



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη μίας ταχύτατης τεχνικής Loop Mediated  
Isothermal Amplification για την ανίχνευση των  
ιών HPV-18

Development of a rapid technique Loop Mediated  
Isothermal Amplification for the detection of HPV-  
18 viruses

Γκιουζέλη Χριστίνα

Λάρισα 2017

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Ζ.ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (Ε.ΔΙ.Π.) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Δ.ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ:**

ΣΥΜΒΑΣΙΟΥΧΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Οκτώβριο του 2016 έως τον Ιούλιο του 2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας και παράλληλα για την αμέριστη στήριξη και βοήθεια του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και τον κ.Τσακογιάννη Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Μοσχονά Γεώργιο για την καθοδήγηση και την αρωγή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, τον διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την επίβλεψη, την προπτυχιακή φοιτήτρια Ζώτα Ιωάννα για τη βοήθεια και την υποστήριξη καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) είναι μικροί ιοί, περίπου 8000 ζευγών βάσεων χωρίς εξωτερικό περίβλημα που φέρουν κυκλικό δίκλωνο DNA ως γονιδίωμα. Οι ιοί φέρουν οχτώ ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ORFs και ο κύκλος ζωής τους εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων. Ο ιός στα ανθρώπινα κύτταρα μπορεί να βρίσκεται είτε σε επισωματική είτε σε ενσωματωμένη μορφή στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Οι βλάβες που προκαλούνται από τους HPV υψηλού κινδύνου έχουν την τάση να προκαλούν κακοήθεις όγκους στον τράχηλο της μήτρας. Συγκεκριμένα ο HPV16 αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ όλων των περιπτώσεων ενώ ο HPV18 προκαλεί το 10-20% αυτών. Επομένως λόγω του ογκογόνου δυναμικού και της υψηλής επικινδυνότητας τους κρίνεται αναγκαίο να ανιχνεύεται εύκολα και σε πρώιμα στάδια η παρουσία τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου για την τεχνική LAMP με στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών που θα εξασφαλίζουν την ταχύτητα, ευαισθητή και εξιδεικευμένη ανίχνευση των ιών HPV-18 σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας. Η ισόθερμη ενίσχυση με την τεχνική LAMP είναι μια μέθοδος ενίσχυσης που χαρακτηρίζεται από τη χρήση τεσσάρων ή έξι διαφορετικών εκκινήτων. Η ύπαρξη των αρκετών εκκινήτων εξασφαλίζει και την υψηλή εξειδίκευση για την ενίσχυση του τμήματος DNA με αποτέλεσμα η παρουσία του ενισχυμένου προϊόντος να υποδεικνύει και την παρουσία του γονιδίου στόχου.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας επιβεβαίωσαν την ικανότητα της να ανιχνεύει με επιτυχία τον ιό HPV-18 ακόμη και σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων και τόνισαν τα πλεονεκτήματα της τεχνικής LAMP που την καθιστούν σημαντική υποψήφια μελλοντική τεχνική για τη διάγνωση και την ανίχνευση μολύνσεων από τους ιούς HPV.

## **ABSTRACT**

The human papilloma viruses are small sized viruses of about 8000 pairs of bases with a circular double stranded DNA as a genome without an outer shell. The viruses carry eight open reading frames (ORF's) and their life cycle depends on the differentiation schedule of epithelial cells. On human cells the virus can be either in an episomal or in an integrated state on the host's genome.

The malfunctions caused by the high risk HPV's have a tendency to cause malignant tumors to the cervical womb. Specifically HPV16 viruses is responsible for about half of all the cervical cancer cases whereas HPV18 for about 10-20% of those. Therefore because of their oncogenic dynamics and high risk, their presence is vital to be easily detected in early stages of infection.

In the present work a protocol for the LAMP technique was developed with the goal to establishing the optimal conditions to ensure a fast, sensitive and specific HPV-18 virus detection in clinical samples of cervical womb. The isothermal LAMP technique is a method that is characterized by the use of four to six different primers fact that ensures the high specificity and sensitivity of the technique.

