παρατηρείται στην αλληλουχία του γονιδίου L1. Από τους διαφορετικούς αυτούς υπότυπους, κάποιοι προκαλούν καλοήθεις όγκους και χαρακτηρίζονται ως χαμηλού κινδύνου (low-risk), ενώ άλλοι ευθύνονται για κακοήθεις νεοπλασίες και χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου (high-risk) (Doorbar, 2006, Bosch et al., 2008, Bernard et al., 2010, Ekström et al., 2011).

Ο ιός ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης του κυττάρου του ξενιστή. Ο κύκλος ζωής του ξεκινά στα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στιβάδας και ολοκληρώνεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων (Zheng, 2006, Buck et al., 2004). Στα κύτταρα της βασικής στιβάδας επάγεται αρχικά η έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Καθεμία από αυτές έχει έναν σημαντικό ρόλο για την διεκπεραίωση των βασικών σταδίων του κύκλου αντιγραφής του ιού. Πιο συγκεκριμένα, οι E1 και E2 συγκροτούν το σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του γονιδιώματος (Liu, 1995). Οι E6 και E7 αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες p53 και pRB αντίστοιχα, εξασφαλίζοντας την επιβίωση και συνεχή ανάπτυξη και διαφοροποίηση των μολυσμένων κυττάρων (Pim et al., 2010, Fu et al., 2010, Roman, 2006, Barrow et al., 2010). Εκτός από τον ρόλο της στην αντιγραφή, η E2 συνδέεται στην περιοχή LCR, δίνοντας το σήμα για την έναρξη της μεταγραφής των δομικών πρωτεϊνών, προκειμένου να συγκροτηθούν τα νέα ιικά σωματίδια (Bouvard et al., 1994). Η συγκρότηση των ιικών σωματίων λαμβάνει χώρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, όπου ολοκληρώνεται και ο κύκλος ζωής του ιού με την απελευθέρωση αυτών (Buck et al., 2004).

Μέσα στο κύτταρο ο ιός μπορεί να βρίσκεται σε επισωματική μορφή, ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του ξενιστή ή και στις δύο ανωτέρω μορφές (Andersson et al., 2005). Όταν ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή, ο κύκλος ζωής του ξεκινά από τα αδιαφοροποίητα

κύτταρα της βασικής στιβάδας και ολοκληρώνεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω. Αντίθετα, η ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή επιφέρει κρίσιμες για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του αλλαγές (Cricca et al., 2009). Η ενσωμάτωση οφείλεται συνήθως σε διάρρηξη του γονιδίου E2. Αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης είναι η μερική καταστροφή των γονιδίων E2 και L2, καθώς και η απώλεια των γονιδίων E4 και E5. Λόγω της καταστροφής του γονιδίου E2, δε δίνεται το σήμα για την ολοκλήρωση της πρώιμης φάσης του κύκλου αντιγραφής του ιού και την έναρξη της όψιμης φάσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7. Τα αυξημένα επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τελικά στον μετασχηματισμό των κυττάρων του ξενιστή (Arias Pulido et al., 2006).

