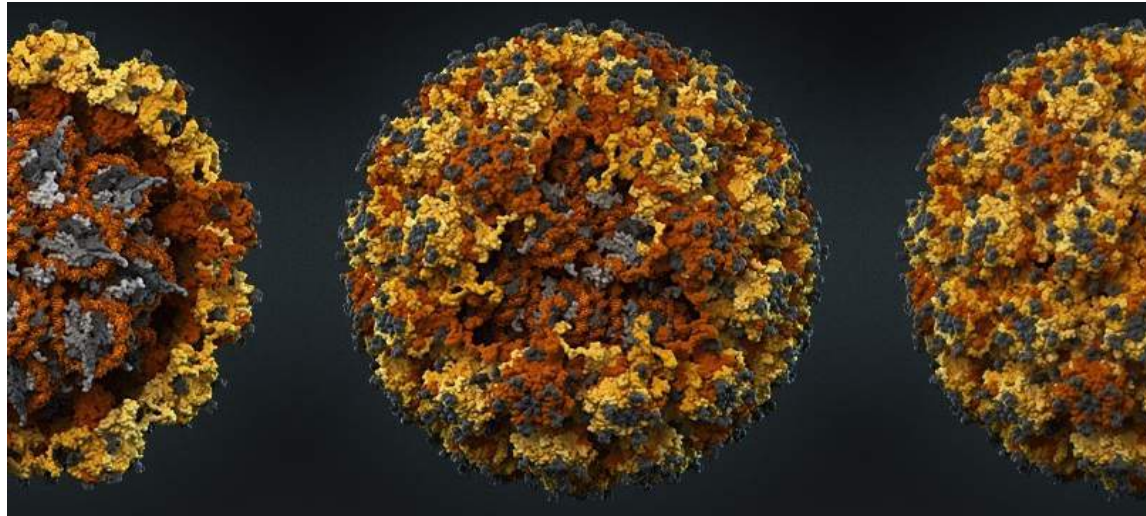




**ΕΛΛΗΝΙΚΟ  
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ**  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ & ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ

## **HPV λοίμωξη: φυσική ιστορία, μοριακή διάγνωση και έρευνα**

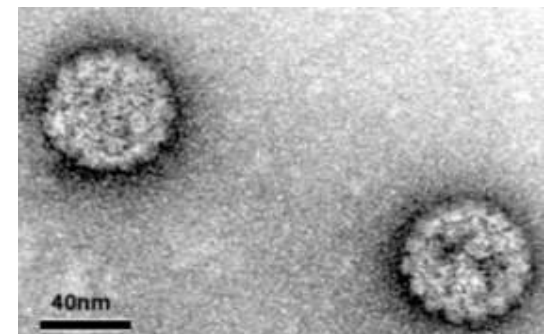
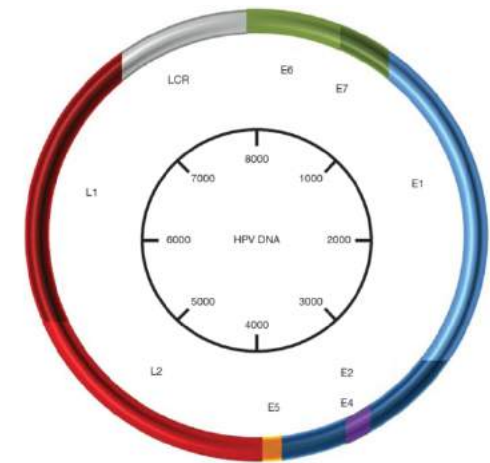
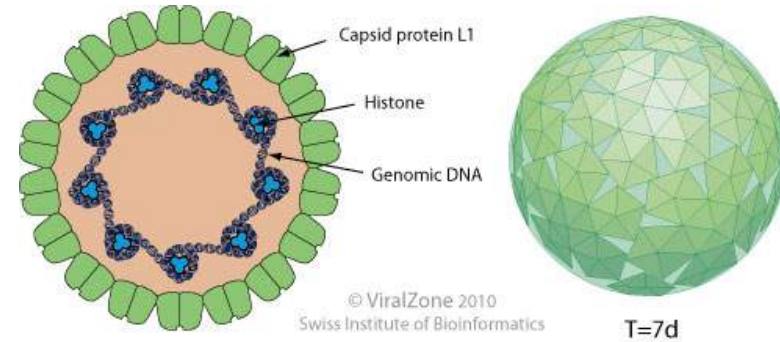


**ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ, M.Sc, Ph.D**

**Ερευνητής - Μοριακός Ιολόγος, Ελληνικό Αντικαρκινικό  
Ινστιτούτο**

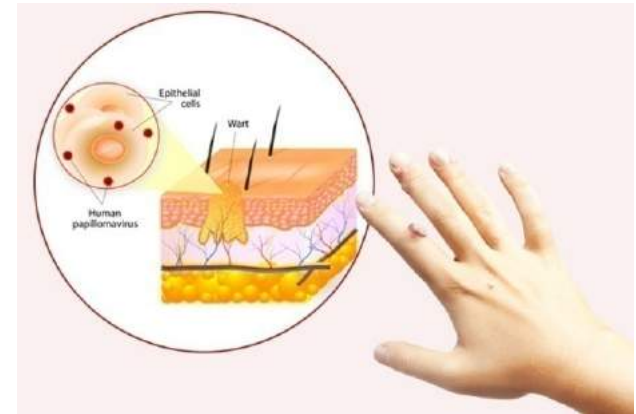
# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

- Συγκροτούν την οικογένεια των Papillomaviridae
- Δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί
- Μεγέθους 8000 bp
- Χωρίς εξωτερικό περίβλημα
- Έχουν διάμετρο της τάξης των 50-60 nm
- Προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου του βλεννογόνου, επιθηλίου του δέρματος
- Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο
- 60 τύποι έχουν απομονωθεί από τα ζώα
- 150 τύποι έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο (HPV)



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

- Τα θηλώματα ήταν γνωστά από την εποχή του Ιπποκράτη (460-377 Π.Χ)
- Η ιϊκή φύση των ανθρώπινων θηλωμάτων προσδιορίστηκε το 1907 (Ciuffo, 1907)
- Φιλτράρισμα κοινών θηλωμάτων και μόλυνση υγιών ατόμων
- Δημιουργία νέων θηλωμάτων
- Πέρασαν σχεδόν 40 χρόνια μέχρι να απομονωθεί η μικροκρυσταλλική δομή του ιού (Strauss et al., 1949)





# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

- Δερματικά θηλώματα σε κουνέλια (Shope, 1933)
- Κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα τα οποία μετατρέπονταν σε κακοήθεις όγκους
- Φιλτράρισμα όγκων
- Μεταφορά σε οικόσιτους υγιείς λαγούς, οι οποίοι ανέπτυξαν τις ίδιες αλλοιώσεις
- Shope Papillomavirus ή CRPV (cottontail rabbit papillomavirus)

## INFECTIOUS PAPILLOMATOSIS OF RABBITS

By RICHARD E. SHOPE, M.D.

WITH A NOTE ON THE HISTOPATHOLOGY

By E. WESTON HURST, M.D.

(From the Department of Animal and Plant Pathology of The Rockefeller Institute for Medical Research, Princeton, N. J.)

PLATES 33 TO 35

(Received for publication, July 19, 1933)

Our attention was recently called to a disease occurring in wild cottontail rabbits in northwestern Iowa.<sup>1</sup> Rabbits shot there by hunters were said to have numerous horn-like protuberances on the skin over various parts of their bodies. The animals were referred to popularly as "horned" or "warty" rabbits.

Warts from a naturally occurring case of the disease in Iowa were obtained and sent to the laboratory in sterile 50 per cent glycerol. These glycerolated warts furnished us our original material for investigation. A little later, in a shipment of a dozen wild cottontail rabbits from southern Kansas, three were found to be affected with the same wart-like disease. To date, out of 75 wild cottontail rabbits received from Kansas eleven have been found to carry one or more warts. These eleven animals serve as the basis for our description of the naturally occurring disease.

### Description of the Naturally Occurring Disease

In wild cottontail rabbits the presence of warts has caused no apparent discomfort in our experience and induced no demonstrable evidence of generalized illness. Most of the animals were sacrificed, shortly after their arrival, for pathological material, but four, kept under observation for 7 weeks or longer, at no time appeared ill and were in good physical condition when finally killed. The number

<sup>1</sup> We are grateful to Mr. T. A. McKichan of Cherokee, Iowa, who first told us of the disease, and to Mr. Clifford Peck of Cherokee and Mr. Earl Johnson of Rago, Kansas, who furnished us with naturally occurring cases of the disease.



Richard Shope



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

Το 1935 ο Francis Peyton Rous συσχέτισε τους ιούς των Θηλωμάτων με καρκίνο του δέρματος στα μολυσμένα αυτά κουνέλια

30 χρόνια χρησιμοποιούσε θηλώματα για την πρόκληση όγκων (Rous, 1935; Rous, 1940; Rous et al., 1952)

Πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς στην πρόκληση καρκίνου στα θηλαστικά



**Francis Peyton Rous**

## THE PROGRESSION TO CARCINOMA OF VIRUS-INDUCED RABBIT PAPILOMAS (SHOPE)\*

By PEYTON ROUS, M.D., AND J. W. BEARD, M.D.

(From the Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research)

PLATES 19 TO 24

(Received for publication, June 28, 1935)

The cutaneous papillomas induced by a virus procured by Shope (1) from "cottontail" rabbits possess the traits whereby tumors are recognized (2). After they have grown for some weeks they frequently thrust processes into the tissue beneath them, sometimes entering the blood and lymph vessels. If even earlier they are transplanted to favorable situations within the host they may look and behave like epidermoid carcinomas, invading, destroying, and causing death. These observations, and the malignant aspect of sections from one of our rabbits and from one of Shope's, have led us to keep animals with actively proliferating papillomas consequent on virus inoculation, to learn whether they would become carcinomatous. This has happened in 7 domestic rabbits of 10 kept more than 200 days, while in an 8th animal a new tumor has developed of problematic malignancy. The cancers have been multiple in every animal, and metastasis has taken place in 5 of them,—to the regional lymph nodes in 4, to the retroperitoneal nodes in addition in 1, and to the lungs in a 5th instance. One cancer has been successfully transplanted.

### *Incidence of the Cancers*

The cancers have developed from the papillomas of domestic rabbits inoculated with extracts of the glycerinated growths of cottontails. Malignancy has never appeared in the latter, though 10 with induced papillomas have been under observation several months longer than the domestic rabbits. These were chosen for preservation because

\* Reported in abstract before the Society of Experimental Biology and Medicine, Jan. 16, 1935.

# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

Το 1976, ο Γερμανός Ιολόγος Harald zur Hausen δημοσίευσε ότι οι Ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (Human Papillomaviruses, HPV) εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Τα έτη 1983 και 1984 απομόνωσε τα πρώτα στελέχη HPV16 και HPV18 σε γυναίκα που με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Gissmann et al., 1984, Zur Hausen, 1996).

**Βραβείο Nobel Ιατρικής, 2008**



Harald zur Hausen

ICANDER RESEARCH 36, 794, February 1976

## Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer

Harald zur Hausen

Institut für Klinische Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg, 852 Erlangen, Loebstrasse 7, Republic of Germany

The subsequent review by Goldberg and Gravel (8) stresses the possible role of HSV-2 infections in human cervical cancer. Although seroepidemiological studies do suggest an association of HSV-2 with this type of cancer (12, 14), repeated attempts, with 1 exception (6), have failed to demonstrate viral DNA by nucleic acid hybridizations in cervical cancer cells (Refs. 19 and 21; H. Schulte-Holthausen and H. zur Hausen, unpublished data), even when assays were performed under very sensitive conditions. Although these negative results are not yet conclusive, additional arguments have been raised that do not support the HSV-2 etiology of cervical cancer (19).

It is the intention of this note to draw attention to a virus-induced and virus particle-containing tumor revealing a similar epidemiological pattern, as does cervical cancer: the genital warts or condylomata acuminata. Condylomata acuminata have been shown to contain a papilloma virus (5, 15), which appears to differ from human wart virus when tested biochemically (20) or immunologically (1). These particles can be detected by electron microscopy in about 50% of all condylomata examined (13). Attempts to grow this virus in tissue culture or to isolate it directly from condylomata have not been very successful in the past (unpublished data).

Genital warts seem to be transmitted primarily by sexual contact and are predominant in populations of high sexual promiscuity. In contrast to common warts, condylomata may become malignant (although rarely), and there exist a number of clinical observations on malignant transition of this tumor (3, 4, 7, 9-11, 15, 17). In particular, penile carcinomas have been observed to develop within or at a site of condylomata acuminata (2, 16, 18).

The condylomata agent has been entirely neglected thus far in all epidemiological and serological studies relating not only to cervical and penile, but also to vulvar and perianal, carcinomas. This is particularly unusual in view of the localization of genital warts, their mode of venereal transmission, the number of reports on malignant transition, and the presence of an agent belonging to a well-characterized group of oncogenic DNA viruses.

## References

1. Amesz, J., D. Ditt, J. B. and Stromsted, L. M. Characterization of the Virus Found in Human Genital Warts. *Microbios*, 3: 225-232, 1963.
2. Bauer, K. M., and Friedrich, H. G. Penetration auf dem Boden von kondylomatösen Condylomata acuminata. *Z. Haut-Geschlechtskrankh.*, 29: 159-162, 1963.
3. Dawson, C. F., Ockersmith, J. K., Bernstein, H., and Young, J. M. Genital Condyloma and Virulent Carcinoma of the Genital Area. *Arch. Pathol.*, 72: 225-231, 1955.
4. Dornstien, J., and Gutowski, A. Planocellular, Spinosus-like Carcinoma of the Vulva Originating from Condylomata Acuminata. *Gynecol. Gynaecol. Sci.*, 39: 239-242, 1959.
5. Dunn, A. E. G., and Ojima, M. J. Ultrastructure. *Res.*, 22: 203-204, 1968.
6. Frenkel, H., Rasmussen, B., Cases, S., and Martinez, A. J. DNA Fragment of Herpes Simplex 2 and Its Transcription in Human Cervical Cancer Tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 69: 2784-2789, 1972.
7. Friedberg, M. J., and Searle, O. Condylomata acuminata: its Association with Malignancy. *Disease Colon Rectum*, 6: 262-265, 1963.
8. Goldberg, H., and Gravel, M. A Search for Herpes Simplex Virus Type 2 Markers in Cervical Carcinoma. *Cancer Res.*, 35: 795-799, 1975.
9. Grosserstedt, F. J., and Behrer, W. Maligne Bowen bei Condylomata Acuminata (Zur Frage der Malignität Virusbedingter Tumordilatation). *Wochenschr.*, 44: 443-447, 1974.
10. Keri, H., and Finkel, H. Maligne Umwandlung von Condylomata Acuminata der Vulva. *Z. Haut-Geschlechtskrankh.*, 46: 155-162, 1971.
11. MacDonald, C. Unusual Wart Carcinoma: into a Carcinoma by Calcification. *Illness Med. J.*, 40: 290, 1921.
12. Melnick, J. L., Arvey, W. E., Nash, Z. M., Lucas, C. F., and Gwalt, B. A. Antibodies to Herpes Simplex Types 1 and 2 in Humans. II. Women with Cervical Cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 91: 547-552, 1970.
13. Oriel, J. D., and Almeida, J. D. Demonstration of Virus Particles in Human Genital Warts. *Brit. J. Venereal Diseases*, 46: 37-42, 1970.
14. Rennie, W. E., Longley, W. A. P., and Murrink, J. L. The Association of Herpesvirus Type 2 and Carcinoma of the Uterine Cervix. *Am. J. Epidemiol.*, 85: 541-554, 1965.
15. Sauge, A. Malignant Transformation of Condylomata Acuminata. *Am. J. Surg.*, 103: 413-417, 1974.
16. Sims, C. F., and Searl, J. Squam. Condylomata Acuminata of Penis Associated with Metastatic Carcinoma of Right Inguinal Lymph Node. *Arch. Dermatol. Syphilis*, 62: 182-190, 1951.
17. Sorek, C. E. Condylomata acuminata mit Übergang in Karzinom. *Z. Haut-Geschlechtskrankh.*, 46: 273-276, 1971.
18. Wolf, F. In die Tiefe wuchernde, späte Condylome und Carcinom in condylomatösen Penis-Tumoren. *Z. Haut-Geschlechtskrankh.*, 72: 142-144, 1952.
19. zur Hausen, H. Oncogenic Herpes Viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 47: 23-28, 1971.
20. zur Hausen, H., Meentof, W., Schaber, W., and Bornkamm, G. H. Attempts to Detect Virus-specific DNA Sequences in Human Tumors: I. Nucleic Acid Hybridizations with Complementary RNA of Human Wart Virus. *Intem. J. Cancer*, 13: 492-498, 1974.
21. zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Wolf, H., Dörries, K., and Egger, H. Attempts to Detect Virus-specific DNA Sequences in Human Tumors: II. Nucleic Acid Hybridizations with Complementary DNA of Human Herpes Group Viruses. *Intem. J. Cancer*, 13: 857-864, 1974.