The results from the application of this technique in clinical samples of cervical womb confirmed that this technique successfully detected the presence of HPV18 virus even if this was present in low copies number and emphasized the advantages of the LAMP technique as an important future candidate for the detection of infections from HPV viruses.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>9</b>
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	9
1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ών.....	9
1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV).....	11
1.3.1. Δομή του ιικού καψιδίου.....	11
1.3.2. Η ιική πρωτεΐνη L1.....	12
1.3.3. Η ιική πρωτεΐνη L2.....	12
1.4. Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος.....	12
1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1.....	14
1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2.....	15
1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4.....	15
1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5.....	16
1.4.5. Η ιική πρωτεΐνη E6.....	16
1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7.....	18
1.5. Οι δύο μορφές του ιικού γονιδιώματος.....	19
1.6. Κύκλος ζωής των HPVs.....	21
1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	21
1.6.2. Αντιγραφή του ιού.....	21
1.6.3. Μεταγραφή του ιού.....	23
1.6.4. Συναρμολόγηση και απελευθέρωση του ιικού καψιδίου.....	23

1.7. Ιστολογικές αλλοιώσεις- Εμβόλια.....	24
<b>2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>25</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>26</b>
3.1. Εκχύλιση DNA από κύτταρα HeLa.....	26
3.2. PCR σε DNA από κύτταρα HeLa.....	26
3.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR .....	27
3.4. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης.....	28
3.5. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR που απομονώθηκαν.....	28
3.6. Διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις των πλασμιδίων.....	30
3.7. Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων.....	30
3.8. Η τεχνική Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) .....	31
I. Αρχές της μεθόδου.....	31
II. Δομή εκκινητών.....	31
III. Στάδια ενίσχυσης του στόχου.....	31
3.9. Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP.....	34
3.10. LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων.....	34
3.11. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP.....	35
3.12. Κλινικά δείγματα.....	35
3.13. Εκχύλιση DNA.....	37
3.14. Έλεγχος επιτυχίας της εκχύλισης.....	38
3.15. LAMP στα κλινικά δείγματα.....	39

3.16. Real-Time PCR στα κλινικά δείγματα και στις αραιώσεις των πλασμιδίων.....	39
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>41</b>
4.1. Real-Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων.....	41
4.1.1. Πρότυπη καμπύλη (Standard curve).....	41
4.2. LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων.....	42
4.3. PCR και LAMP στα κλινικά δείγματα.....	43
4.4. Ηλεκτροφόρηση PCR θετικών και αρνητικών κλινικών δειγμάτων.....	46
4.5. Ηλεκτροφόρηση LAMP θετικών και αρνητικών δειγμάτων.....	47
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>48</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>51</b>



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **1.1. Γενικά χαρακτηριστικά**

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) είναι μικροί ιοί , περίπου 8000 ζευγών βάσεων χωρίς εξωτερικό περίβλημα που φέρουν κυκλικό δίκλωνο DNA ως γονιδίωμα . Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 150 διαφορετικοί γονότυποι HPV, εκ των οποίων περίπου οι 40 μολύνουν τον βλεννογόνο των γεννητικών οργάνων[1]. Οι HPV μπορεί να οδηγήσουν είτε στην ανάπτυξη καλοθών νεοπλασιών, όπως είναι τα κονδυλώματα , είτε σε τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Υπάρχει πολύ ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της προόδου της κακοήθειας και ορισμένων τύπων HPV όπως HPV16, HPV18, HPV31, HPV45,κ.α. Οι HPV 16, 18 και 31, σχετίζονται με περισσότερο από το 90% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας [1]. Από αυτούς, ο HPV16 αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ όλων των περιπτώσεων ενώ ο HPV18 προκαλεί το 10-20% αυτών [2].

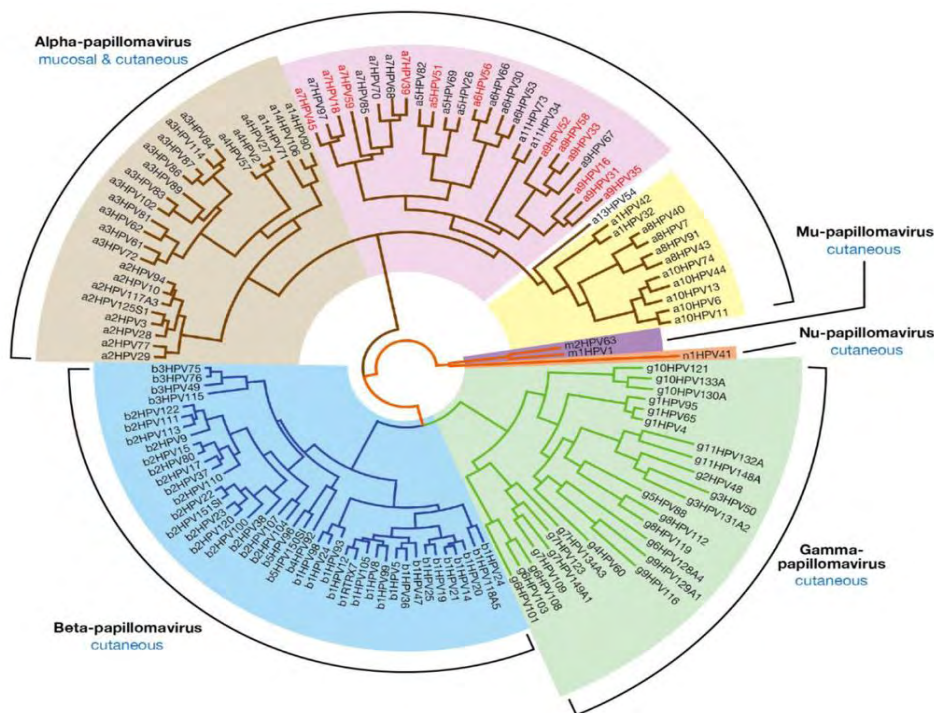
### **1.2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών**