Η μόλυνση με HPV μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων επιθηλιακών καρκίνων, με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας να εμφανίζεται πιο συχνά σε ένα μεγάλο μέρος του γυναικείου πληθυσμού (Zur Hausen, 1996, Jemal, 2011). Η εμφάνιση του καρκίνου είναι προοδευτική και περιλαμβάνει αρχικά την εμφάνιση επιθηλιακών αλλοιώσεων που οφείλονται σε αντικατάσταση των κυττάρων των ανώτερων στιβάδων από κύτταρα της βασικής στιβάδας και τελικά την εκδήλωση του διηθητικού καρκίνου (Solomon et al., 2012). Για την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, εκτός από την αυξημένη έκφραση των γονιδίων E6 και E7, ευθύνεται και το γενετικό υπόβαθρο των γυναικών (Moschonas et al., 2017, Tsakogiannis et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί τρεις πολυμορφισμοί που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Ο πρώτος εντοπίζεται στο εξώνιο 4 του γονιδίου της p53 και σχετίζεται με τη μετατροπή του νουκλεοτιδίου G σε C, με αποτέλεσμα να κωδικοποιείται από το κωδικόνιο 72 η προλίνη αντί της αργινίνης. Οι άλλοι δυο εντοπίζονται στις θέσεις 540 και 580 του εξωνίου 3 στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την p16, όπου η κυτοσίνη μετατρέπεται σε γουανίνη και θυμίνη αντίστοιχα (C540G και C580T) (Moschonas et al., 2017, Tsakogiannis et al., 2017). Οι τρεις αυτοί πολυμορφισμοί μελετήθηκαν σε δείγματα Ελληνίδων γυναικών, τα οποία είτε έφεραν υψηλού και χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις στο επιθήλιο του τραχήλου είτε δεν έφεραν αλλοιώσεις παρόλο που είχαν βρεθεί θετικά για μόλυνση με HPV.

Για τη μελέτη των παραπάνω πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 74 δείγματα, τα οποία προέρχονταν από βιοψίες τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη, από τραχηλικά επιχρίσματα και από ThinPrep και συλλέχθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο “Άγιος Σάββας”, το

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών “ΑΤΤΙΚΟΝ” και ένα ιδιωτικό κυτταροπαθολογικό εργαστήριο. Τα δείγματα αυτά χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τον βαθμό αλλοίωσης του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Έτσι, συνολικά εξετάστηκαν 30 δείγματα που έφεραν υψηλού βαθμού δυσπλασίες(HSIL), 26 με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες(LSIL) και 18 τα οποία δεν έφεραν αλλοιώσεις στο επιθήλιο(normal), παρόλο που είχαν βρεθεί θετικά για μόλυνση με HPV16.

Κατά την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων, αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους 309bp και 181bp που εντοπίζονται στα γονίδια p53 και p16 αντίστοιχα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της PCR και κατόπιν τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, προκειμένου να καθοριστεί ο πολυμορφισμός που έφεραν. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ενίσχυση τμήματος μεγέθους 309bp που εντοπίζεται στο γονίδιο p53, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο BstUI. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και μετά την ενίσχυση τμήματος μεγέθους 181bp που εντοπίζεται στο γονίδιο p16, με τα δείγματα να υποβάλλονται σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού MspI και HaeIII με στόχο τον καθορισμό των πολυμορφισμών που έφεραν στις θέσεις C540G και C580T. Ο πολυμορφισμός που έφεραν τα δείγματα επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης, που πραγματοποιήθηκε μετά την πέψη των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά τις πέψεις με τα παραπάνω ένζυμα περιορισμού υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση, προκειμένου να καθοριστεί αν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού που φέρουν με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης, τα δείγματα που δεν φέρουν αλλοιώσεις αλλά είναι θετικά για τον HPV χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς (control) και συγκρίθηκαν με τα δείγματα που φέρουν υψηλού και χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις στο επιθήλιο του τραχήλου.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τον πολυμορφισμό Arg72Pro που εντοπίζεται στο γονίδιο της p53 έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική σύνδεση αυτού με τον κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού και χαμηλού βαθμού δυσπλασιών, γεγονός που συνεπάγεται ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και για τον πολυμορφισμό C540T που εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p16.