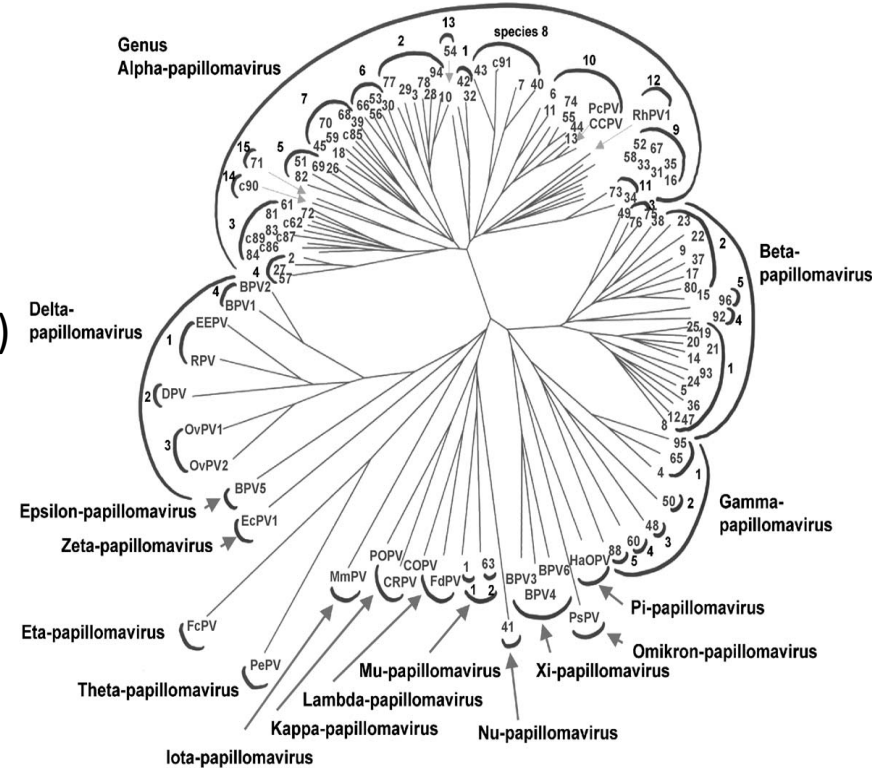


# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

## Ταξινόμηση PVs

Διαμόρφωση φυλογενετικών δέντρων με βάση:

1. Νουκλεοτιδική αλληλουχία
2. Βιολογικά χαρακτηριστικά (είδη ξενιστών, ιστός, παθογένεια, οργάνωση DNA)



## Ταξινόμηση PVs σε γένη

Το 2004 οργανώθηκαν σε γένη χρησιμοποιώντας την ελληνική αλφάβητο από το γράμμα Άλφα μέχρι το γράμμα Πι

# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

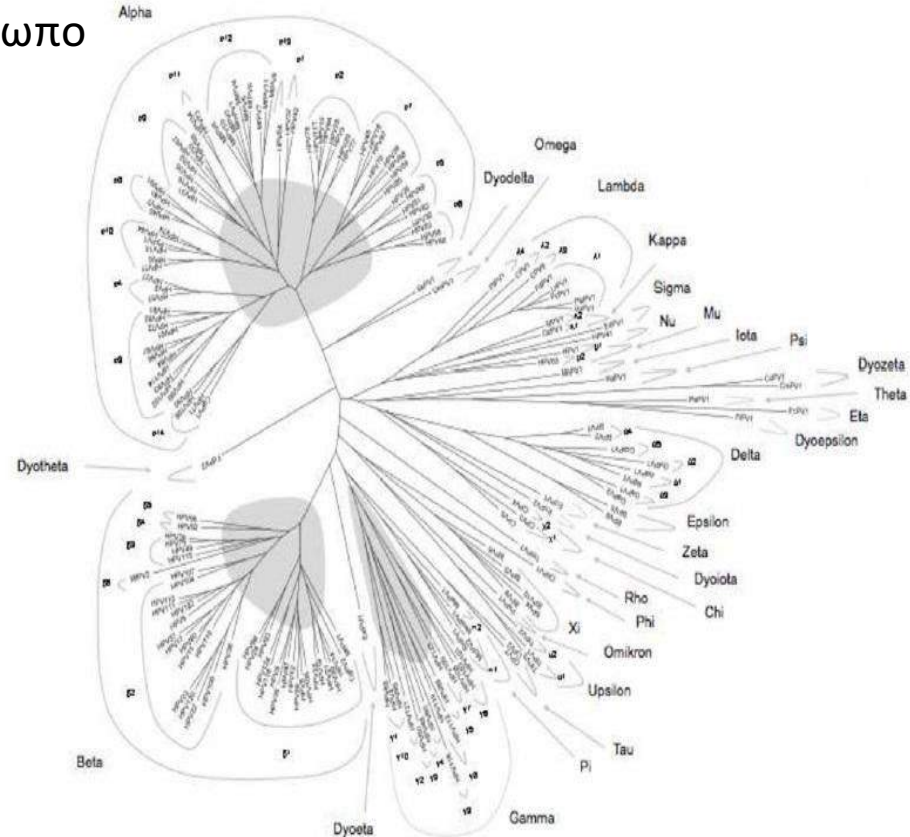
Σήμερα, η οικογένεια των Papillomaviridae χωρίζεται σε **είκοσι εννέα γένη**

1. Πέντε γένη έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο
2. Είκοσι γένη από άλλα θηλαστικά
3. Τρία γένη από πτηνά
4. Ένα γένος από ερπετά

## Ταξινόμηση με βάση το γονίδιο L1

Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει

- Διαφορετικοί τύποι >10%
- Διαφορετικές παραλλαγές 1-3%

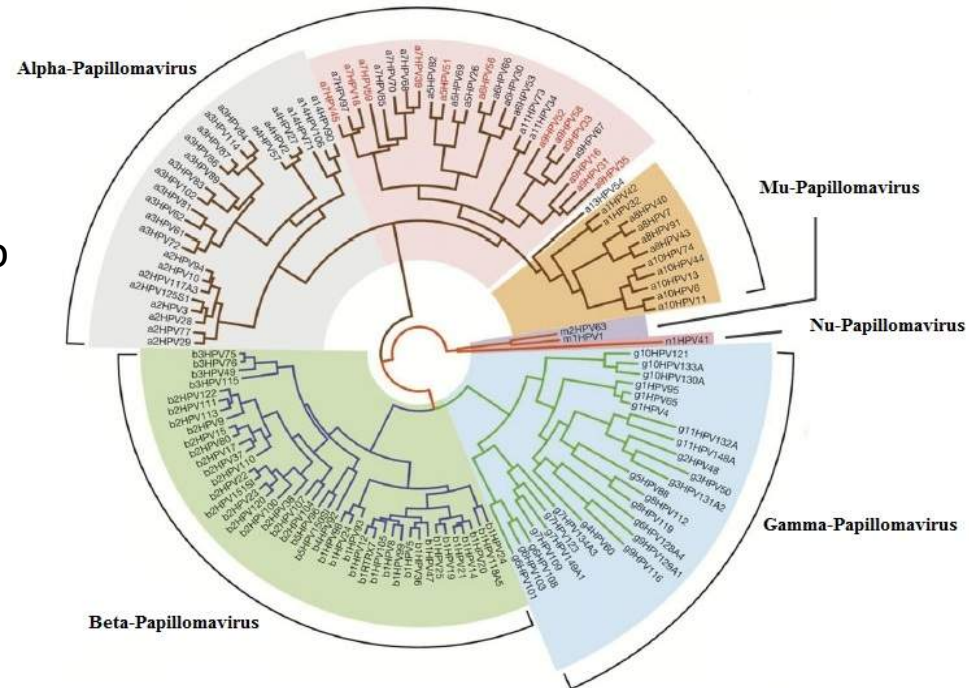




# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

## Γένος Άλφα

- 40 HPV τύποι προκαλούν αλλοιώσεις στο επιθήλιο του βλεννογόνου
- Ανάλογα με την έκταση της αλλοίωσης κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες

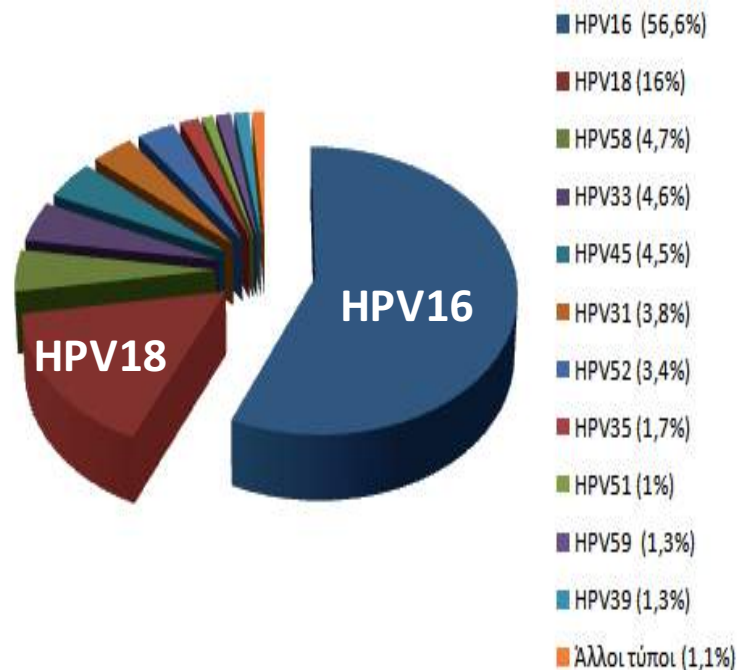


**High risk : HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83**

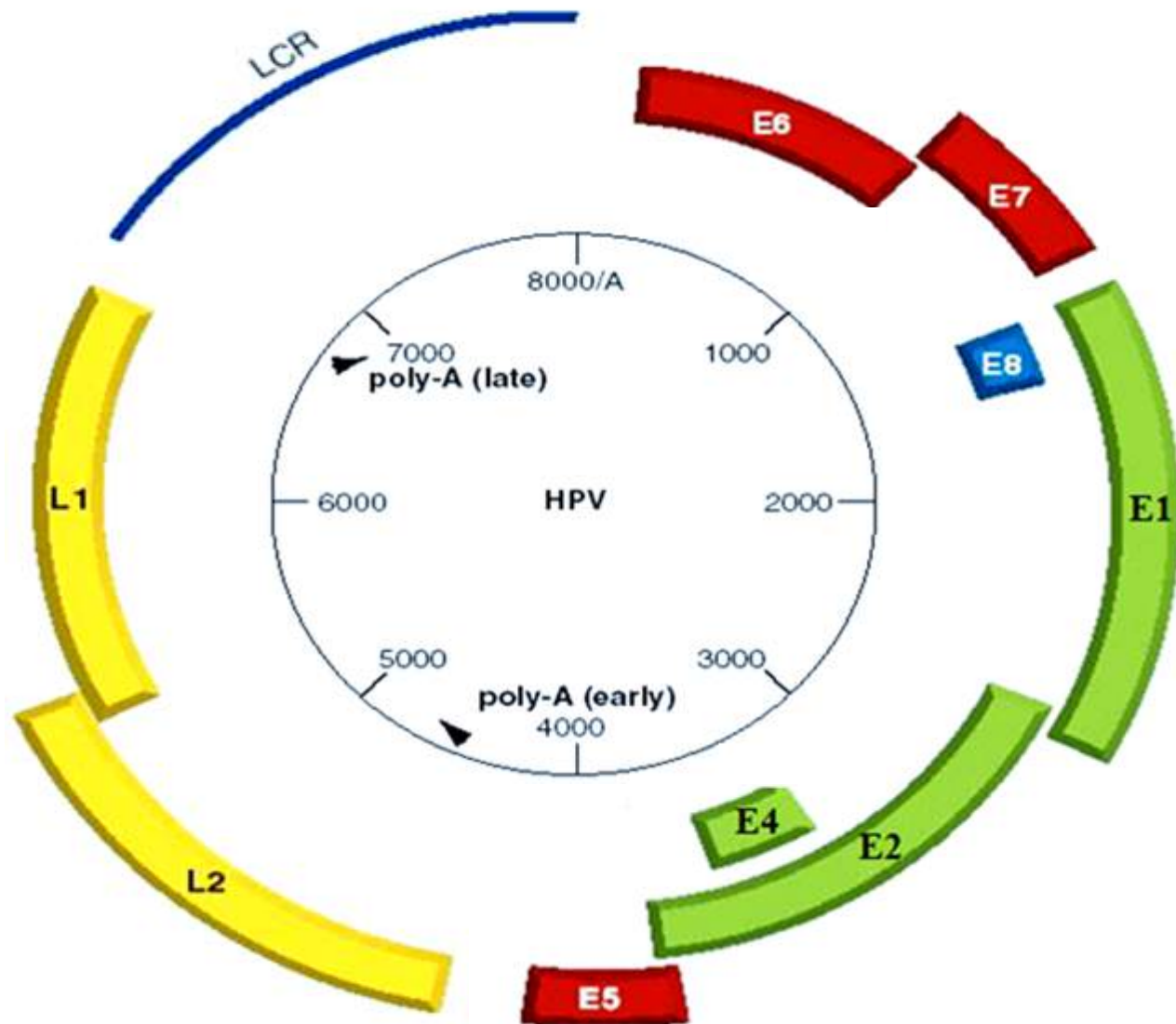
**Low risk: HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81**

# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

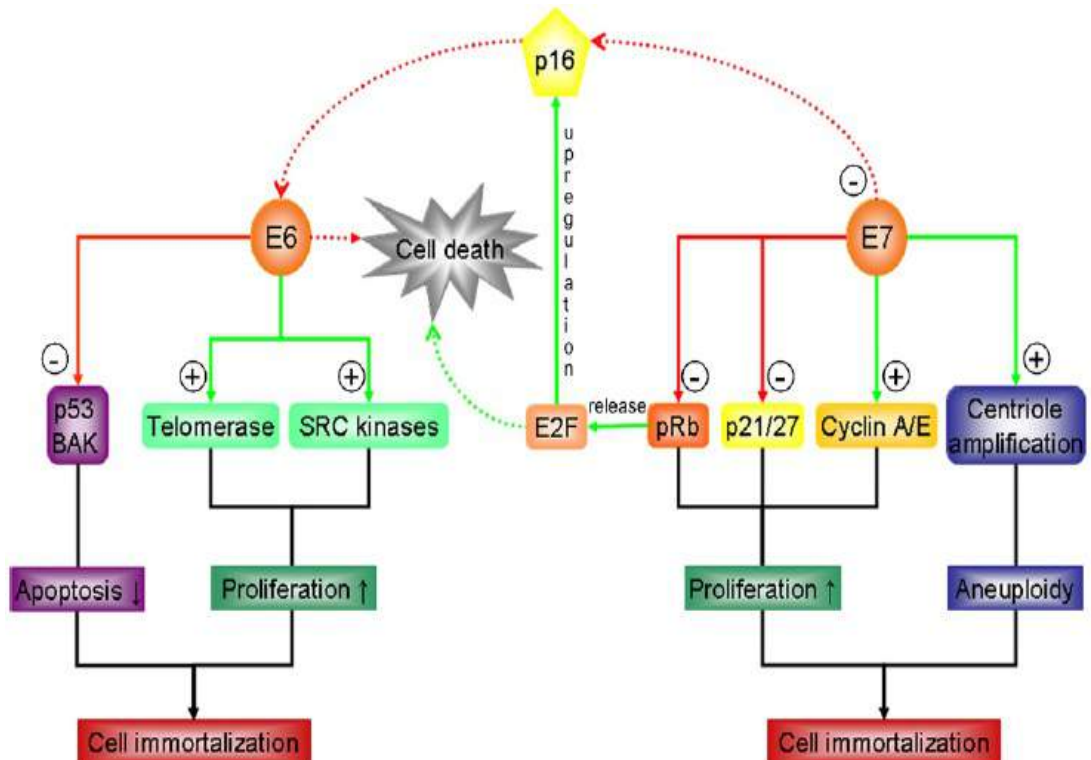
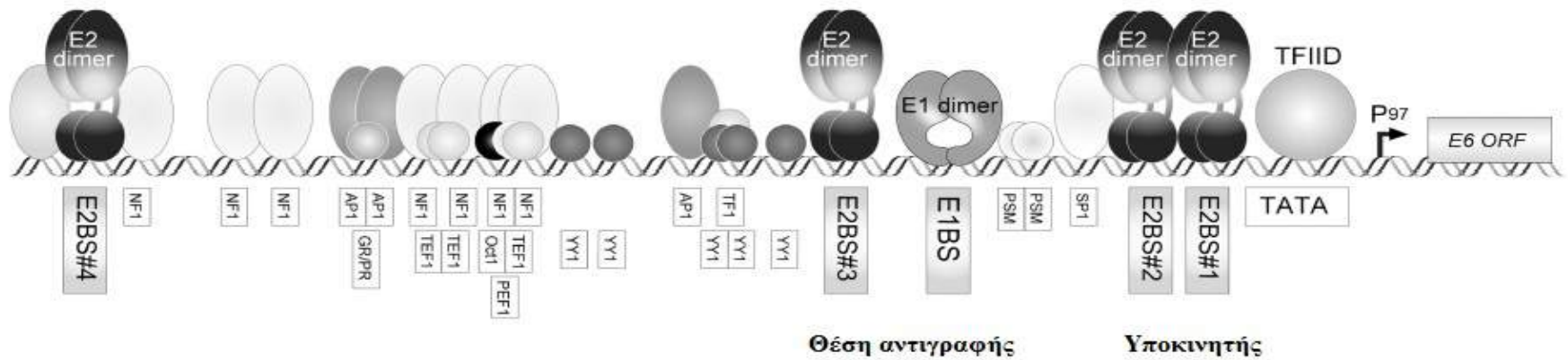
- Κυριότερο παράγοντα ανάπτυξης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας
- Τρίτη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στο γυναικείο πληθυσμό
- 270.000 θανάτους ετησίως



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)