Οι ιοί των θηλωμάτων είναι μία ομάδα μικρών κυκλικών δίκλωνων DNA ιών, χωρίς εξωτερικό περίβλημα και διάμετρο καψιδίου περίπου 55 nm[26]. Αρχικά, ανήκαν μαζί με τους πολυώμα ιούς σε μία κοινή οικογένεια, τους Papovaviridae. Η κατάταξη αυτή βασίστηκε στην παρουσία καψιδίων χωρίς εξωτερικό περίβλημα και κυκλικών δίκλωνων DNA γονιδιωμάτων και στους δύο ιούς. Αργότερα όμως, επειδή διαπιστώθηκε έπειτα από αλληλούχηση ότι οι δύο ομάδες ιών διέφεραν στην οργάνωση , το μέγεθος ,τη νουκλεοτιδική και την αμινοξική αλληλουχία αποφασίστηκε επίσημα από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) ότι αποτελούν δύο ξεχωριστές οικογένειες :την οικογένεια των Papillomaviridae και την οικογένεια των Polyomaviridae [5,7] .

Αν και οι πρώτοι τύποι HPV απομονώθηκαν πριν από αρκετές δεκαετίες , η δυσκολία εύρεσης κατάλληλων συστημάτων κυτταροκαλλιέργειας (τελικώς διαφοροποιούμενων επιθηλιακών κυττάρων ) για τη καλλιέργεια αυτών των ιών έχει καθυστερήσει την πρόοδο στη μελέτη των λειτουργιών του ιού και έχει περιορίσει τη δημιουργία μιας ταξινόμησης που βασίζεται σε βιολογικές ιδιότητες. Αυτό το τεχνικό πρόβλημα ήταν επίσης ένας λόγος που δεν χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο όρος "στέλεχος". Επιπλέον, οι HPV δεν προκαλούν ισχυρές αποκρίσεις αντισωμάτων, επομένως παρεμποδίστηκε η ταξινόμηση βάσει του προσδιορισμού του "οροτύπου" τους . Δεδομένου λοιπόν ότι οι ιοί αυτοί δεν υπόκεινται στις κλασσικές τεχνικές καλλιέργειας ακολουθήθηκε μια προσέγγιση ταξινόμησης που βασίστηκε σε ομοιότητες νουκλεοτιδικών αλληλουχιών [5,6]. Επομένως, για την ταξινόμηση επιλέχθηκε το γονίδιο L1 των HPVs καθώς παρουσιάζει έλλειψη ενδείξεων ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφόρων τύπων των ιών των θηλωμάτων και είναι σχετικά

συντηρημένο γονίδιο εντός του γονιδιώματός τους. Ορίστηκε τελικά ότι μεταξύ των διαφόρων τύπων των Papilloma ιών, η διαφορά στην αλληλουχία του L1 ORF είναι μεγαλύτερη από 10%, ενώ για τους υποτύπους η διαφορά είναι 2-10% και για τις παραλλαγές μικρότερη από 2% [7,8].

Οι ανθρώπινοι θηλωματοϊοί έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε διαφορετικά γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu). Οι ιοί που ανήκουν στο γένος alpha προκαλούν αλλοιώσεις στο βλεννογόνο και στο δερματικό επιθήλιο και διακρίνονται σε ιούς υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Οι ιοί που ανήκουν στα υπόλοιπα γένη μολύνουν κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος [9].