Αντίθετα, όσον αφορά στον πολυμορφισμό C580T που εντοπίζεται στο ίδιο γονίδιο, τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (LSIL). Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο CC έχουν 4,87 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης LSIL, όταν τα δείγματά τους συγκρίνονται με τα δείγματα αναφοράς. Επιπλέον, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σύνδεση του φαινοτύπου CC με τον κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού δυσπλασίας, παρόλο που οι γυναίκες που φέρουν τον φαινότυπο CC έχουν 1,48 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης HSIL, όταν τα δείγματά τους συγκρίνονται με τα control.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αποτελέσματα που έχουν προκύψει από στατιστική ανάλυση των ίδιων πολυμορφισμών σε διαφορετικούς πληθυσμούς γυναικών. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τον πολυμορφισμό Arg72Pro στις Ελληνίδες γυναίκες, έρχονται σε αντίθεση με αυτά που αφορούν στους υπόλοιπους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, καθώς οι γυναίκες που είναι ομόζυγες για την αργινίνη εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης δυσπλασιών στο επιθήλιο του τραχήλου (Storey et al., 1998). Συσχέτιση του ίδιου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου έχει βρεθεί και σε Κινέζες γυναίκες ομόζυγες για την προλίνη (Li B et al., 2015), ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα με τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό έχουν προκύψει και για πληθυσμούς γυναικών από την κεντρική και βόρεια Αφρική, το Μαρόκο, την Ταϊλάνδη και την ανατολική Ασία, με τον πολυμορφισμό Arg72Pro να μην εμφανίζει συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (El Khair et al., 2010, Assoumou SZ et al., 2015, Zhou X et al., 2012).

Όσον αφορά στα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους πολυμορφισμούς C540G και C580T στις Ελληνίδες γυναίκες, αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αφορούν στον ινδικό γυναικείο πληθυσμό, καθώς έχει βρεθεί ότι σε γυναίκες που φέρουν το νουκλεοτίδιο G στη θέση 540 και το νουκλεοτίδιο T στη θέση 580 του εξωνίου 3, είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση, υπάρχει προστασία έναντι του καρκίνου (Thakur N et al., 2012). Διαφορετικά ήταν τα αποτελέσματα στις γυναίκες της Βραζιλίας, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, όταν φέρουν το νουκλεοτίδιο G στη θέση 540 και το νουκλεοτίδιο T στη θέση 580 του εξωνίου 3 είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση (Vargas-Torres et al., 2014). Τέλος, στον γυναικείο πληθυσμό της Ταϊλάνδης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σύνδεση των πολυμορφισμών C540G και C580T με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (Chansaenroj et al., 2013).

Συμπερασματικά, από τα δείγματα που αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας πτυχιακής εργασίας προκύπτει ότι ενώ δεν υπάρχει συσχέτιση των πολυμορφισμών Arg72Pro και C540G με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, οι γυναίκες που είναι ομόζυγες για το νουκλεοτίδιο C στη θέση 580 του εξωνίου 3 του γονιδίου που κωδικοποιεί για την p16 έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης χαμηλού βαθμού δυσπλασιών στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, απαιτούνται αναλύσεις σε ένα μεγαλύτερο και άρα περισσότερο αντιπροσωπευτικό δείγμα του ελληνικού γυναικείου πληθυσμού, ώστε να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα.

6. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B (2005) Type distribution, viral load and integration state of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 92:2195–2200.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 44:1755–1762.
- Artandi SE, Attardi LD (2005) Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331:881-890.
- Assoumou SZ, Boumba ALM, Ndjoyi-Mbiguino A, Khattabi A, Ennaji MM (2015) The preliminary study of p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in gabonese women. *Med Oncol* 32:281.
- Barrow-Laing L, Chen W, Roman A (2010) Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology* 400:233–239.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70–79.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N (2008) Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26: K1–K17.
- Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P (2003) Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 77:3846-3850.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* 13:5451-5459.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78:751-757.
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 53:25-36.
- Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, et al. (2013) Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16(rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) genes in Thai cervical cancer patients with HPV 16 infection. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:341–346.
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2009) Disruption of HPV16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods* 158:180–183.
- D'Abramo CM, Archambault J (2011) Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J* 5:80-95.
- Danos O, Katinka M, Yaniv M (1982) Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1:231–236.

- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525–541.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life - cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 5: F55-70.
- Ekström J, Bzhalava D, Svenback D, Forslund O, Dillner J (2011) High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer* 129:2643–2650.
- El Khair MM, Ennaji MM, El Kebbjaj R, Mhand RA, Attaleb M et al. (2010) p53 Codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in moroccan women. *Med Oncol* 27:861-866.
- Fu L, Van Doorslaer K, Chen Z, Ristriani T, Masson M, Travé G, et al (2010) Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS One* e12816.
- Hebner CM, Laimins LA (2006) Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16: 83-97.
- Insera P, Abrahamsen M, Papenfuss M, Giuliano AR (2003) Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS* 14:800–804.
- Howley P, Schiller J, Lowy D (2013) Papillomaviruses, in Knipe DM, Howley PM (Eds.) *Fields Virology*, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
- Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83:2067–2074.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy RD, Schiller TJ (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12180–12184.
- Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D (2004) Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol*. 72:478-483.
- Li B, Wang X, Chen H, Shang LX, Wu N (2015) TP53 codon 72 polymorphism and susceptibility to cervical cancer in the Chinese population: an update meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8: 9055–9062.
- Liu J.S, Kuo SR, Broker TR, Chow LT (1995) The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 270:27283-272891.
- McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J (2010) E1–E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123:2810–2822.
- Moschonas GD, Tsakogiannis D, Lamprou KA, Mastora E, Dimitriou TG, Kyriakopoulou Z, Kottaridi C, Karakitsos P, Markoulatos P (2017) Association of codon 72 polymorphism of p53 with the severity of cervical dysplasia, E6-T350G and HPV16 variant lineages in HPV16-infected women. *J Med Microbiol* 66:1358–1365.

- Nguyen CL, Munger K (2008) Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology*. 380:21–25.
- Pim D, Banks L (2010) Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS* 118:471–493.
- Puranen M, Saarikski S, Syrjanen K and Syrjanen S (1996) Polymerase chain reaction amplification of human papillomavirus DNA from archival Papanicolaou-stained cervical smears. *ACTA Cytol* 40: 391–395.
- Roman A (2005) The human papillomavirus E7 protein shines a spotlight on the pRB family member, p130. *Cell Cycle* 5:567–568.
- Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, et al. (2012) Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog* 8: e1002657.
- Sedman J, Stenlund A. (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* 72:6893-9897.
- Settheetham-Ishida W, Singto Y, Yuenyao P, Tassaneeyakul W, Kanjanavirojkul N et al. (2004) Contribution of epigenetic risk factors but not p53 Codon 72 polymorphism to the development of cervical Cancer in Northeastern Thailand. *Cancer Lett* 210:205–211.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R (2003) Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 77:13125-13135.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114-2119.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D et al. (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393:229–234.
- Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF, Bharadwaj M (2012) Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Mol Biol Rep* 39:407–414.
- Tsakogiannis D, Moschonas GD, Bella E, Kyriakopoulou Z, Amoutzias GD, Dimitriou TG, Kottaridi C, Markoulatos P (2017) Association of p16 (CDKN2A) polymorphisms with the development of HPV16-related precancerous lesions and cervical cancer in the Greek population. *J Med Virol* 90:965-971
- Tsakogiannis D, Diamantidou V, Toska E, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG et al (2015) Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Arch Virol* 160:207–214.
- Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (2002) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New-York, San Diego.
- Vargas-Torres SL, Portari EA, Klumb EM, et al. (2014) Association of CDKN2A polymorphisms with the severity of cervical neoplasia in a Brazilian population. *Biomarkers* 19:121–127.

- Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S (2001) Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749.
- Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation. *Front Biosci* 11:2286-2302.
- Zhou X, Gu Y, Zhang SL (2012) Association between p53 codon 72 polymorphism and cervical cancer risk among Asians: a huge review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:4909–4914.
- Zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288: F55-78.