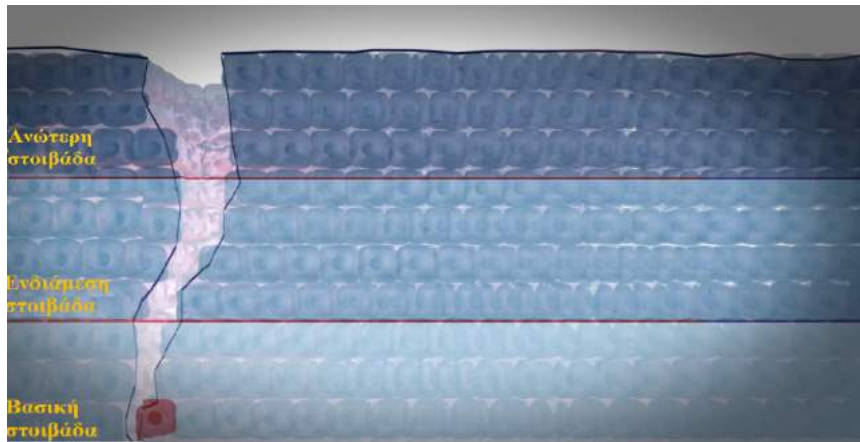
# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)



- ✓ Διεγείρει τον κυτταρικό κύκλο
- ✓ Εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)



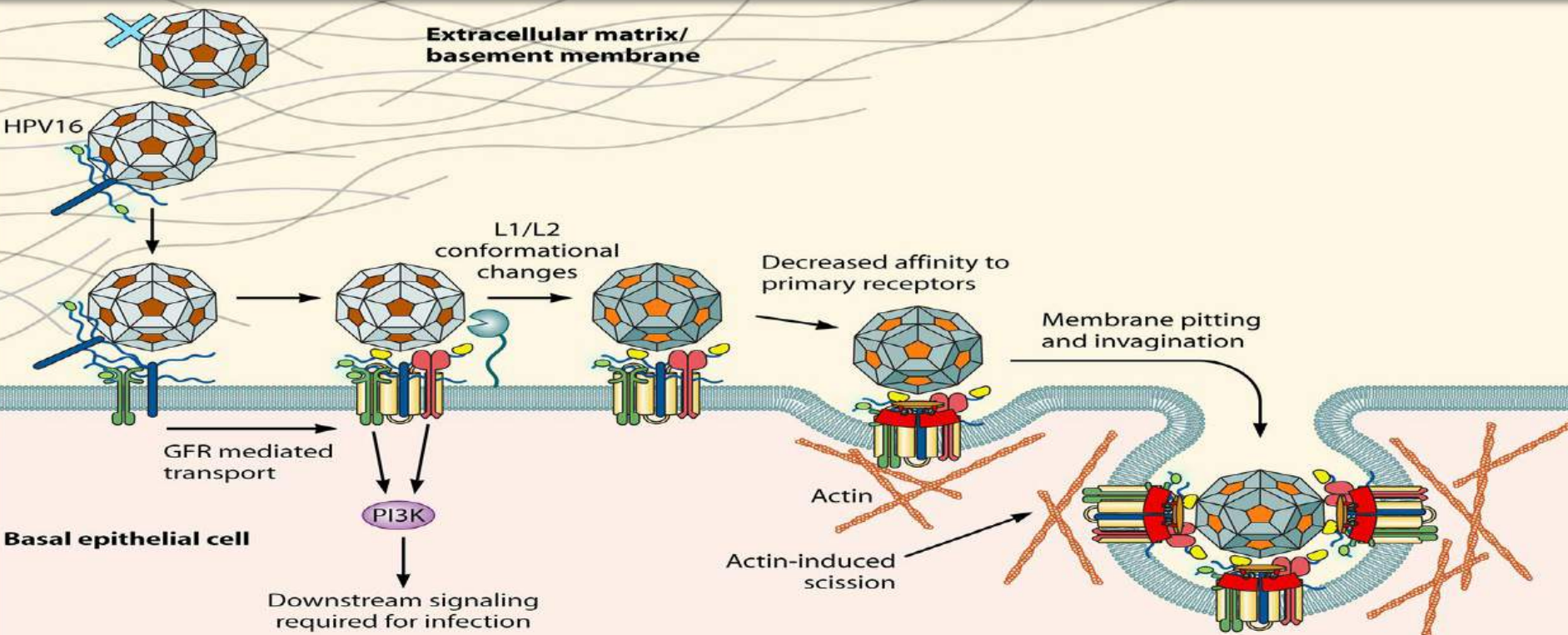
- Είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μέσω μικροτραυματισμού του επιθηλίου

- Πρόσδεση του ιού σε κυτταρικούς υποδοχείς

- HPV DNA στον πυρήνα



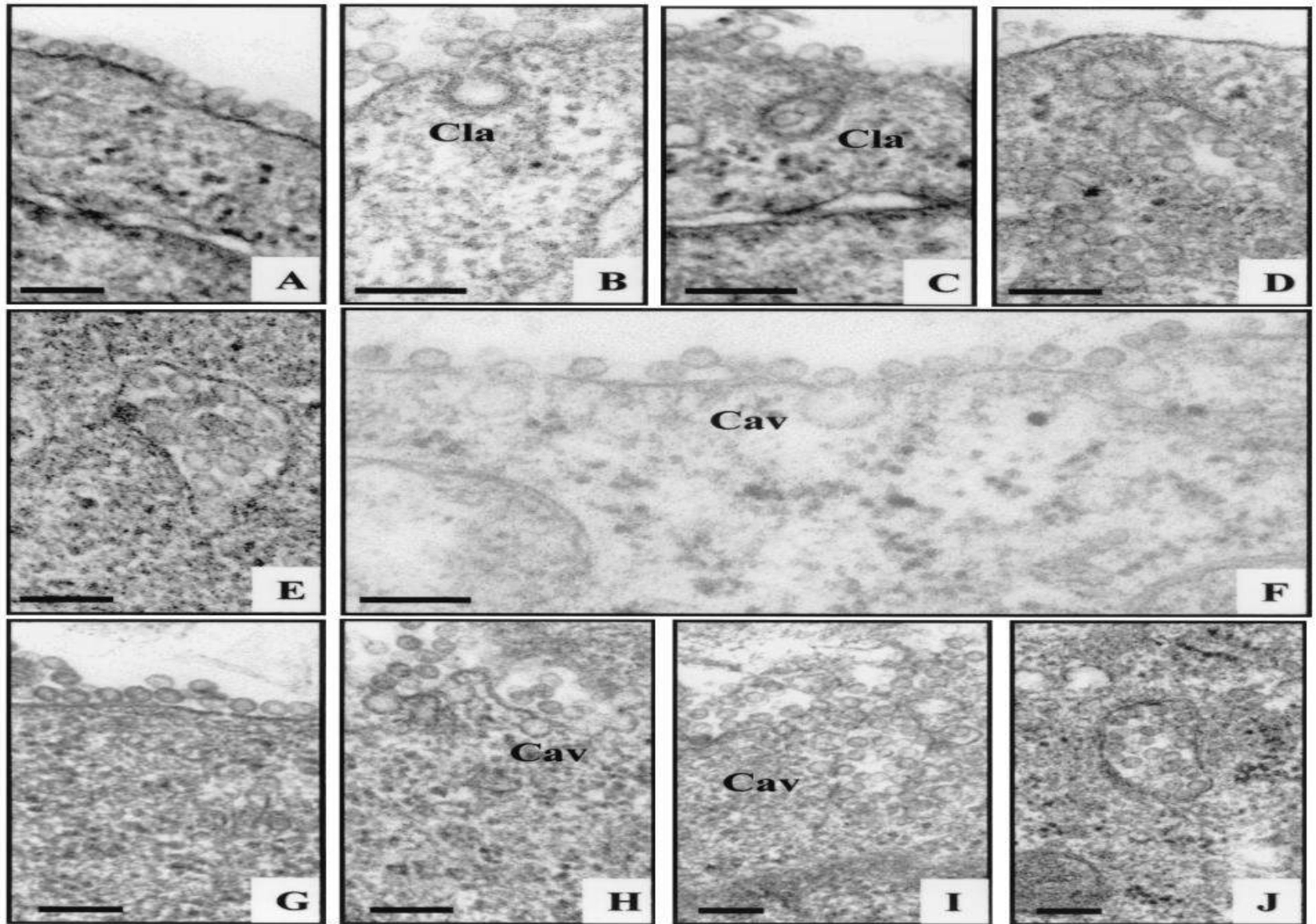
# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)



	Laminin-332		Integrin ( $\alpha 6 \beta 1/4$ )		Limited L2 N-terminus exposure
	HSPG		Proprotein convertase		Increased L2 N-terminus exposure
	Growth factor		Tetraspanin		L1 pentamer
	GFR		A2t		Altered L1
	CyPB				



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

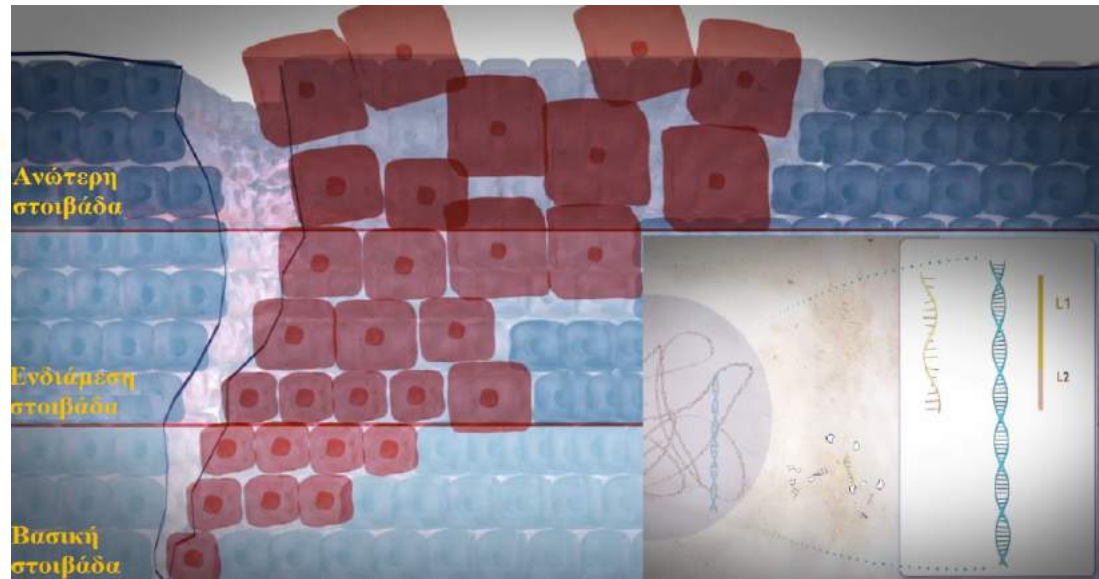
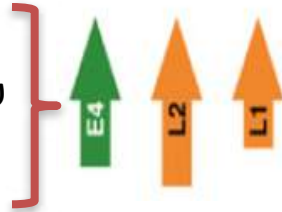


(A-E) Ενδοκυττάρωση του HPV16, (F-J) Ενδοκυττάρωση του HPV31

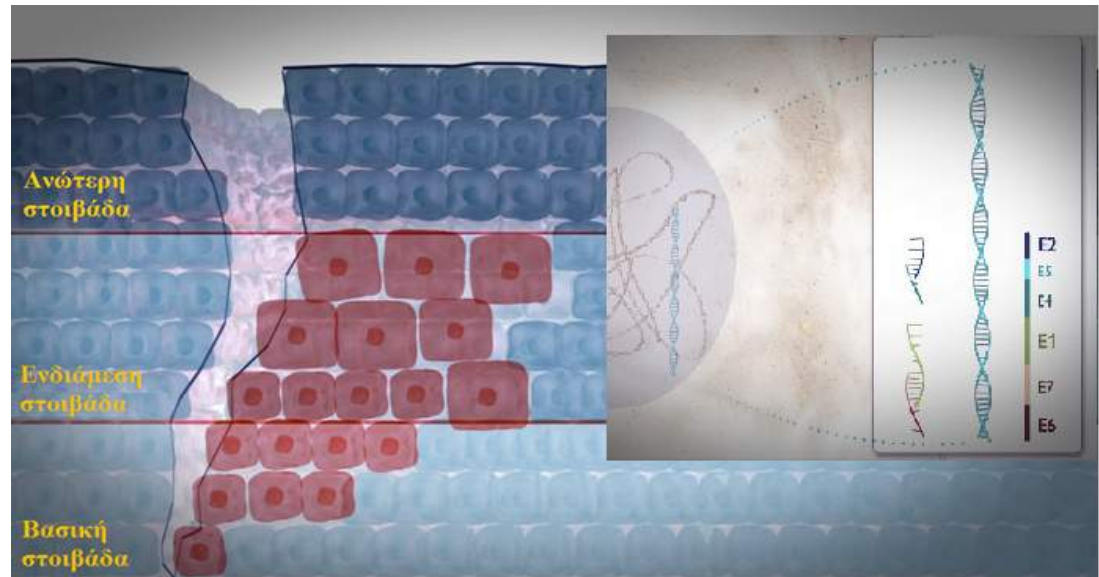
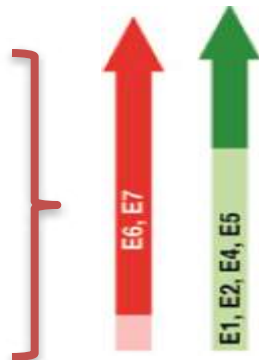
(Bousarghin et al., J Virol, 2003)

# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

- Απελευθέρωση του ιού
- Σχηματισμός καψιδίου

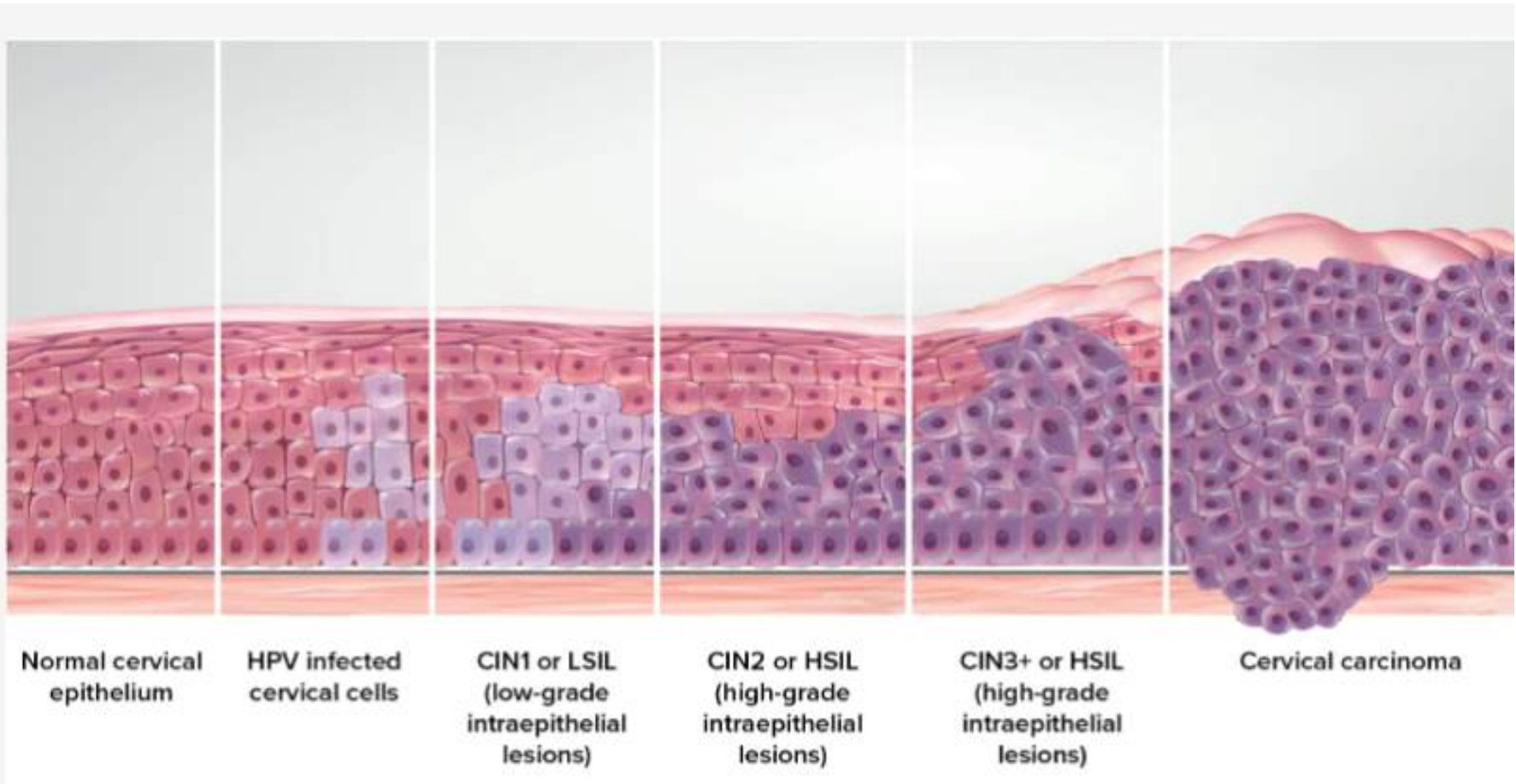


- Αντιγραφή του ιού
- Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός





# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

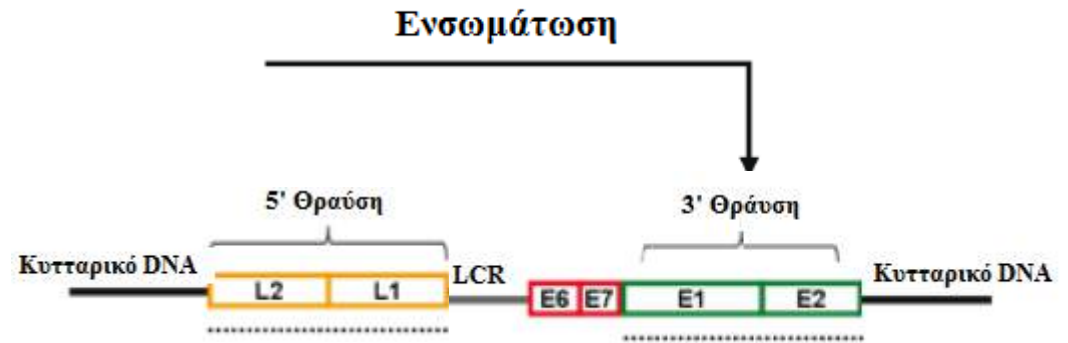
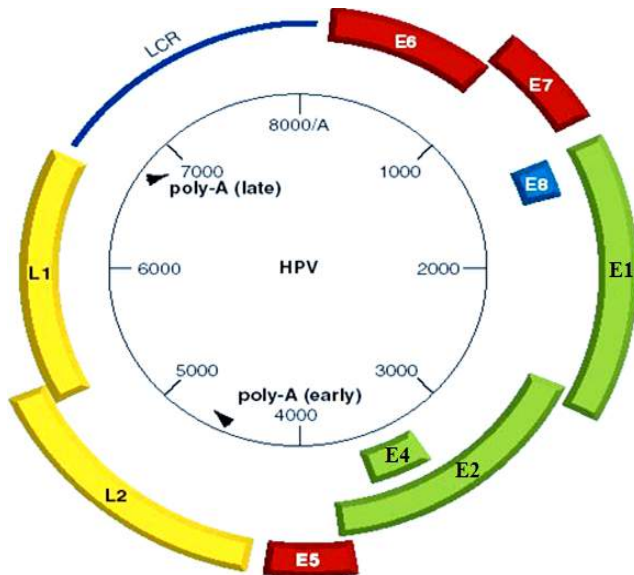
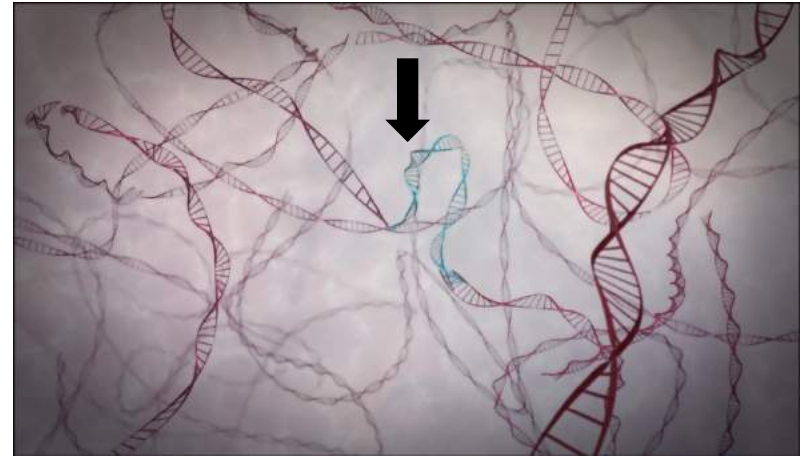


- ✓ Εμφάνιση αλλοιώσεων 3 εβδομάδες – 8 μήνες από την στιγμή της μόλυνσης
- ✓ Περισσότερες HPV μολύνσεις εξαλείφονται μόνες τους
- ✓ Περισσότερες αλλοιώσεις απομακρύνονται αυτόματα χωρίς ιατρική παρέμβαση
- ✓ Προ-καρκινικές αλλοιώσεις μπορούν να μετατραπούν σε καρκίνο, 15-20 έτη

# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

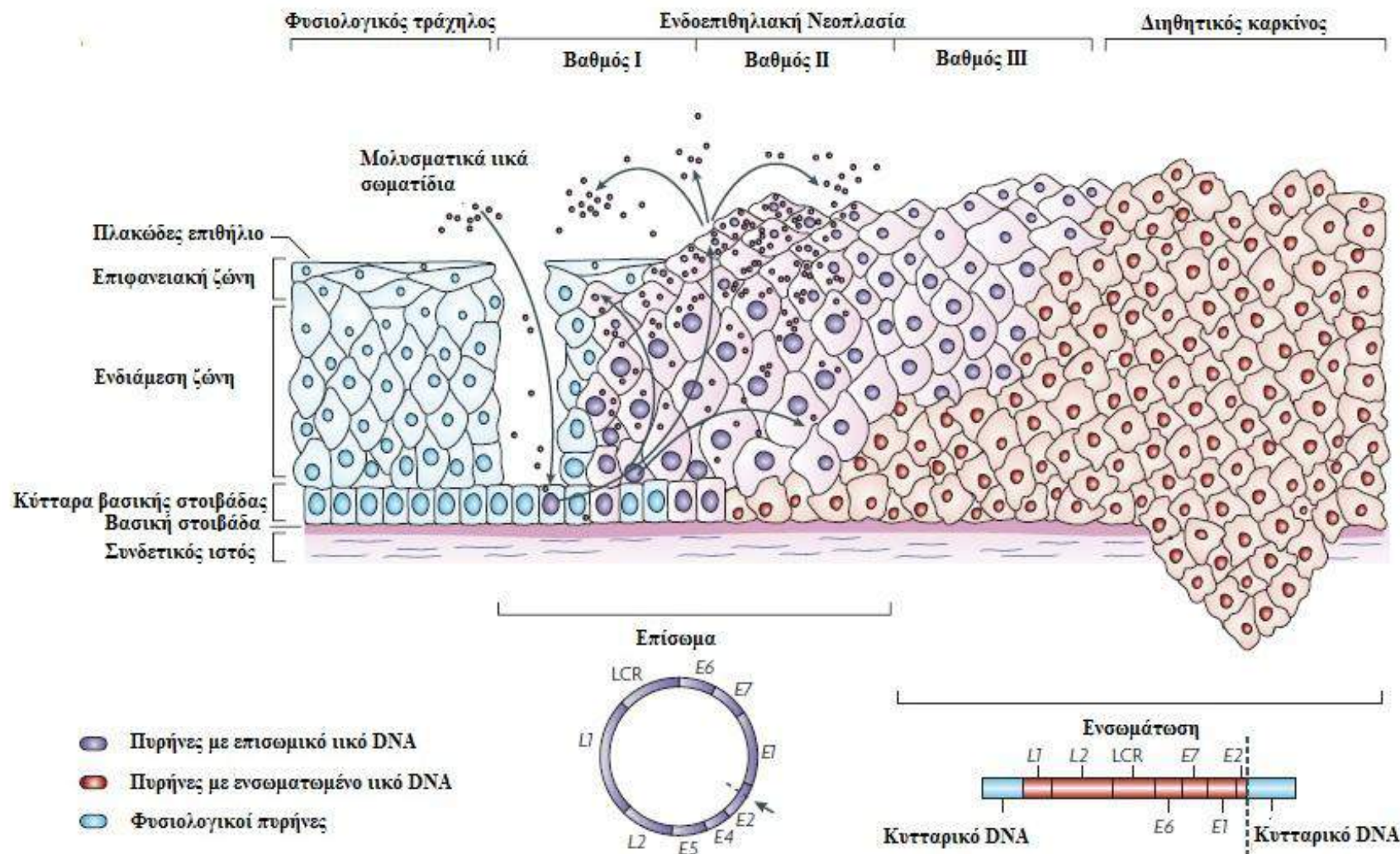
## Μορφή HPV DNA:

- Επίσωμα
- Ενσωματωμένο
- Μείγμα



# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

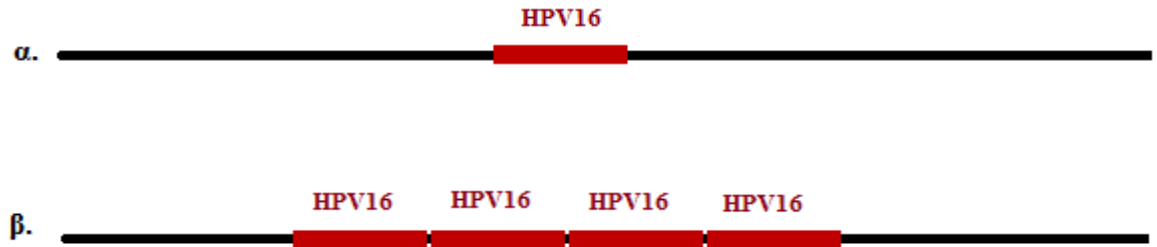
✓ Ενσωμάτωση δείκτης πρόβλεψης εξέλιξης αλλοίωσης





# Φυσική Ιστορία των Ιών των Θηλωμάτων (Papillomavirus)

## Η ενσωμάτωση του HPV16 DNA



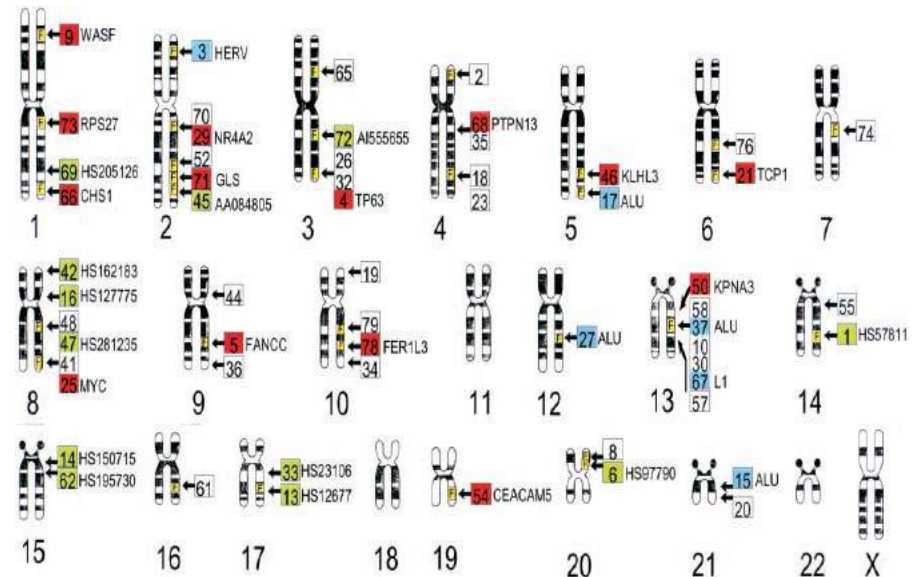
I. Κοινές εύθραυστες θέσεις του κυτταρικού γονιδιώματος (CFS)

II. Γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου (ογκογονίδιο Myc)

III. Επαναλαμβανόμενες περιοχές του κυτταρικού DNA

IV. Περιοχές του κυτταρικού DNA παρουσιάζουν ομοιότητα HPV16 γονιδίωμα

## 250 θέσεις ενσωμάτωσης





# Μοριακή Διάγνωση HPV

Οι κυτταρολογικές εξετάσεις έχουν μειώσει τα περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και τα ποσοστά θνησιμότητας

- Έχουν χαμηλή ειδικότητα
- Υποκειμενικότητα



- ✓ **Ανάπτυξη μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην ανίχνευση του HPV DNA/RNA**
- Ασθενείς με κίνδυνο ανάπτυξης δυσπλασίας με αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο
- Η HPV γονοτύπιση (HR HPV DNA) συμβάλει στην διάγνωση γυναικών που έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης υψηλότερου βαθμού δυσπλασίας και καρκίνο

# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

- Hybrid capture: Hybrid capture 2 (HC2; Qiagen)
- In situ hybridization (ISH): in situ υβριδισμός του DNA με χρήση probes
- Μέθοδος διεισδυτικής διάσπασης (Cervista HPV-HR; Hologic)

## 2. Ενίσχυση στόχου

- Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR
- Ισοθερμική ενίσχυση E6/E7 mRNA

# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

### Hybrid Capture 2 (Qiagen), FDA, 2003

- 13 HR HPV γονότυπους (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)
- 5 LR HPV γονότυπους (6, 11, 42, 43, 44)
- Δεν διαθέτει εσωτερικό μάρτυρα
- Διατίθεται αυτοματοποιημένο σύστημα





# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

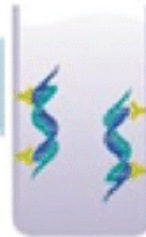
### 1. DNA Specimen denaturation



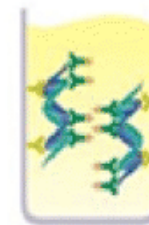
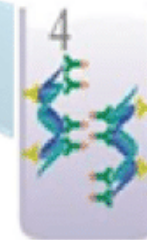
### 2. Hybridize with HPV RNA probe



### 3. Capture hybrids using monoclonal antibodies on microtiter plates



### 4. A second monoclonal antibody conjugated to alkaline phosphatase is added



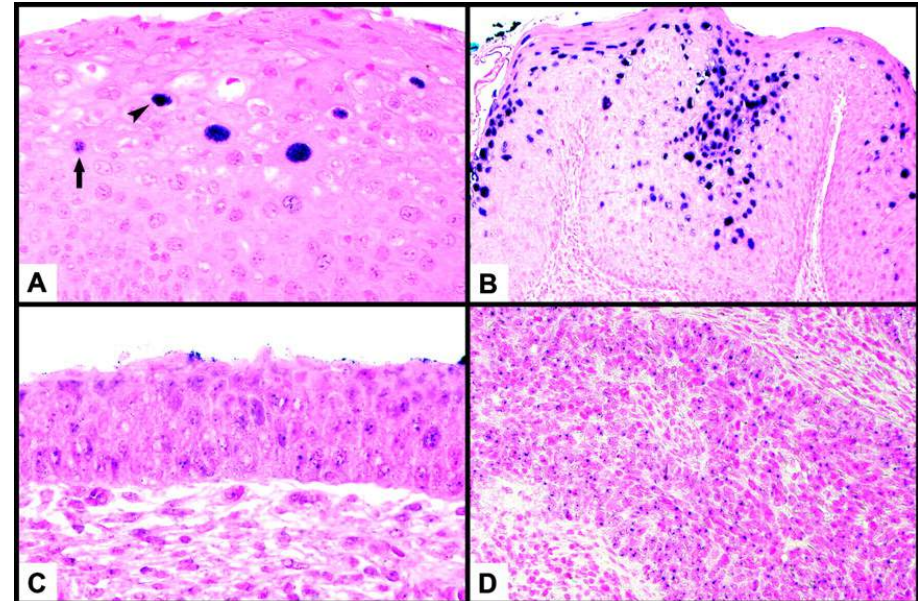
### 5. Alkaline phosphatase splits a chemiluminescent substrate to emit light

# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

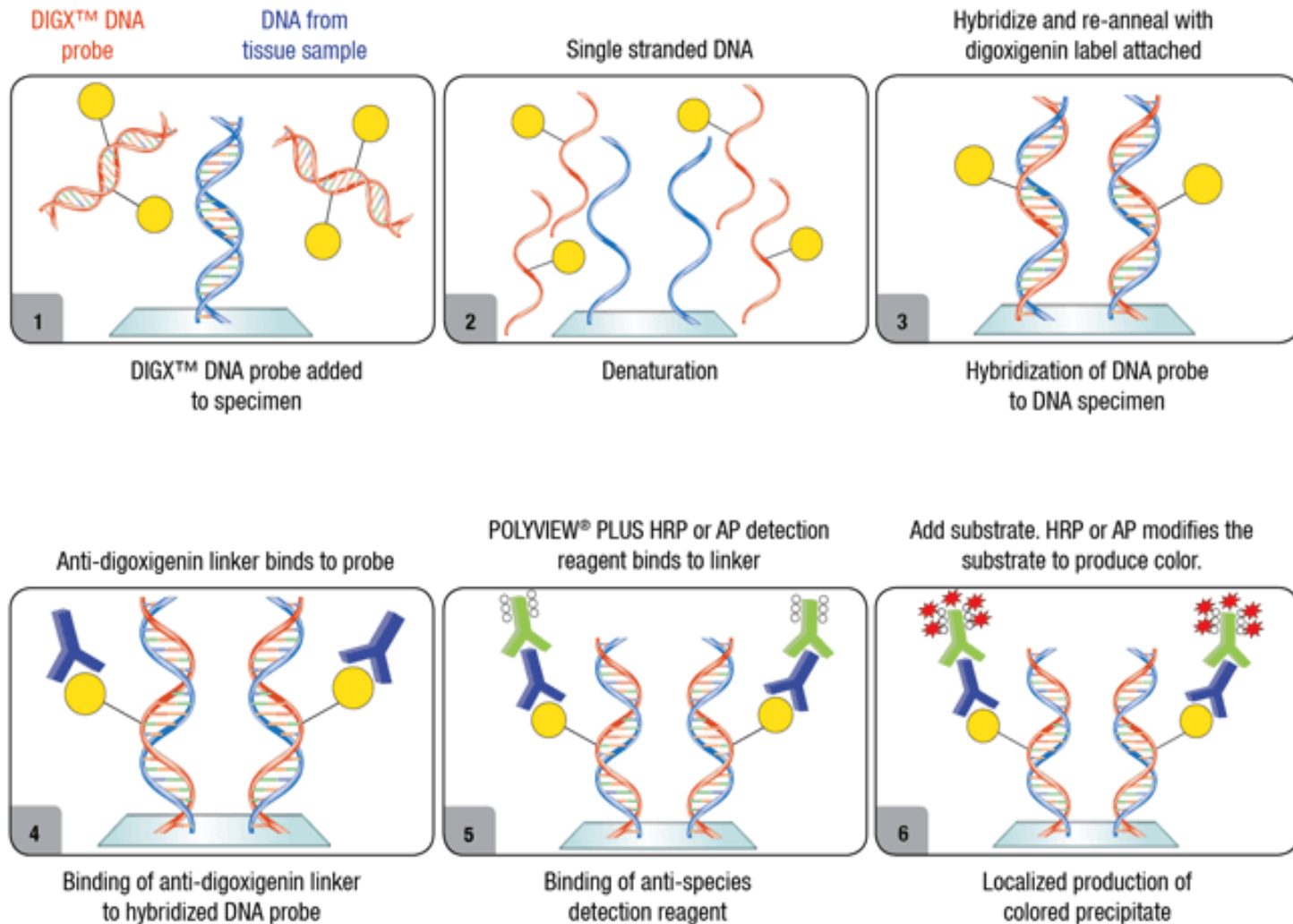
### In Situ Υβριδισμός - HPV III probes (Ventana Medical Systems)