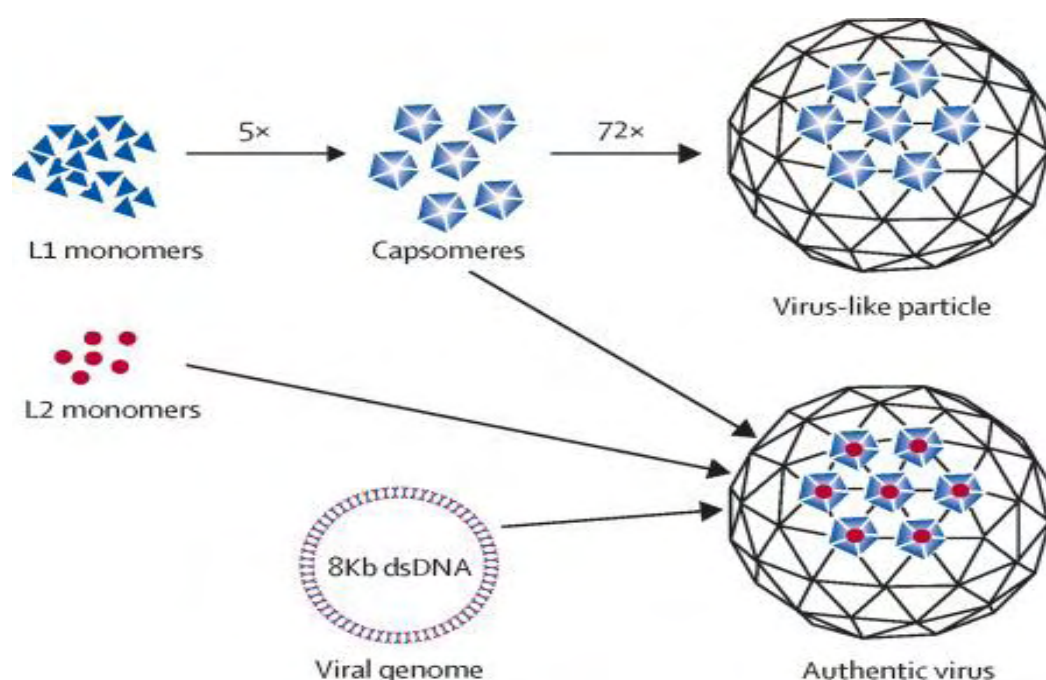
Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των πέντε γενών των ανθρώπινων θηλωματοϊών [10].

Επιπλέον οι HPVs ταξινομούνται σύμφωνα με τον τροπισμό τους, σε δύο κύριες ομάδες, στους HPV που μολύνουν το δερματικό επιθήλιο και σ' αυτούς που μολύνουν το βλεννογόνο επιθήλιο. Οι HPV του βλεννογόνου επιθηλίου ομαδοποιούνται περαιτέρω σε τύπους υψηλού κινδύνου (High Risk HPV), ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk HPV) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk HPV). Οι βλάβες που προκαλούνται από τους HPV υψηλού κινδύνου έχουν την τάση να προκαλούν κακοήθεις όγκους στον τράχηλο της μήτρας. Αντίθετα, οι βλάβες που προκαλούνται από HPV χαμηλού κινδύνου έχουν πολύ μικρότερο κίνδυνο για κακοήγη εξέλιξη [11, 12].

### 1.3. Δομή των Human Papillomavirus (HPV)

#### 1.3.1. Δομή του ιικού καψιδίου

Το καψίδιο των ιών HPV δεν φέρει εξωτερικό περίβλημα, και παρουσιάζει  $T = 7$  εικοσαεδρική συμμετρία που σχηματίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ 72 πενταμερών της κύριας πρωτεΐνης καψιδίου που κωδικοποιείται από το γονίδιο L1. Η δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου L2 συνδέεται με τα πενταμερή της κύριας πρωτεΐνης L1 [4].



Εικόνα1.2: Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου από τις πρωτεΐνες L1 και L2 [13].

Οι πρωτεΐνες L1 και L2 του καψιδίου εκφράζονται μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα στις ανώτερες στιβάδες του πλακώδους επιθηλίου και για τη συναρμολόγηση τους σε εικοσαεδρικά καψίδια απαιτούν τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών (chaperones). Εντός του καψιδίου περιέχεται το κυκλικό ιικό γονιδίωμα του ιού το οποίο και μεταβάλλει την τελική δομή του καψιδίου. Επίσης στο εσωτερικό του καψιδίου εκτός από την πρωτεΐνη L2 και το ιικό DNA, μπορεί να υπάρχει ένας μικρός πληθυσμός άγνωστων ικών και / ή κυτταρικών πρωτεϊνών όπως chaperones και καρυοφαιρίνες που επηρεάζουν την τελική δομή των ισοματίων [4,14].

