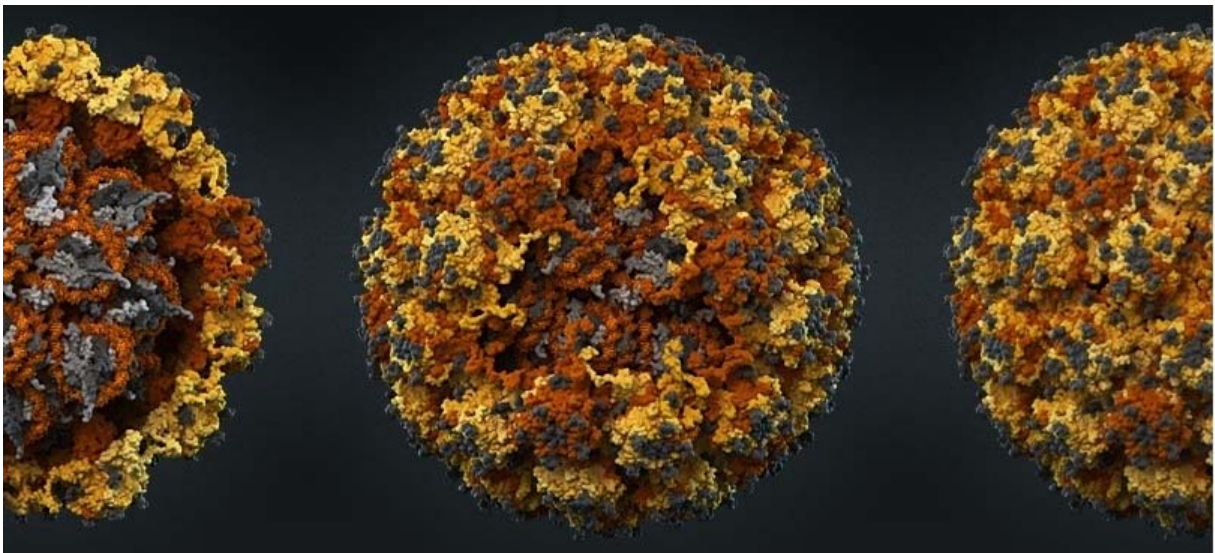


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ HPV-16, ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ
ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**



Περίληψη

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

Η "επίμονη" υψηλού βαθμού αλλοίωση συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα και την πρόοδο της αλλοίωσης σε καρκίνο. Η ενσωμάτωση του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα αποσταθεροποιεί την έκφραση των γονιδίων E6 και E7. Το γεγονός αυτό δίνει την δυνατότητα στον ιό να διεγείρει έντονα τον κυτταρικό κύκλο και την διαρκή είσοδο του κυττάρου στη φάση της μίτωσης, δίνοντας στα μολυσμένα κύτταρα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα. Σε δεύτερη φάση μετά τον συνεχή πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων προκαλείται συσσώρευση γενετικών λαθών και αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος του ξενιστή με αποτέλεσμα την δημιουργία καρκινικών αλλοιώσεων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του γονιδιώματος του HPV16, ενώ παράλληλα επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της μορφής του γονιδιώματος του ιού και ο προσδιορισμός των θέσεων ενσωμάτωσης του HPV16 στο κυτταρικό χρωμόσωμα.. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας που απομονώθηκαν από τον Ελληνικό πληθυσμό, θετικά για μόλυνση με τον ιό. Η νουκλεοτιδική και φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το πρότυπο στέλεχος του HPV16 καθώς και η Ευρωπαϊκή παραλλαγή του γονιδιώματος του ιού επικρατούν στον Ελληνικό πληθυσμό, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ότι μη Ευρωπαϊκές παραλλαγές του HPV16 DNA κυκλοφορούν στον Ελληνικό πληθυσμό.

Ακόμη εντοπίστηκαν καινούργιες μεταλλάξεις εντός των γονιδίων E1, E2, E4, E6 και E7 που δεν έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς επίσης και φαινόμενα διπλασιασμού και ενδοτυπικού ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών παραλλαγών του HPV16 DNA. Τέλος, οι διαφορετικές περιοχές της πρώιμης περιοχής του γονιδιώματος του HPV16 DNA εξελίσσονται με διαφορετικό τρόπο και αυτό ίσως να σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες που επιτελούν οι ιικές πρωτεΐνες στο κύκλο ζωής του ιού.

Παράλληλα, προσδιορίστηκε η μορφή του HPV16 DNA, χαρτογραφώντας τις πιο συχνές θέσεις ρήξης του ιικού DNA. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε, ότι η ενσωμάτωση του HPV16 είναι ένα φαινόμενο το οποίο συμβαίνει νωρίς στο κύκλο ζωής του ιού. Τέλος, από τον προσδιορισμό των θέσεων ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα εντοπίστηκαν φαινόμενα αναδιάταξης του HPV16 DNA προτείνοντας ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο ενσωματωμένα μόρια DNA σε μορφή αλυσομερών HPV16 DNA - κυτταρικό DNA έρχονται σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό και ανασυνδυάζονται μεταξύ τους μέσω μιας δομής θηλιάς. Το φαινόμενο αυτό προκαλεί διαρκώς αποσταθεροποίηση του κυτταρικού χρωμοσώματος, γεγονός που δηλώνει, ότι ακόμη και μετά την ενσωμάτωση του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα ο ιός συνεχίζει να προκαλεί διαρκώς φαινόμενα αποσταθεροποίησης του κυτταρικού DNA. Συμπερασματικά, η χαρτογράφηση των συνηθέστερων θέσεων ρήξης των E1 και E2 γονιδίων σε συνδυασμό με τη νουκλεοτιδική ανάλυση των γονιδίων E1, E2 και E6 του HPV16 και τον προσδιορισμό γεγονότων αναδιάταξης του HPV16 DNA θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη για τον προσδιορισμό της μορφής του γονιδιώματος των διαφορετικών HPV16 στελεχών και της περαιτέρω κατανόησης των γεγονότων τα οποία εμπλέκουν τον HPV16 στην ογκογένεση.