- 12 HR HPV γονότυπους (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 55, 58, 59, 68, 70)
- 5 LR HPV γονότυπους (6, 11, 42, 43, 44)
- Ανιχνεύει ιικό DNA στον πυρήνα του κυττάρου
- Τομές παραφίνης
- Συνδυάζει μορφολογία των κυττάρων και παρουσία HPV DNA



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλειικών οξέων με ενίσχυση σήματος





# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

**Cervista™ HPV HR and Genfind™ DNA Extraction Kit (Hologic), FDA, 2009**

**Cervista™ HPV16/18 (Hologic)**

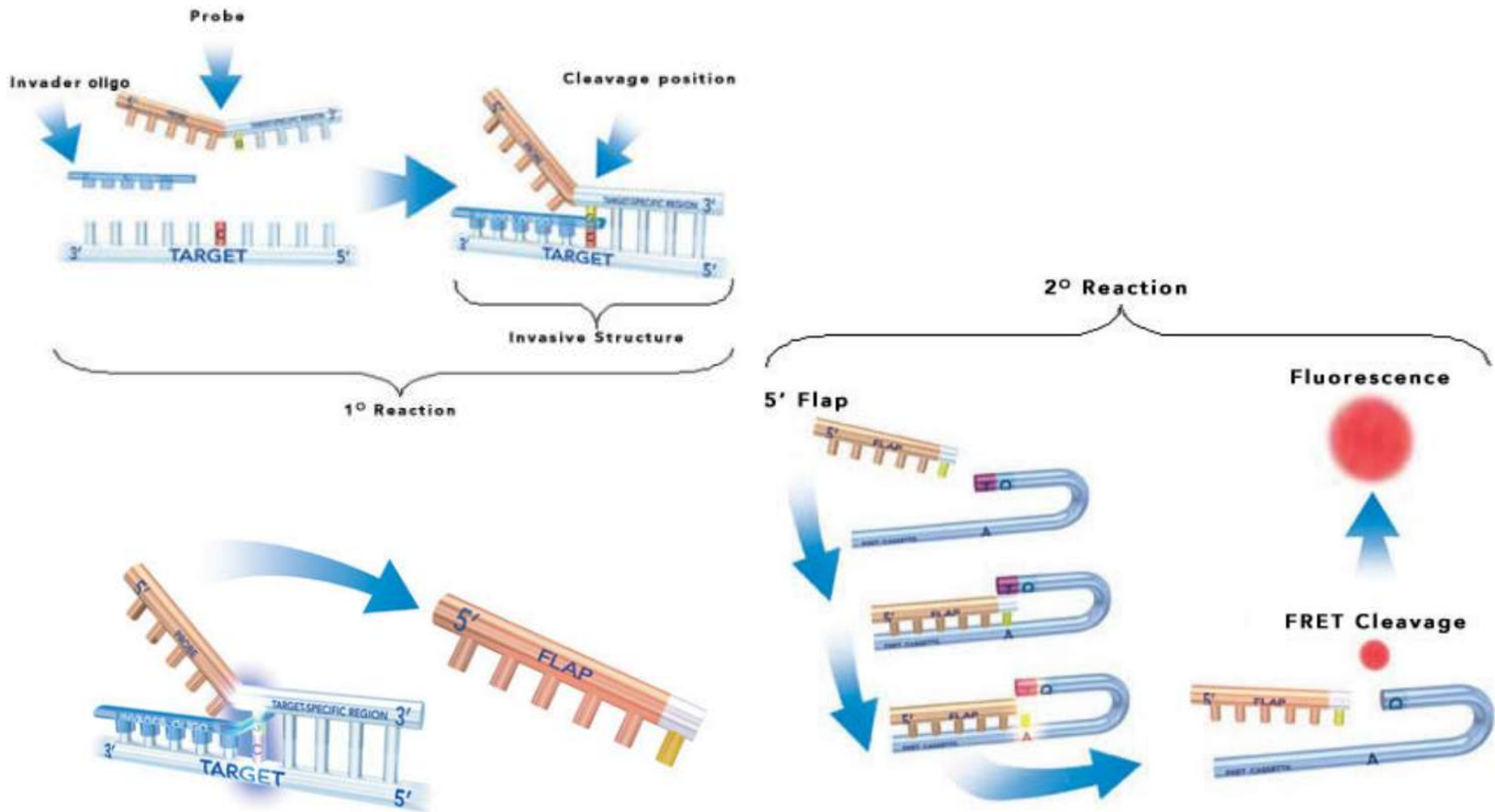


- Cervista™ HPV HR ανιχνεύει 14 HR HPV τύπους (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)
- Cervista™ HPV16/18 ανιχνεύει μόνο HPV16/18
- Διαθέτει εσωτερικό μάρτυρα (histone 2-gene)
- Διατίθεται αυτοματοποιημένο σύστημα



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλειικών οξέων με ενίσχυση σήματος



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 1. Υβριδισμός Νουκλεϊνικών οξέων με ενίσχυση σήματος

- Hybrid capture: Hybrid capture 2 (HC2; Qiagen)
- In situ hybridization (ISH): in situ υβριδισμός του DNA με χρήση probes
- Μέθοδος διεισδυτικής διάσπασης (Cervista HPV-HR; Hologic)

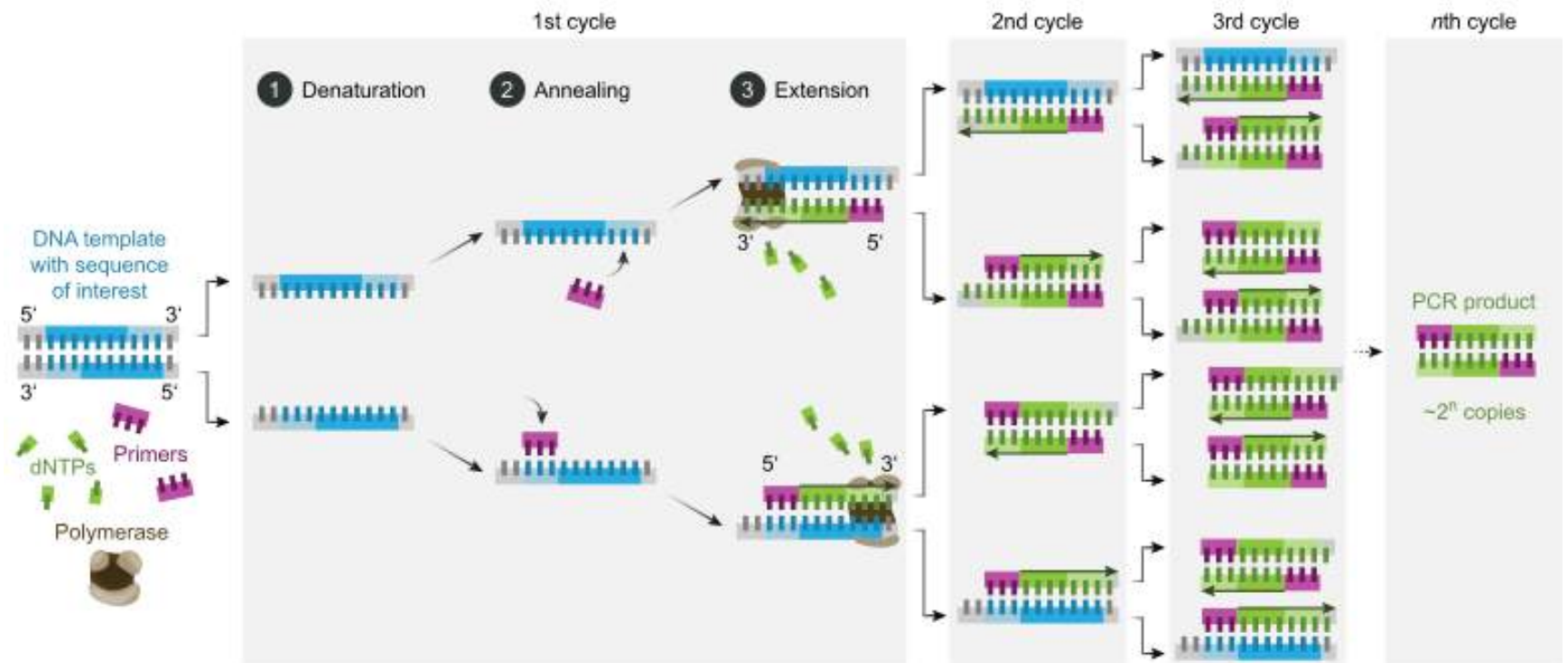
## 2. Ενίσχυση στόχου

- Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR
- Ισοθερμική ενίσχυση E6/E7 mRNA



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

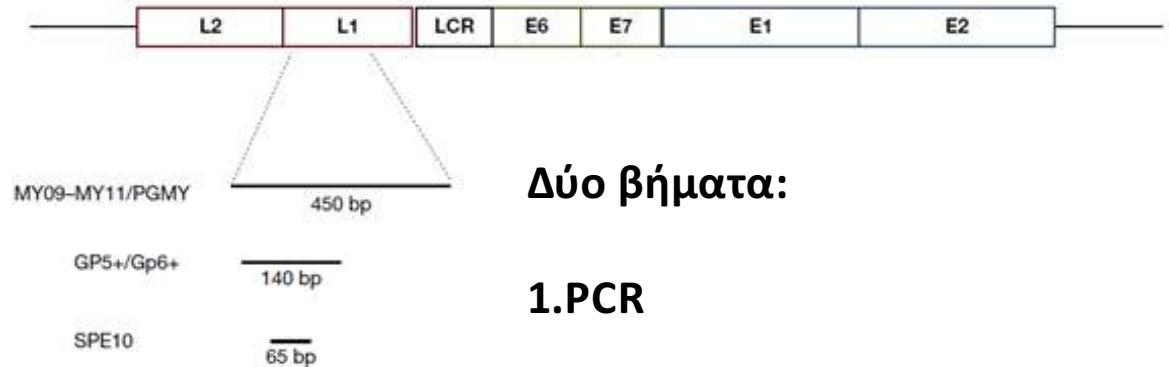


$$n^{36} = 68,719,476,736 \text{ copies in } \sim 2 \text{ hrs}$$

# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

- Βιοτινιλιωμένοι εκκινητές



Δύο βήματα:

1. PCR

2. Οπτικοποίηση αποτελέσματος

- Ανιχνευτές (probes) ακινητοποιημένοι:

### 1. Strips

- INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Fujirebio)
- Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics)

### 2. Μικροσυτοιχίες

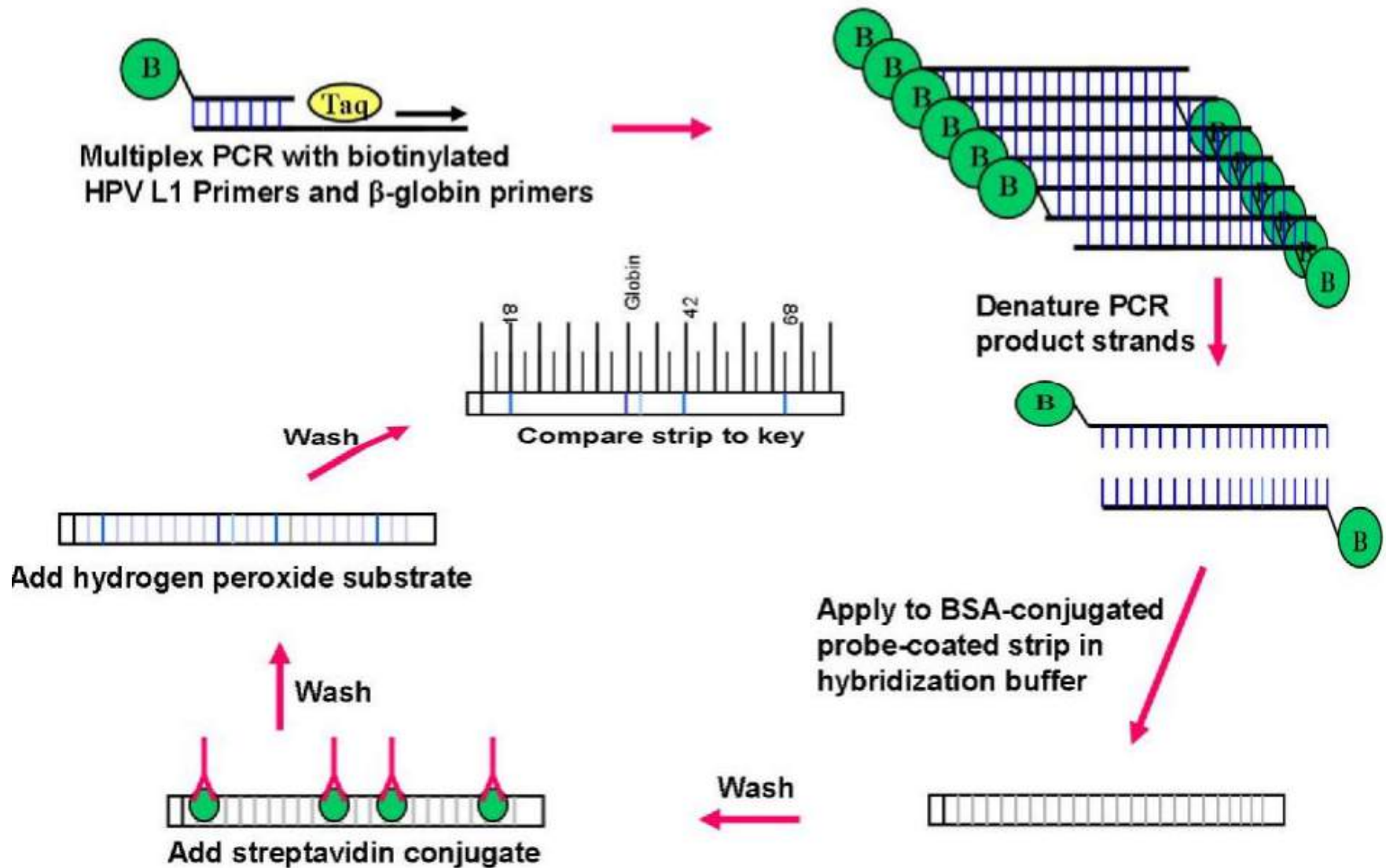
- CLART® Human Papillomavirus 2 (Genomica)
- PapilloCheck assay (Greiner Bio-One)

### 3. Μικροσφαιρίδια

- Luminex xMAP platform (Mebgen™ HPV Kit)

# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

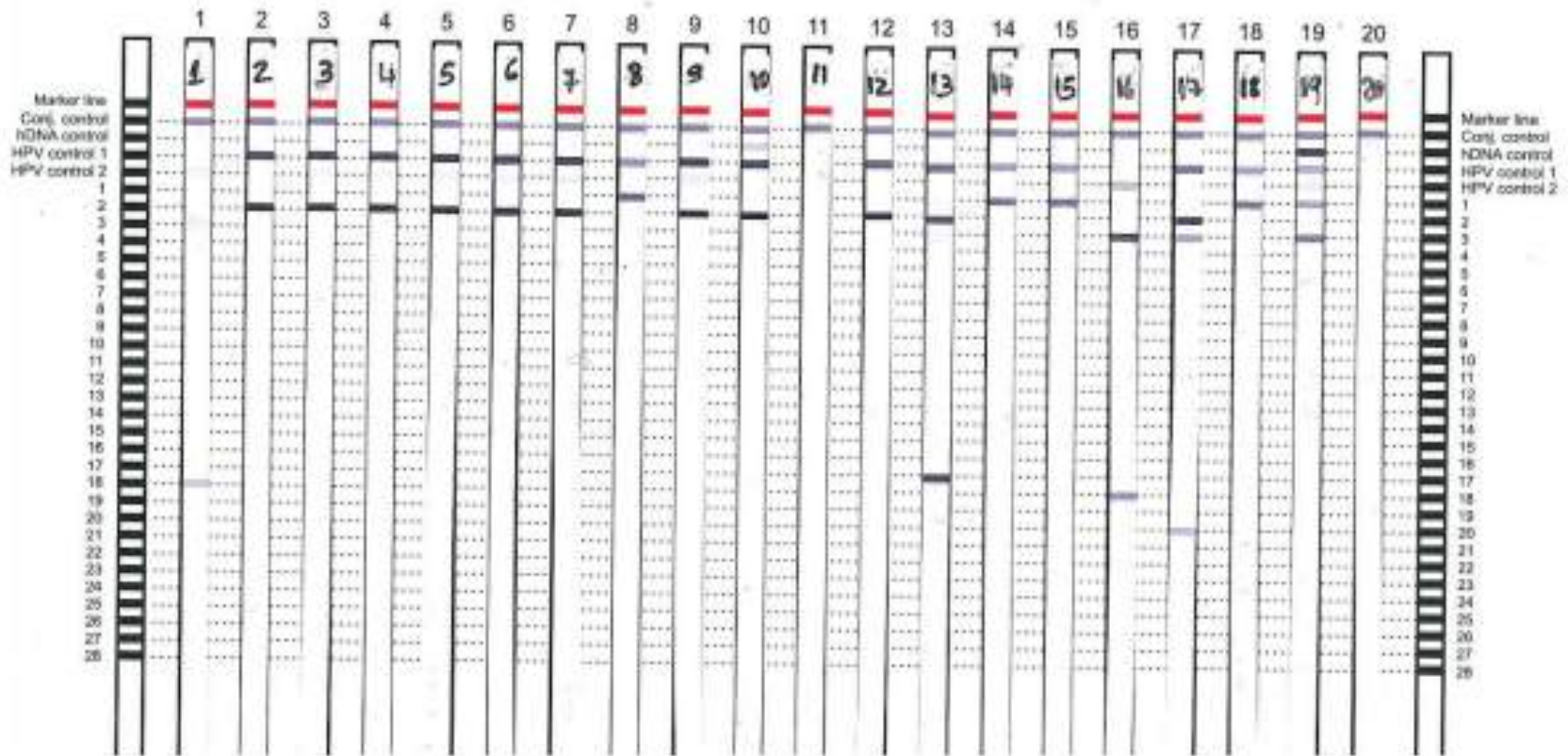




# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

### INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* Data reporting sheet



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

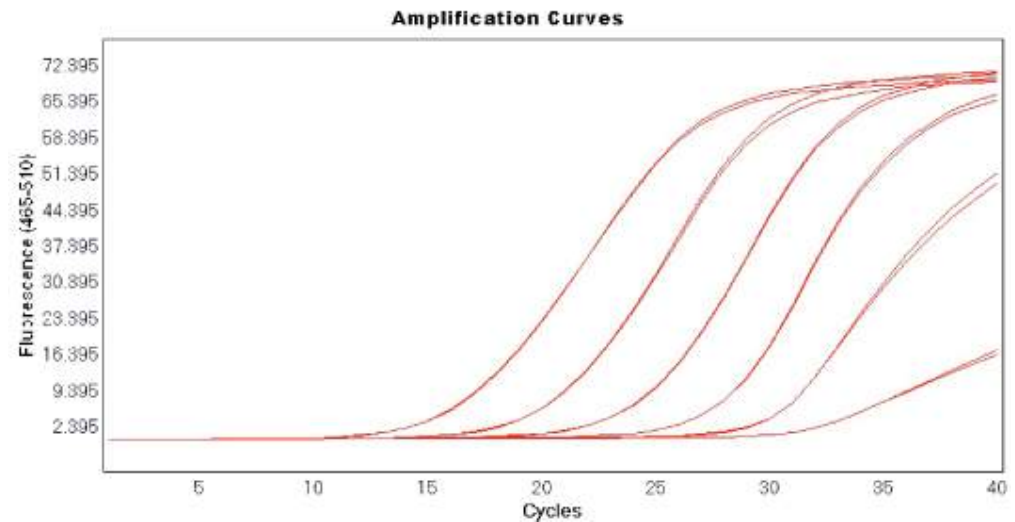
### Real Time PCR (PCR πραγματικού χρόνου)