### **1.3.2. Η ιική πρωτεΐνη L1**

Συγκεκριμένα η κύρια πρωτεΐνη L1 έχει μέγεθος περίπου 55 kD και ικανότητα να συναρμολογείται αυθόρμητα σε virus-like particles (VLPs). Επειδή η L1 σχηματίζει ολόκληρη την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου, προφανώς πρέπει να μεσολαβεί στην αρχική προσκόλληση στους ιστούς ή τα κύτταρα του ξενιστή. Μετά την προσκόλληση στα κύτταρα, η L1 πρέπει να γίνει αρκετά εύκαμπτη ώστε τελικά να επιτρέψει την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό του νέου κυττάρου στόχου [7]. Μετά τη μόλυνση, ο ιός διακινείται μέσω των ενδοκυτταρικών οδών προς τον πυρήνα και το καψίδιο L1 αφαιρείται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας [16].

Η καρβόξυ-τελική περιοχή της πρωτεΐνης L1 όπου δεσμεύεται η πρωτεΐνη L2 χαρακτηρίζεται από πολλά κατάλοιπα προλίνης (PxxP). Καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης L2 στην L1 δεν επηρεάζεται σημαντικά από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ασθενών απορρυπαντικών, ουρίας και pH, φαίνεται ότι ο κύριος τρόπος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών L1- L2 είναι υδρόφοβος [14].

### **1.3.3. Η ιική πρωτεΐνη L2**

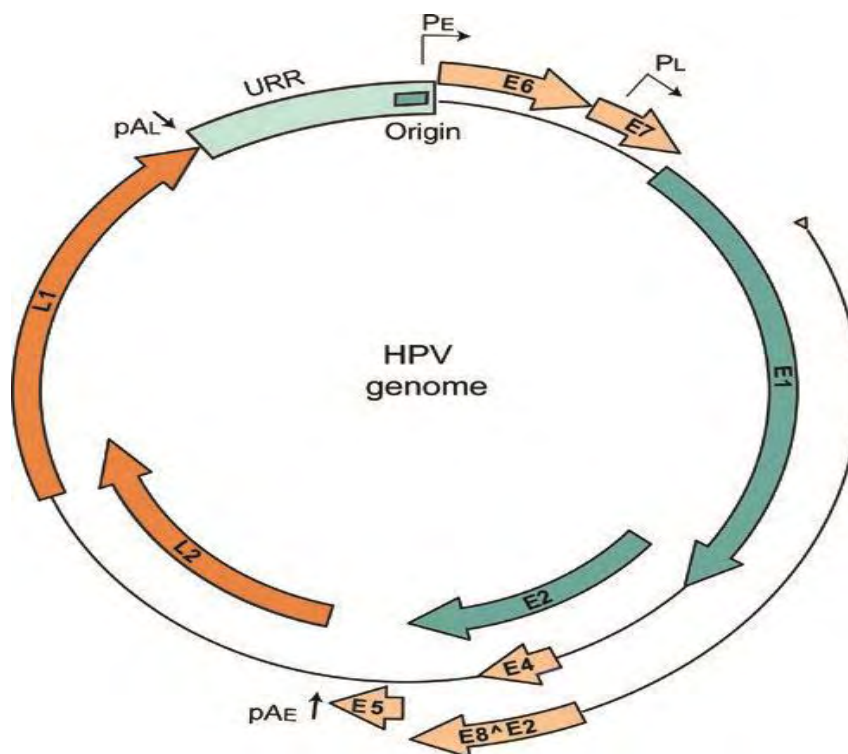
Η δευτερεύουσα πρωτεΐνη L2 έχει μήκος μικρότερο των 500 αμινοξέων, το οποίο αντιστοιχεί σε εκτιμώμενη μοριακή μάζα περίπου 55 KDa. Η δευτερεύουσα πρωτεΐνη L2, είναι απαραίτητη για τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης από τον ιό HPV, καθώς επίσης και για τη συσκευασία του ιικού γονιδιώματος σε καψίδια στα τελευταία στάδια της μόλυνσης [14].

## **1.4.Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος**

Παρά το μικρό τους μέγεθος, η μοριακή βιολογία των ιών HPV είναι περίπλοκη [5]. Όλοι οι θηλωματοϊοί περιέχουν ένα δίκλωνο κυκλικό DNA γονιδίωμα μεγέθους περίπου 8 kb, το οποίο μπορεί να χωριστεί σε τρεις μεγάλες περιοχές: την πρώιμη, την όψιμη και τη μακρά περιοχή ελέγχου (LCR ή μη κωδικοποιούσα περιοχή NCR). Οι τρεις αυτές περιοχές σε όλους τους HPV διαχωρίζονται από δύο θέσεις πολυαδενυλίωσης (pA): την πρώιμη θέση pA (AE) και την όψιμη pA (AL). Η πρώιμη περιοχή καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γονιδιώματος του ιού και κωδικοποιεί για έξι ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ORFs (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) [26]. Οι πρώιμες πρωτεΐνες μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε δύο ρυθμιστικά γονίδια που εμπλέκονται στην αντιγραφή και τη μεταγραφή (E1 και E2), τρία ογκογονίδια (E5, E6 και E7) και την E4 που συμβάλλει στην παραγωγή ιοσωματίων και

στην πραγματικότητα παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης πλησιέστερο προς τις όψιμες πρωτεΐνες .

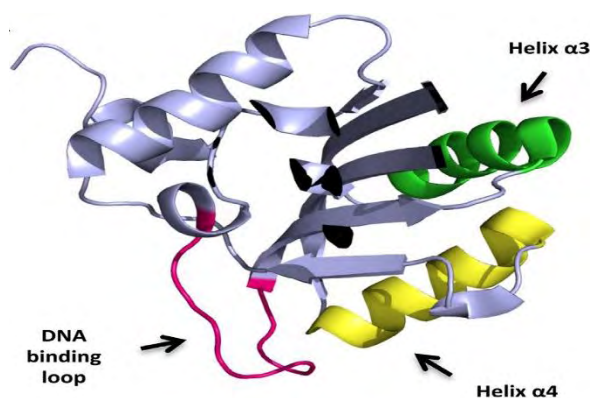
Η όψιμη περιοχή, που καλύπτει σχεδόν το 40% του γονιδιώματος του ιού, βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής και κωδικοποιεί για δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια L1 και L2 . Η περιοχή LCR, ένα τμήμα περίπου 850 bp (10% του γονιδιώματος του ιού HPV), δεν κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη, αλλά φέρει την θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και πολλαπλές θέσεις σύνδεσης παραγόντων μεταγραφής που είναι απαραίτητοι για τη ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II από πρώιμους και από όψιμους υποκινητές . Στο γονιδίωμα του ιού HPV υπάρχουν δύο κύριοι υποκινητές, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του. Ο υποκινητής PE (early promoter, ή αλλιώς p105 στον HPV-18), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και ο υποκινητής PL (late promoter), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα [14,26].



Εικόνα1.3: Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ανθρώπινου ιού θηλώματος (HPV). Οι πρωτεΐνες αντιγραφής , E1 και E2, παρουσιάζονται με σκούρο κυανό. Οι δομικές πρωτεΐνες εμφανίζονται με πορτοκαλί χρώμα. Η URR, είναι η ανοδική ρυθμιστική περιοχή. Τα P<sub>E</sub> και P<sub>L</sub> είναι οι πρώιμοι και όψιμοι υποκινητές και οι pA<sub>E</sub> και pA<sub>L</sub> είναι οι πρώιμες και οι όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης. Εμφανίζεται και η θέση έναρξης της αντιγραφής ori [15].

### 1.4.1. Η ιική πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που εμφανίζει δραστικότητα ATPάσης σε συνδυασμό με δραστικότητα εξαμερούς DNA ελικάσης με κατεύθυνση 3' προς 5'. Η E1 κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο και πιο συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδιώματος των HPV και το μέγεθός της κυμαίνεται από 600 έως 650 αμινοξέα, ανάλογα με τον τύπο του ιού.



Εικόνα 1.4: Απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης E1 [3].