- ✓ Τα προϊόντα ενίσχυσης παρατηρούνται σε πραγματικό χρόνο
- ✓ Δεν απαιτείται δεύτερο βήμα οπτικοποίησης



### Real Time PCR vs PCR

- Μεγαλύτερη ταχύτητα
- Μεγαλύτερη ευαισθησία
- Επαναληψιμότητα



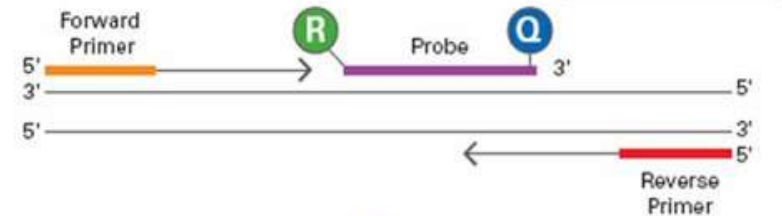
# Μοριακή Διάγνωση HPV

## 2. Ενίσχυση στόχου – PCR

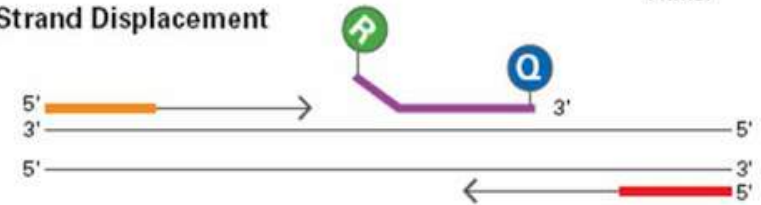
### Real Time PCR (PCR πραγματικού χρόνου)

- Abbott Real-Time High Risk HPV test (Abbott Molecular)
- Cobas 4800 HPV (Roche diagnostics) **(FDA, 2011)**

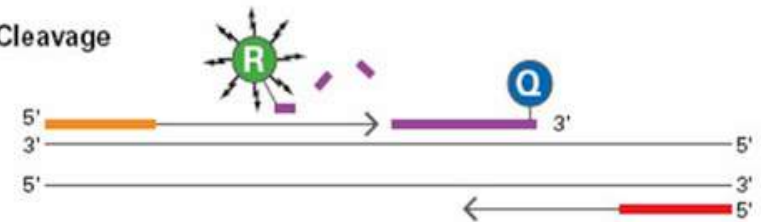
#### Polymerization



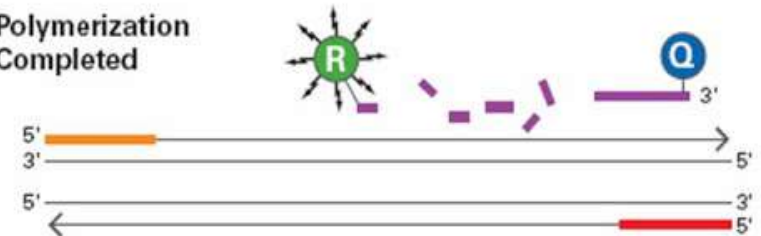
#### Strand Displacement



#### Cleavage

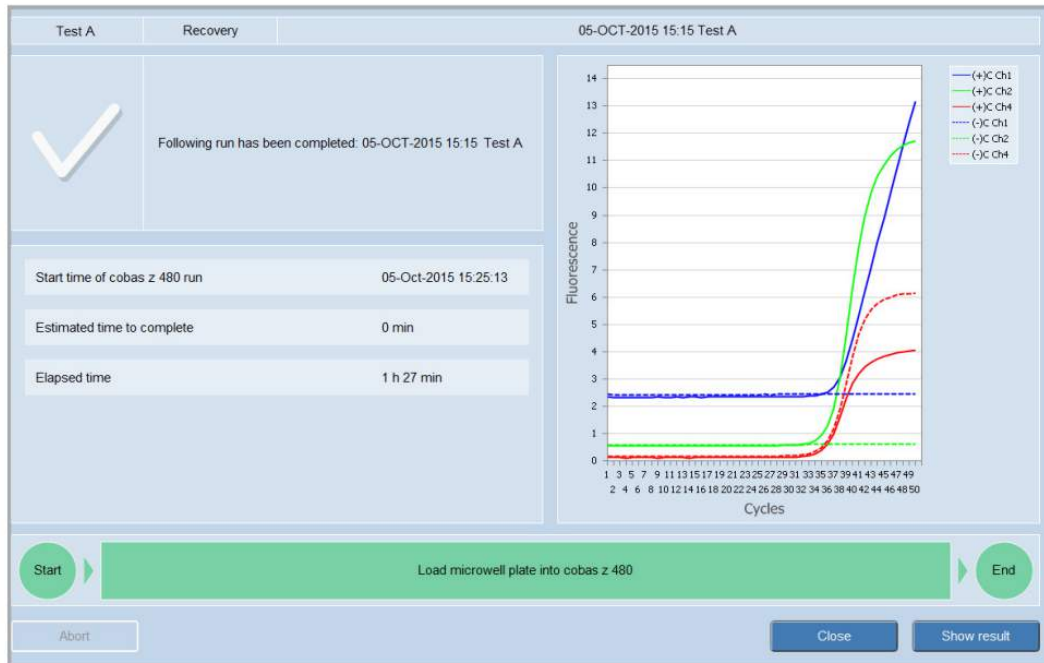


#### Polymerization Completed



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## • Cobas 4800 HPV (Roche diagnostics)



12 pooled hrHPV



HPV16 HPV 18



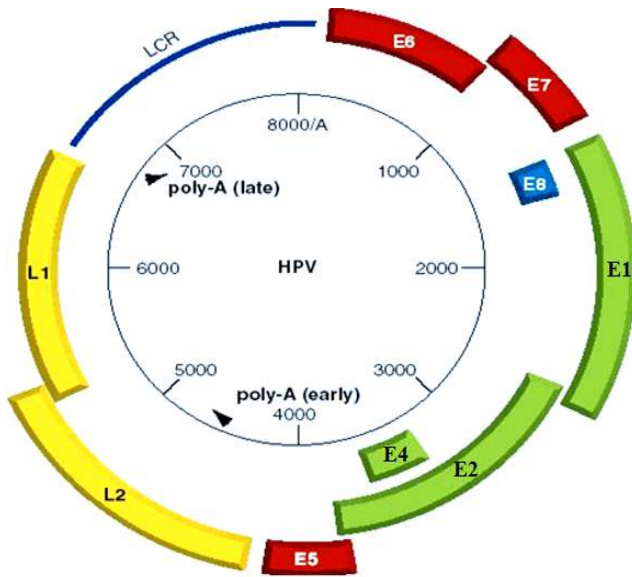
- ✓ Αυτοματοποιημένο σύστημα
- ✓ Εσωτερικός μάρτυρας β-globin



# Μοριακή Διάγνωση HPV

## Ισοθερμική ενίσχυση E6/E7 mRNA

1. Nuclisens HPV (Biomerieux)
2. APTIMA (GenProbe), (FDA , 2011)



- L1 ρήξη κατά την ενσωμάτωση (Ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα με μοριακά τεστ που ενισχύουν L1)
- Ενεργή HPV μόλυνση

# Μοριακή Διάγνωση HPV

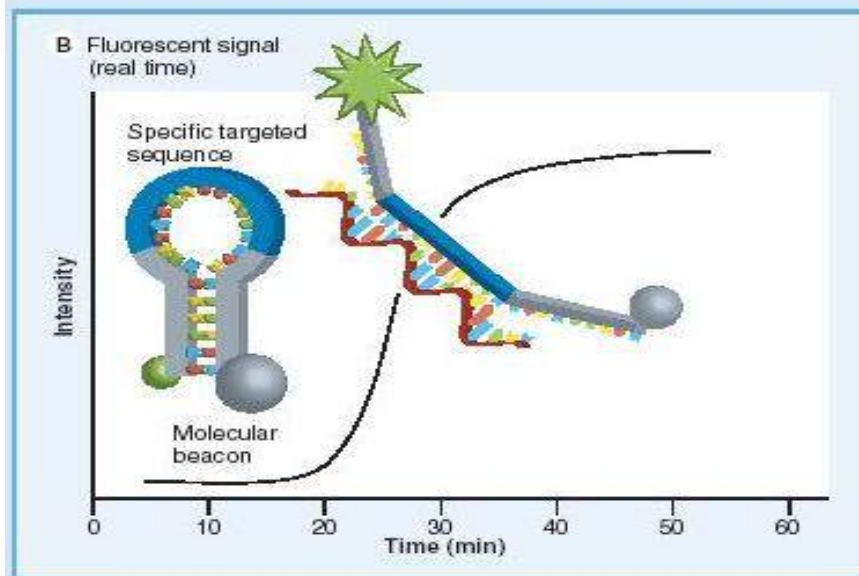
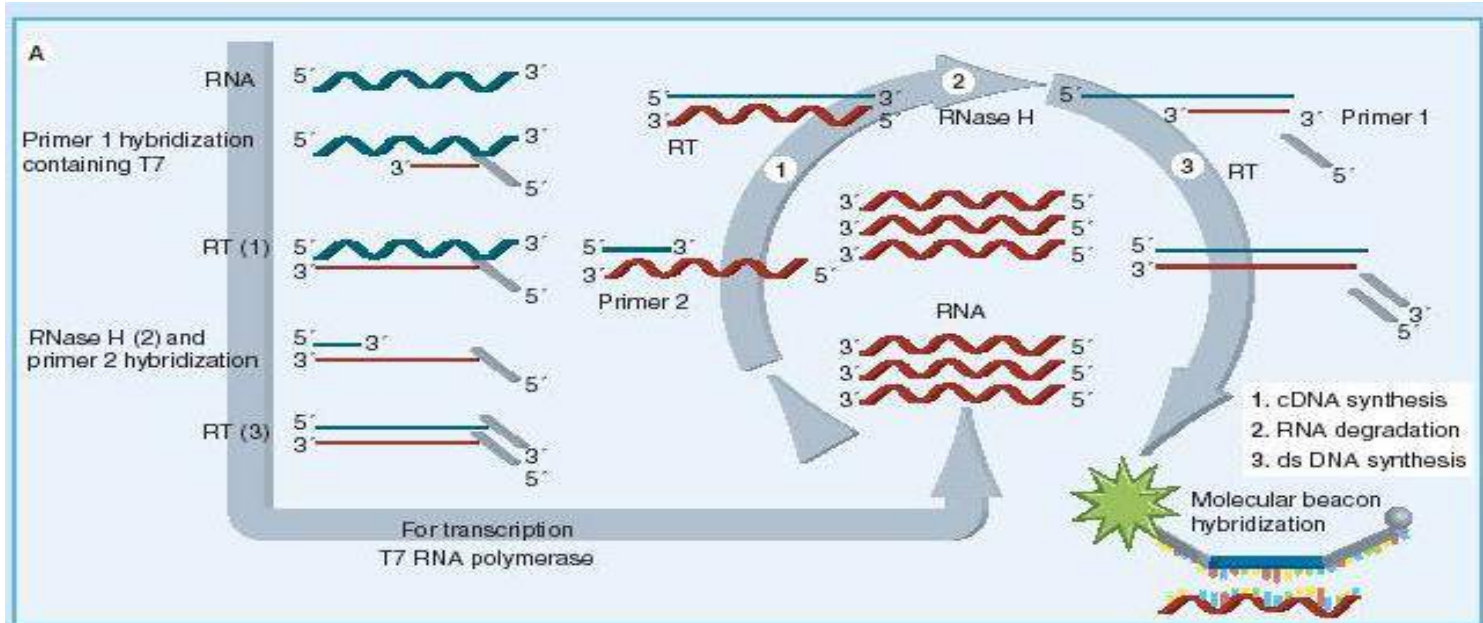
## Ισοθερμική ενίσχυση E6/E7 mRNA

### 1. Nuclisens HPV (Biomerieux)

- ✓ Βασίζεται στην ανίχνευση παραγόμενου E6/E7 mRNA HPV 16, 18, 31, 33 και 45
- ✓ NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification)
- ✓ Ανίχνευση σήματος με μοριακούς ιχνηθέτες (molecular beacons) σε πραγματικό χρόνο (Real-Time)
- ✓ Εσωτερικό RNA μάρτυρα (U1A mRNA)
- ✓ Αυτοματοποιημένο σύστημα



# Μοριακή Διάγνωση HPV



# Μοριακή Διάγνωση HPV

Ισοθερμική ενίσχυση E6/E7 mRNA

## 2. APTIMA (GenProbe), FDA 2011

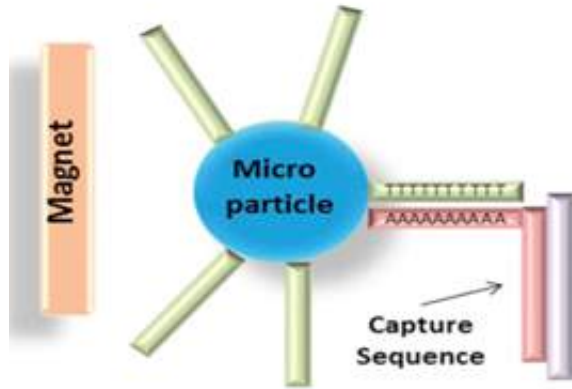
- ✓ Ενίσχυση μέσω μεταγραφής του HPV mRNA
- ✓ E6/E7 mRNA για 14 HR HPV τύπους (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
- ✓ APTIMA HPV test GT ανίχνευση HPV16 και HPV18/45
- ✓ Ανίχνευση σήματος με ανιχνευτές χημειοφωταύγειας
- ✓ Εσωτερικό RNA μάρτυρα
- ✓ Αυτοματοποιημένο σύστημα



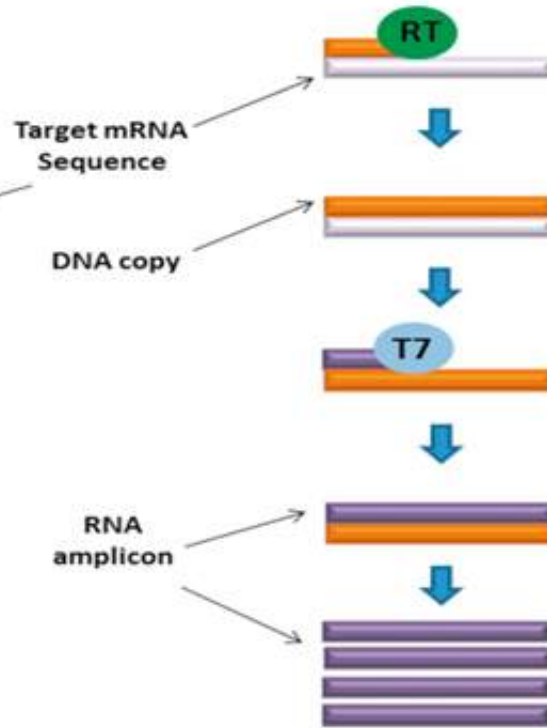


# Μοριακή Διάγνωση HPV

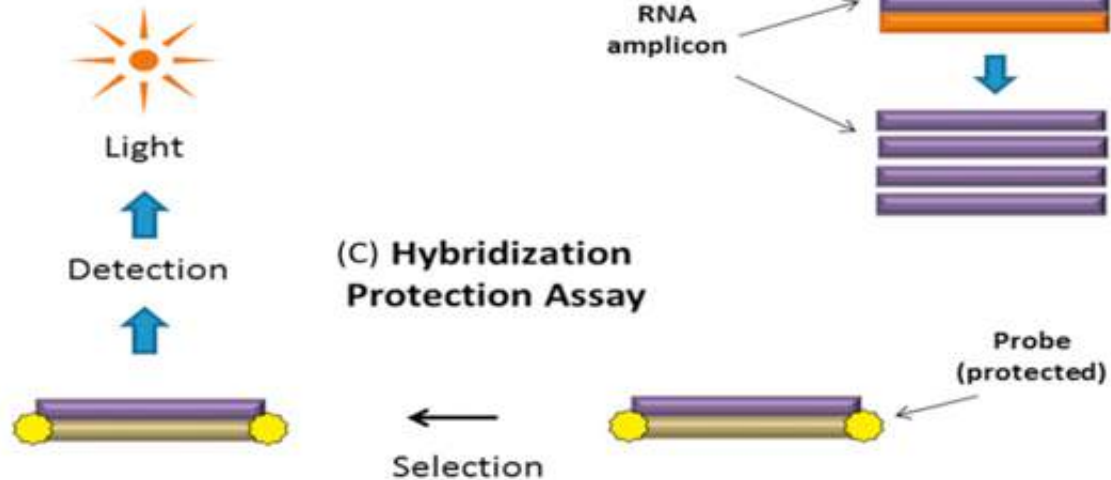
(A) Target Capture



(B) Transcription-mediated Amplification



(C) Hybridization Protection Assay



# Μοριακή Διάγνωση HPV

TABLE 1.  
BRIEF DESCRIPTION OF FDA AND NON-FDA APPROVED COMMERCIALISED HPV TESTS.