Η πρωτεΐνη μπορεί να διακριθεί σε τρία λειτουργικά τμήματα: μια αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή που είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη αντιγραφή του γονιδιώματος αποτελείται από περίπου 200 αμινοξέα και είναι το λιγότερο συντηρημένο τμήμα της πρωτεΐνης, μια κεντρική περιοχή δέσμευσης της θέσης έναρξης της αντιγραφής (ori) ,γνωστή ως περιοχή δέσμευσης DNA, (DBD) και μια καρβόξυ-τελική επικράτεια που είναι σημαντική για τη αυτοσυγκρότηση εξαμερών που είναι ικανά να ξετυλίγουν το δίκλωνο DNA μπροστά από την αντιγραφική διχάλα, με τρόπο εξαρτώμενο από την ATP [3]. Επιπλέον η E1 που είναι υπεύθυνη για την πιστή αντιγραφή του ιικού επισώματος απαιτείται σε όλο τον κύκλο αντιγραφής του ιού, αρχικά για να αυξηθεί ο αριθμός των αντιγράφων του επισώματος του ιού μετά από μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και κατόπιν για να διατηρηθεί ένα σταθερό επίπεδο επισωμάτων στα κύτταρα που μετατοπίζονται ανοδικά στο επιθήλιο και αρχίζουν να διαφοροποιούνται. Η E1 συνδέεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής σε μία παλίνδρομη αλληλουχία 18-νουκλεοτιδίων πλούσια σε A/T. Τέλος προάγει την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου ζωής του ιού που λαμβάνει χώρα στα ανώτατα διαφοροποιημένα επιθηλιακά στρώματα [3,17,55].

Συγκεκριμένα για την έναρξη της αντιγραφής του DNA του ιού HPV18 έχει αποδειχθεί ότι απαιτούνται οι δύο πρωτεΐνες E1 και E2, μια θέση έναρξης της αντιγραφής που περιέχει τρεις θέσεις δέσμευσης της E2 πλησίον του P105 (πρώιμου) υποκινητή του HPV18, και τις παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες που είναι πλούσιες σε A / T και περιλαμβάνουν την θέση δέσμευσης E1 [55].

### 1.4.2. Η ιική πρωτεΐνη E2

Οι πρωτεΐνες E2 δεσμεύονται με μοτίβα DNA 12 bp (ACCGN<sub>4</sub>CGGT ή ACCN<sub>6</sub>GGT) που βρίσκονται κυρίως εντός της ανοδικής ρυθμιστικής περιοχής (URR) του ιικού γονιδιώματος και εκφράζονται σε πρώιμα και ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Οι πρωτεΐνες E2 είναι πολυλειτουργικές και εμπλέκονται σε πολλές ιικές διεργασίες, οι οποίες συνδέονται κυρίως με την μεταγραφή και την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη E2 που εκφράζεται από ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E2 (ORF) αποτελείται από μία συντηρημένη N-τελική επικράτεια περίπου 200 αμινοξέων συνδεδεμένη σε μία C-τελική επικράτεια σύνδεσης DNA/διμερισμού (Cterminal DNA binding/dimerization domain) μήκους περίπου 100 αμινοξέων. Οι δύο περιοχές συνδέονται με μια ευέλικτη αλληλουχία, που συχνά ονομάζεται "άρθρωση" η οποία ποικίλλει σε μήκος και αλληλουχία μεταξύ διαφορετικών γενών των ιών θηλώματος. Οι πρωτεΐνες E2 είναι οι κύριοι μεταγραφικοί ρυθμιστές των θηλωματοϊών. Η E2 καταστέλλει τον πρώιμο ιικό υποκινητή, μειώνοντας έτσι την έκφραση E6 και E7. Συγκεκριμένα η δέσμευση του E2 σε αλληλουχίες αναγνώρισης πλησίον του πρώιμου υποκινητή P105 του HPV18 καταστέλλει τη μεταγραφή, ενώ ενεργοποιεί την αντιγραφή παρουσία της E1. Ο πρωταρχικός του ρόλος είναι να στρατολογεί την E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Η N-τελική επικράτεια του E2 αλληλεπιδρά με τη μεγάλη C-τελική επικράτεια της πρωτεΐνης E1 που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στην ορί και την ελικάση. Επιπλέον η E2 αλληλεπιδρά με την δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου L2 γεγονός που είναι σημαντικό για τη βελτίωση της συσκευασίας αργά στη μόλυνση. Τέλος η E2 μπορεί να στρατολογήσει το E7 στα μιτωτικά χρωμοσώματα στην όψιμη μίτωση [15,18,55].