Methods	Methodology	HPV detection	Control	Automation	Sensitivity CINII+	Specificity CINII+	Analytical Sensitivity
Digene HC2 HR and LR (Qiagen)	Hybrid capture	13 HR HPV or five LR HPV types	No available	Automation available	87–96%	20–85%	5.000 copies/assay
Cervista™ HPV HR (Hologic)	Invader chemistry	14 HR HPV types	Histone 2 gene	Automation available	90%	47%	625–1250 copies/reaction
Cobas HPV test (Roche Molecular Diagnostics)	Real-time PCR	Detection and genotyping of HPV16, HPV18, detection of 12 HR HPV types	β-globin	Fully automated	>93%	59.3%	80–2.400 copies/ml
Aptima HPV test (Hologic Gen-Probe)	Transcription-mediated amplification	14 HR HPV types	Exogenous RNA target	Fully automated	>95%	63%	300 copies/reaction
Abbott RT HR HPV (Abbott Molecular)	Real-time PCR	Detection and genotyping of HPV16 HPV18, detection of 12 HR HPV types	β-globin	Fully automated	88.3–97.8%	27.3–61.7%	500–5000 copies/assay
INNO-LIPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics)	Reverse hybridisation	Detection and genotyping of 28 HPV types	HLA-DPB1	Partially automated	92.5%	35.1%	20–70 copies/assay
Linear Array HPV (Roche Molecular Diagnostics)	Reverse hybridisation	Detection and genotyping of 37 HPV types	β-globin	Partially automated	96–98%	26–32.8%	50–8000 copies/ml
CLART® Human Papillomavirus 2 (Genomica)	PCR-microarray	Detection and genotyping of 35 HPV types	Human CTFR gene + plasmid	Partially automated	93–96%	28–73.6%	10–100 copies/reaction
PapilloCheck assay (Greiner Bio-One)	PCR-microarray	Detection and genotyping of 25 HPV types	human ADAT1 gene	Partially automated	95.5–98.2%	82.7–91.6%	30–750 copies/reaction
ISH (DakoCytometion, GenPoint)	In situ hybridisation	Detection and genotyping of 13 HPV types	No available	Partially automated	89.5%	39.9%	1–2 copies

# Έρευνα HPV

## Φυλογενετική ανάλυση HPV16

✓ 4 lineages (A–D)

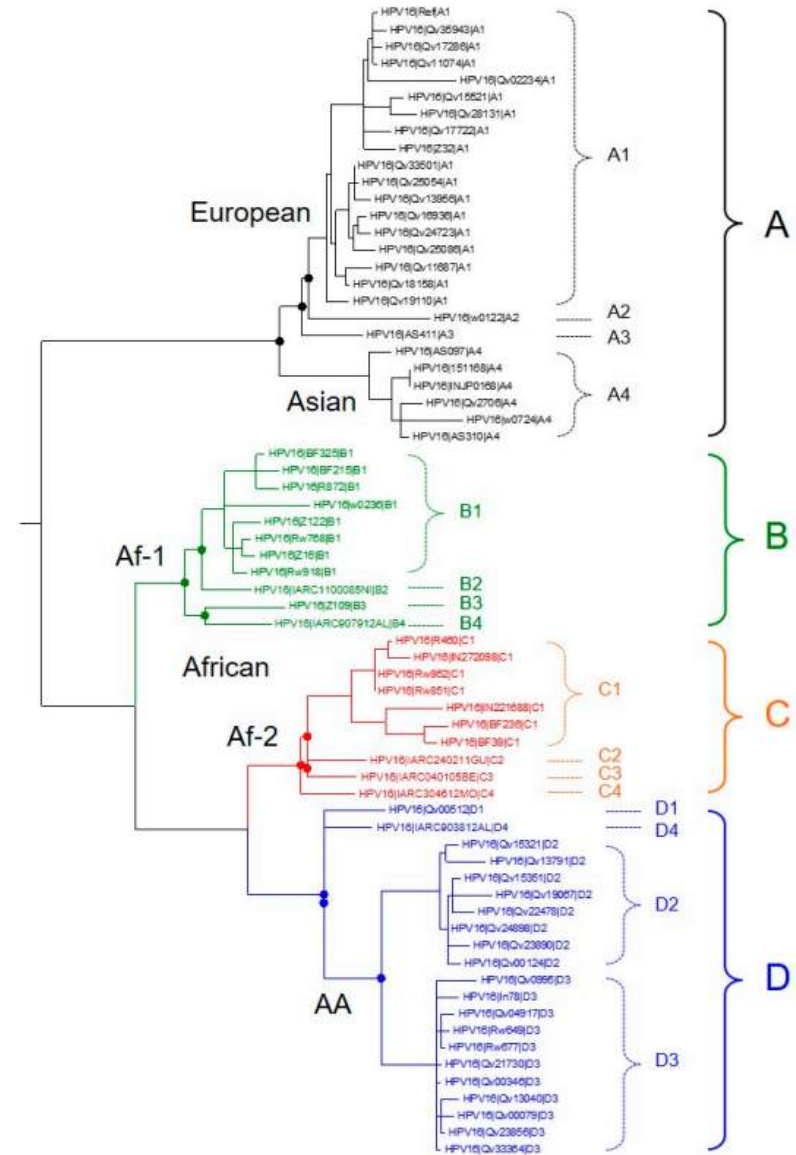
✓ 16 sub-lineages (A1–4, B1–4, C1–4 and D1–4).

• Lineage A: A1–A3 (European variant), A4 (Asian variant)

• Lineage B: B1–B4 (African type I variant)

• Lineage C: C1–C4 (African type II variant)

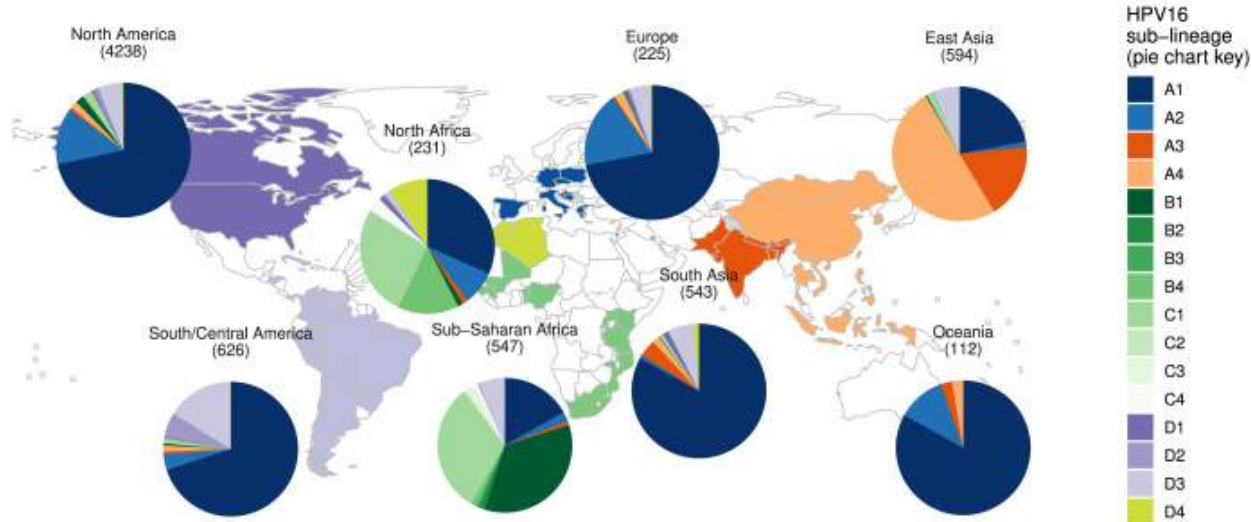
• Lineage D: D1 (North American variant), D2 (Asian American type I), D3 (Asian American type II), D4



# Έρευνα HPV

## Φυλλογενετική ανάλυση HPV16

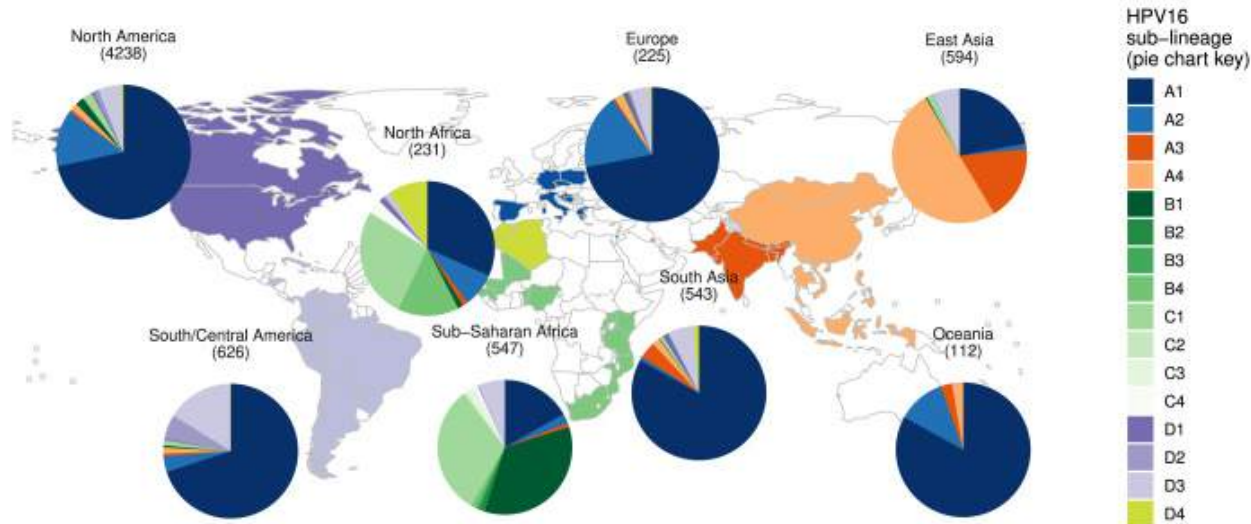
✓ Πλήρη αλληλούχιση 7000 HPV16 γονιδιωμάτων



- A1 sub-lineage αποτελεί το 70% των HPV16 στελεχών στην Ευρώπη, Νότιο/Κεντρική Αμερική, Βόρεια Αμερική, Νότια Ασία και Ωκεανία
- A2 sub-lineage αποτελεί το 10-20% των HPV16 στελεχών στην Ευρώπη, Βόρεια Αμερική και Ωκεανία
- A3 και A4 sub-lineages εντοπίζονται κυρίως στην Ανατολική Ασία



## Φυλλογενετική ανάλυση HPV16

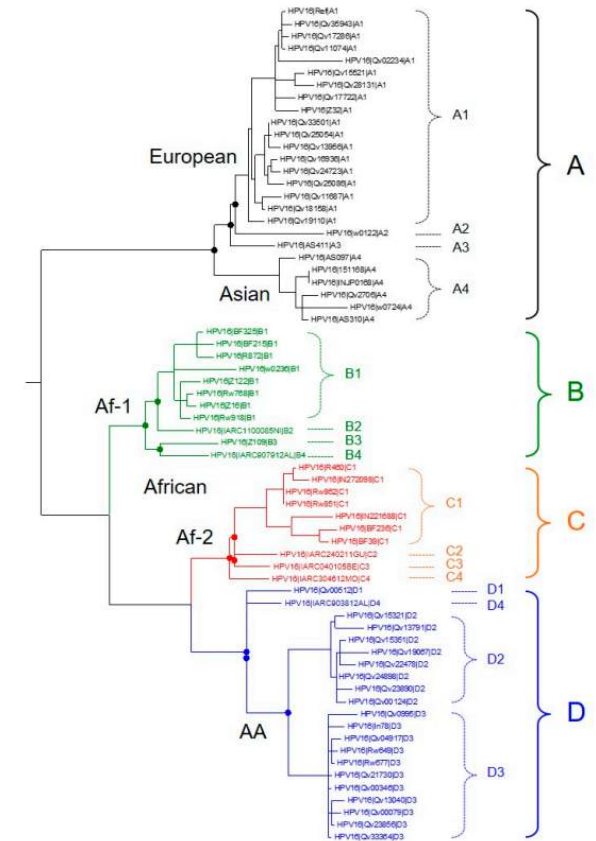


- B1-B3 και C1-C3 sub-lineages ανιχνεύονται στην υποσαχάρια Αφρική
- D1 sub-lineage ανιχνεύεται στην Αμερική, Ευρώπη, και ανατολική Ασία
- D2 σχεδόν αποκλειστικά στην Αμερική
- D3 εντοπίζεται σε διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο

# Έρευνα HPV

## Φυλλογενετική ανάλυση HPV16

- D lineage παρουσιάζει υψηλή ογκογονικότητα σε σχέση A, B και C lineages
- A1, A2 sub-lineages υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στους Καυκάσιους
- A3 sub-lineage υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στην ανατολική Ασία
- A4 sub-lineage υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στους Ασιάτες

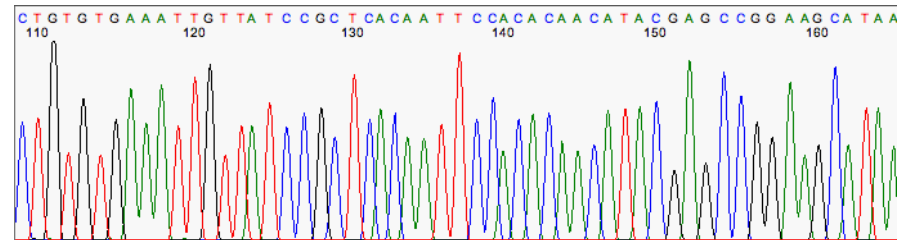
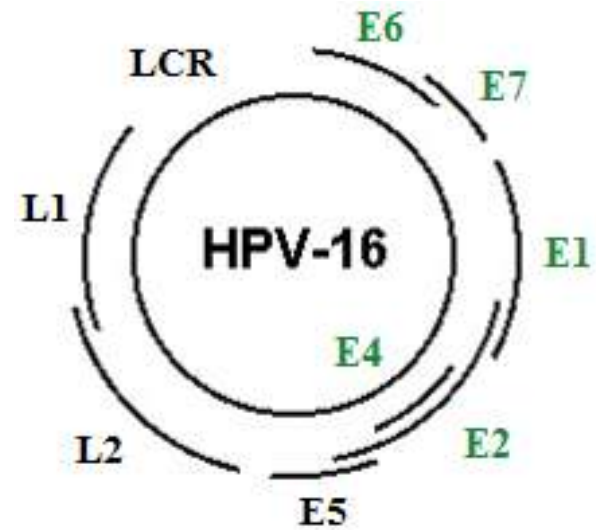


# Έρευνα HPV

## Φυλογενετική ανάλυση HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό

Ανάλυση γονιδίων **E6, E7, E1, E2, E4**

- Απομόνωση γενετικού υλικού
- PCR
- Αλληλούχιση
- Νουκλεοτιδική Ανάλυση
- Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων



# Έρευνα HPV

## Φυλλογενετική ανάλυση HPV16 στον ελληνικό πληθυσμό

- Ευρωπαϊκή παραλλαγή (A)
- Μη Ευρωπαϊκές παραλλαγές (B, C, D)

E6: 9 νέες μεταλλάξεις

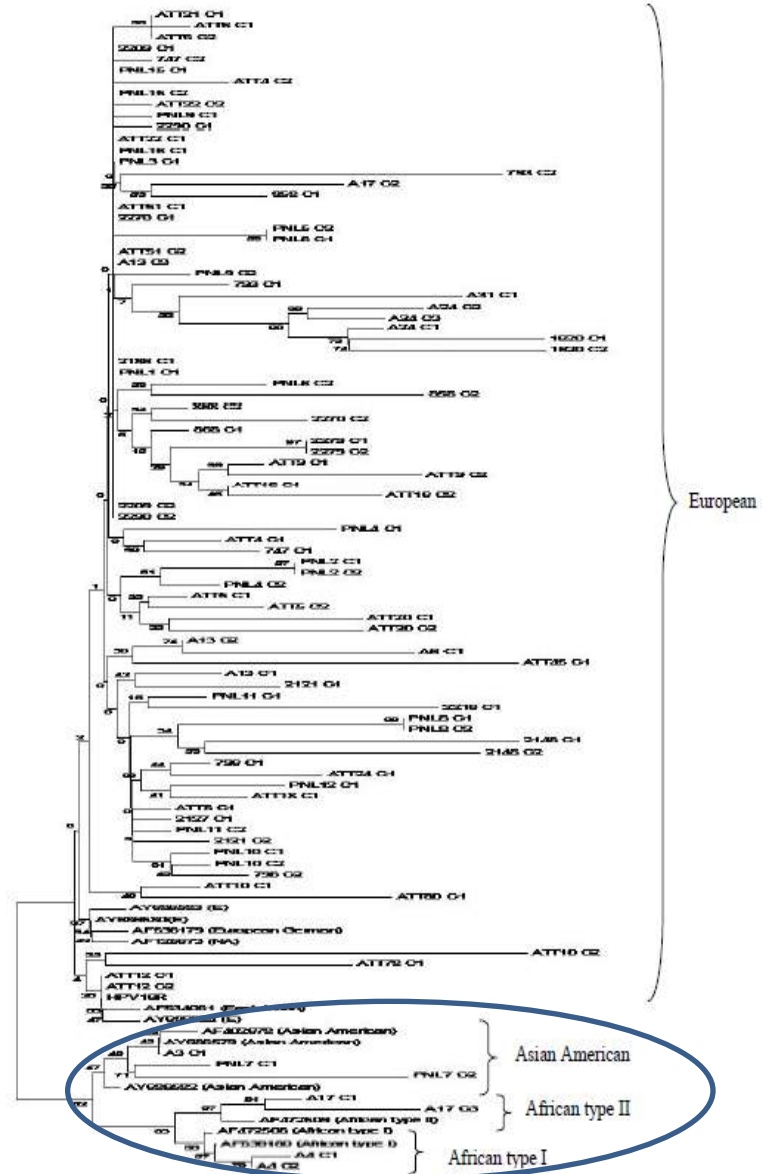
E7: 7 νέες μεταλλάξεις

E2: 3 νέες μεταλλάξεις

E4 : 15 νέες μεταλλάξεις

E1: 27 νέες μεταλλάξεις

Γεωγραφική  
προέλευση  
HPV16







## Μεταλλάξεις που συνδέονται με αυξημένη ογκογονικότητα

- E6; Q14H, H78Y, L83V
- E7; N29S, S63F
- E2; H35Q, P219S, T310K
- E5; I65V

HSIL και Καρκίνο

## Συντηρημένες περιοχές:

- ✓ E1
- ✓ E7
- ✓ N-τελικό άκρο E1<sup>^</sup>E4
- ✓ N-τελικό άκρο E2

Επιλεκτικό πλεονέκτημα εμένουσα μόλυνση

Πιθανοί στόχοι για μελλοντικές θεραπείες

Expert Reviews in Molecular Medicine

cambridge.org/erm

### Review

**One this article:** Beta 6, Zagari F, Antoniou GD, Ntzani EA, Zografos L, Markoulaki V, Tsakogiannis D (2021) Genetic variability of the HPV16 early genes and LCR. Present and future perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 23, 211–221. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1911114>

Received: 21 August 2021  
Revised: 20 July 2021  
Accepted: 29 October 2021

**Keywords:** Antimutated mutations; cervical cancer; early genes; HPV16; LCR; molecular biomarkers; nucleotide variations; oncogenes; transcription elongation

**Links for correspondence:**  
D. Tsakogiannis  
Email: [dtzakogi@med.upatras.gr](mailto:dtzakogi@med.upatras.gr)  
[tsakogi@med.upatras.gr](mailto:tsakogi@med.upatras.gr)

## Genetic variability of the HPV16 early genes and LCR. Present and future perspectives

G. Bletsas<sup>1</sup>, F. Zagouri<sup>1</sup>, G. D. Antoniazis<sup>1</sup>, M. Nikolaidis<sup>1</sup>, E. Zografos<sup>1</sup>, P. Markoulakis<sup>2</sup> and D. Tsakogiannis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Institute of Biomedical Sciences, Athens, Greece; <sup>2</sup>Department of Clinical Therapeutics, Metaxas Hospital, National and Kapodistrian University of Athens School of Medicine, Athens, Greece and <sup>3</sup>Bioinformatics Laboratory, Department of Biotechnology & Biotechnology, School of Health Sciences, University of Thessaly, Lamia, Greece

**Abstract:** Human papillomavirus 16 (HPV16) infection is the etiologic factor for the development of cervical dysplasia and is regarded as highly carcinogenic, because it is implicated in more than 50% of cervical cancer cases, worldwide. The tumorigenic potential of HPV16 has triggered the extensive sequence analysis of viral genomes in order to identify nucleotide variations and amino acid substitutions that influence viral oncogenicity and subsequently the initiation and progression of cervical cancer. Nowadays, specific mutations of HPV16 DNA have been associated with an increased risk of high grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer (CIC) development, including: 86 Q14H, E7P, L83V, E7, N29S, S63F, E2, H35Q, P219S, T310K, E2, I65V, whereas highly conserved regions of viral DNA have been extensively characterized. In addition, numerous viral HPV16 mutations are observed among the studied populations from various geographic regions, hence advocating that different HPV16 strains seem to emerge with different tumorigenic capacities. The present review focuses on the variability of the early genes and the long control region, emphasizing on the association of specific mutations with the development of severe dysplasia. Finally, it evaluates whether specific regions of HPV16 DNA are able to serve as valuable biomarkers for cervical cancer risk.

### Introduction

The Papillomaviridae family comprises a heterogeneous group of non-enveloped, double-stranded DNA viruses of 7748–4617 bp in size (Ref. 1). The analysis of the L1 gene contributed to the classification of Papillomaviruses (PVs) into genera, species, types, subtypes and variants whose PV genera in full-length sequence genomes present 23–45% nucleotide sequence similarity, whereas at the sequence level they share less than 60% nucleotide sequence homology (Refs 2–4). In addition, species within a genus have 60–70% L1 sequence similarity (Ref. 2, 3). A novel human papillomavirus (HPV) type has less than 90% similarity to any other HPV genotype (Ref. 5). HPV genomes are further grouped into intratype variants according to the whole genome sequence, defining variant lineages and sub-lineages by a divergence of 1–10% and 0.5–1%, respectively (Ref. 6–10). HPV infect the stratified epithelium of skin or mucous membranes and they are classified into five genera (Αλφαρρβιρσοειδών, Βεταρρβιρσοειδών, Γετορρβιρσοειδών, Διρρβιρσοειδών and Σιρρβιρσοειδών) (Ref. 2, 5, 11–15).

The HPV that infect the stratified epithelium are classified into the genus Αλφαρρβιρσοειδών (αίφρα HPV), and according to their tumorigenic capacity they are subdivided into high-risk (HR-HPV) and low-risk (LR-HPV) genotypes (Refs 2, 3, 12). In particular, 13 HPV genotypes have been characterized as high-risk (HPV16, 18, 21, 23, 25, 29, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82) (Ref. 14). Persistent infection with HR-HPVs over a period of several years, along with associated alterations in the host cell is responsible for cervical cancer development. Cervical cancer is the fourth most common cancer and the fourth leading cause of cancer-related death among women, worldwide (Refs 15, 16). With regards to clinical and epidemiological outcomes, HR-HPV16 infection is considered as the most prevalent sexually transmitted viral infection that is observed in more than 50% of cervical cancer incidences, worldwide (Refs 16–19).

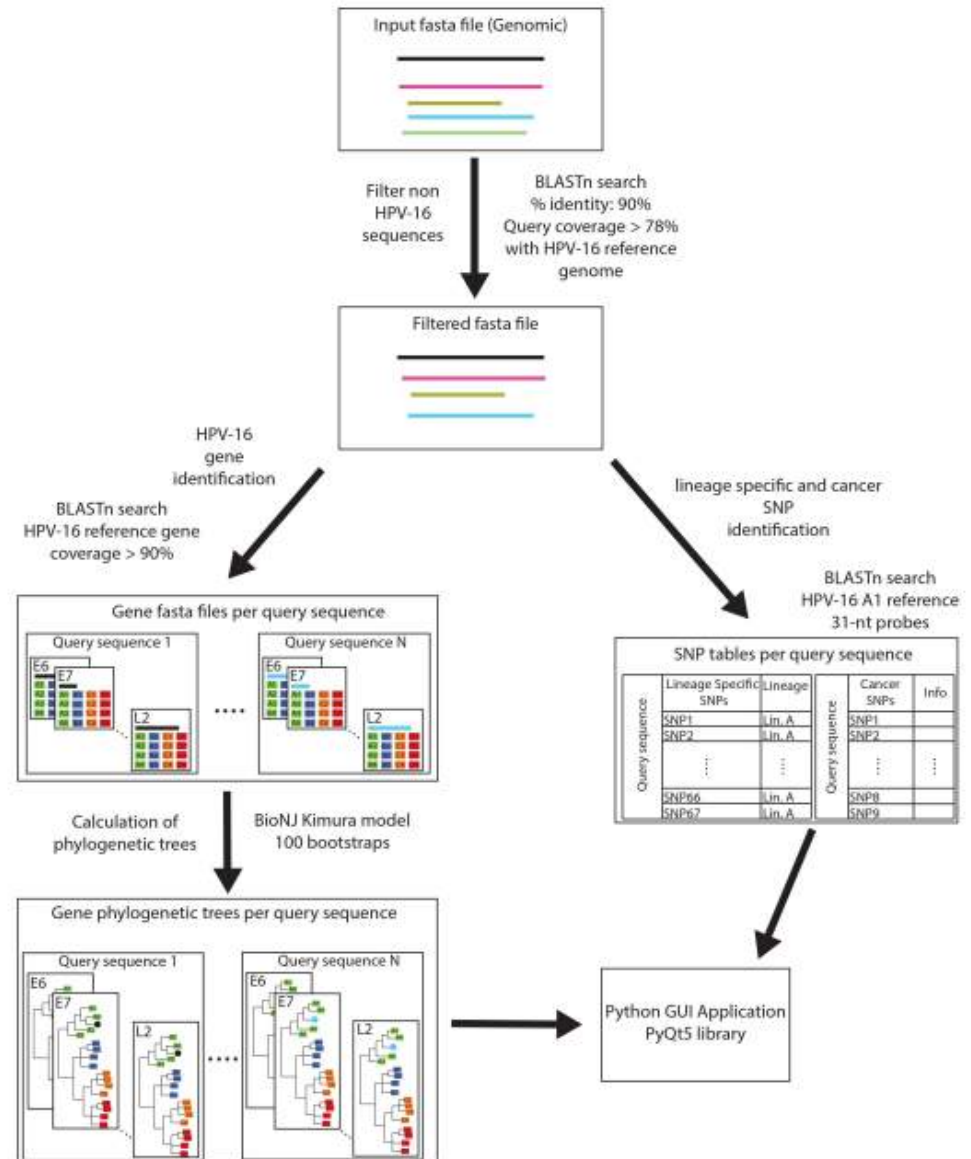
The HPV genome is approximately 8 kb in size and is divided into three regions: (i) the long control region (LCR) which contains binding sites of viral regulatory proteins (E1 and E2) and cellular transcription factors; (ii) the early region (E) that encodes for the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 genes and (iii) the late region (L) that encodes for the L1 and L2 genes (Ref. 13, 20). Over the last few decades, the strong tumorigenic capacity of HPV16 DNA triggered the extensive sequence analysis of the viral genome, thus leading to the detection of various nucleotide variations, whereas several of these nucleotide changes have been associated with immune escape, viral persistence and cervical cancer development (Refs 21, 22). Moreover, specific intratype nucleotide polymorphisms have been identified and associated with different geographic locations and ethnic groups, while they enabled the clustering of

© The Author(s), 2021. Published by Cambridge University Press

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

## HPV16 genotyper

- Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων
- Ανίχνευση HPV16 ενδοτυπικών πολυμορφισμών
- Ανίχνευση μεταλλάξεων που συνδέονται με την ογκογονικότητα



### HPV16-Genotyper: A Computational Tool for Risk-Assessment, Lineage Genotyping and Recombination Detection in HPV16 Sequences, Based on a Large-Scale Evolutionary Analysis

Michalis Nikolaidis<sup>1</sup>, Dimitris Tsakalanelis<sup>1</sup>, Georgia Elena<sup>1</sup>, Dimitris Moustakas<sup>2,3</sup>, Christine Koutalidi<sup>4,5</sup>, Ioannis Iliopoulos<sup>1</sup>, Panagiotis Mavroulakis<sup>1</sup> and Grigoris D. Anastasiadis<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Laboratory, Department of Biotechnology and Informatics, University of Thessaly, 42100 Lamia, Greece; <sup>2</sup> [anastasiadis@cc.uoi.gr](mailto:anastasiadis@cc.uoi.gr); <sup>3</sup> Research Center, Institute of Informatics, 42002 Agrinio, Greece; <sup>4</sup> [christine.koutalidi@uoi.gr](mailto:christine.koutalidi@uoi.gr); <sup>5</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>6</sup> National Biotechnology Institute, Biotechnology Department of Biotechnology and Informatics, University of Thessaly, 22401 Larissa, Greece; <sup>7</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>8</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>9</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>10</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>11</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>12</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>13</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>14</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>15</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>16</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>17</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>18</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>19</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>20</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>21</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>22</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>23</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>24</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>25</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>26</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>27</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>28</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>29</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>30</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>31</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>32</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>33</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>34</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>35</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>36</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>37</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>38</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>39</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>40</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>41</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>42</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>43</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>44</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>45</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>46</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>47</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>48</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>49</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>50</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>51</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>52</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>53</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>54</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>55</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>56</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>57</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>58</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>59</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>60</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>61</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>62</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>63</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>64</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>65</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>66</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>67</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>68</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>69</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>70</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>71</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>72</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>73</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>74</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>75</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>76</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>77</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>78</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>79</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>80</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>81</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>82</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>83</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>84</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>85</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>86</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>87</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>88</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>89</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>90</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>91</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>92</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>93</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>94</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>95</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>96</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>97</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>98</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>99</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr); <sup>100</sup> [ioannis.ilios@uoi.gr](mailto:ioannis.ilios@uoi.gr)

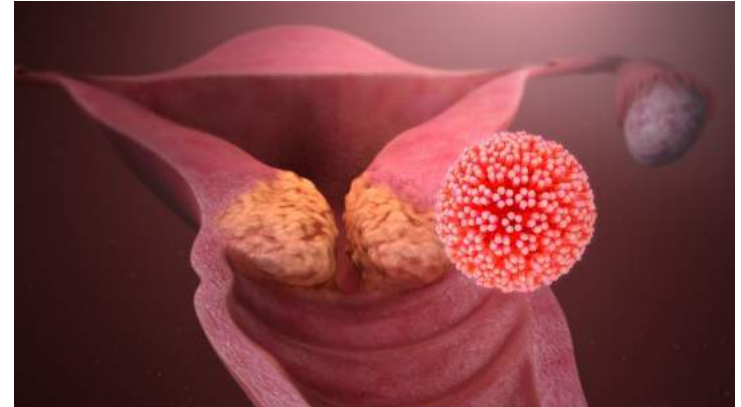
**Abstract:** Previous analyses have identified certain but limited evidence of recombination among HPV16 genomes in association with genital neoplasia. In this study, we performed a large-scale phylogenetic analysis of 300 publicly available complete and partial HPV16 genomes. By studying the phylogenetic relationships, we identify 16 new and the distribution patterns of long-range SNPs, we identify several potential recombination events between the two major HPV16 evolutionary clades. These new findings confirm the widely accepted phylogenetic tree topology (E6-E7-L2) and the BioNJ Kimura model phylogenetic tree topology (E6-E7-L2) for HPV16 genomes. In addition, we identify the presence of potential recombination events ranging between E6 and E7, which is low, but nevertheless considerable. Our findings have clinical implications and highlight that HPV16 genotyping and risk assessment based only on certain genetic regions may provide a false genotype and, therefore, its associated risk estimate. Finally, based on this analysis, we have developed a bioinformatics tool that automates the entire process of HPV16 lineage genotyping, recombination detection and further identification of the selected sequences. SNPs that have been reported in the literature to increase the risk of cancer.

**Keywords:** HPV16 evolution; phylogenetics; bioinformatics tool; cancer risk; SNPs; recombination

**1. Introduction**  
Human Papillomavirus (HPV) are members of the Papillomaviridae family that consist of a diverse group of small, non-enveloped, DNA viruses [1,2]. Currently, over 200 HPV genotypes have been completely characterized, while phylogenetically they are classified into two genera, including AlphaPapillomavirus (αHPV), BetaPapillomavirus (βHPV), GammaPapillomavirus (γHPV), DeltaPapillomavirus (δHPV) and Neopapillomavirus (NP) [3,4]. According to the Papillomavirus Nomenclature Committee, HPV genomes are further grouped into genotypes, variants that have more than 90% sequence similarity with the reference sequence of the L1 gene [5]. Another method of classification, depending on the relative genome sequence, defines variant lineages and sub-lineages by a difference of 1% to 30%, and 0.2% to 1%, respectively [6,7]. The Alpha HPV genus includes the most significant and they are subdivided into high-risk (HR-HPV) and low-risk (LR-HPV) genotypes.

# Έρευνα HPV

1. Μοριακή ανίχνευση HR – HPV DNA
2. Ανίχνευση HPV παραλλαγής
3. Μεταλλάξεις HPV DNA
4. Ενσωμάτωση ιού



Μπορεί να προσδιορίσει εξατομικευμένα τον κίνδυνο ανάπτυξης και εξέλιξης της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης





**Ευχαριστώ για την προσοχή σας !**