### 1.4.3. Η ιική πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 κωδικοποιείται από ένα ματισμένο μετάγραφο mRNA E1<sup>Δ</sup>E4. Το γονιδιακό προϊόν HPV E4 εκφράζεται ως πρωτεΐνη σύντηξης E1<sup>Δ</sup>E4 που περιέχει τα 5 αμινοτελικά αμινοξέα της E1 στο N-τελικό άκρο του. Η ικανότητα της E4 να διακόπτει το κυτταρικό δίκτυο κερατίνης και το σχηματισμό του κερατοειδούς περιβλήματος μπορεί να διευκολύνει την απελευθέρωση και τη μετάδοση του ιού. Επιπλέον η έκφραση της E4 καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και διακόπτει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μετάβασης G2 / M. Η συμβολή της στην ενίσχυση του γονιδιώματος δεν έχει ακόμη καθοριστεί πλήρως, αλλά μπορεί να περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της E4 με κινάσες, τη σύνδεσή της με την E2 και την ικανότητα διακοπής του κυτταρικού κύκλου. Τέλος τα μετάγραφα E1<sup>Δ</sup>E4 είναι τα πιο άφθονα και το ίδιο ισχύει και για την πρωτεΐνη E4 σε αρκετές περιπτώσεις κονδυλωμάτων όπου αποτελεί το 20-30% της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών [11,19].

#### 1.4.4. Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη με μέγεθος που κυμαίνεται από 40 έως 85 αμινοξέα και η οποία εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυττάριας μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου ενώ σπανιότερα μπορεί να εντοπιστεί και στον πυρηνικό φάκελο. Φέρει πλευρικές αλυσίδες που μπορούν να αλληλεπιδρούν εντός της μεμβράνης με άλλα μόρια της E5 πρωτεΐνης, ή με τα διαμεμβρανικά τμήματα κυτταρικών πρωτεϊνών. Η παρουσία της στο ιικό γονιδίωμα συσχετίζεται με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες E5 μπορούν να συμβάλουν στην καρκινογένεση. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι στοχεύουν τον υποδοχέα PDGF β και τον υποδοχέα του EGF. Συνδέονται επίσης με την ΑΤΡάση των χυμοτοπίων, επηρεάζουν την έκφραση MHC τάξης I και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, το γονίδιο E5 στους ιούς HPV18 συχνά διαγράφεται μετά την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή και η ανίχνευση της E5 πρωτεΐνης σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας έχει αποδειχθεί δύσκολη υπόθεση [8,20,21].

#### 1.4.5. Η ιική E6 πρωτεΐνη

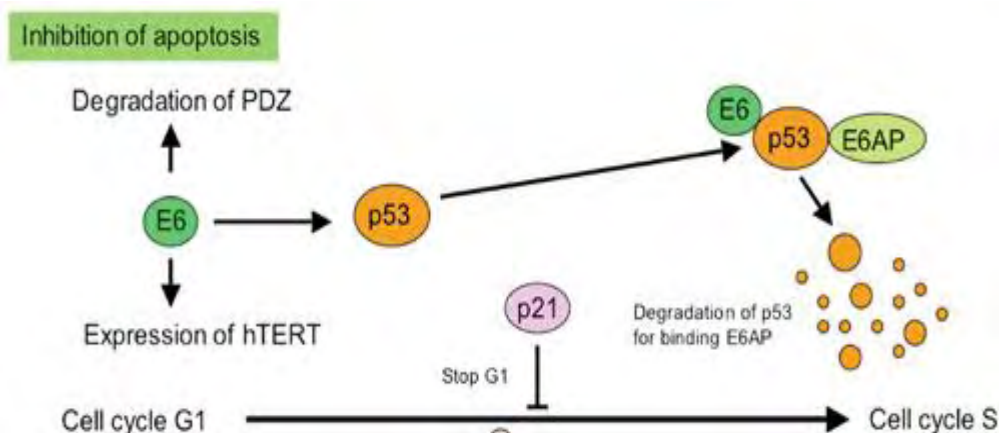
Η πρωτεΐνη E6 είναι μία ογκοπρωτεΐνη που εκφράζεται από τον πρώιμο υποκινητή των ιών HPV. Έχει μικρό μέγεθος (151 αμινοξέα), φέρει μία περιοχή δέσμησης ψευδαργύρου στο καρβόξυ-τελικό άκρο της και είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό και την αθανатоποίηση των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από HPV [22].

Η βασικότερη λειτουργία της ογκοπρωτεΐνης E6 είναι η αδρανοποίηση και η αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Συγκεκριμένα η E6 προάγει την καταστολή της p53 μέσω της αλληλεπίδρασής της με την κυτταρική E3 λιγάση της ουβικιτίνης με επακόλουθο σχηματισμό του τριμερούς συμπλόκου της E6 / E6-AP / p53 που καταλήγει τελικά στην πολυουβικιτίνωση και την αποικοδόμηση της p53 [2,22]. Η E6 καταστέλλει επίσης τη μεταγραφή της p53 παρεμποδίζοντας την ακετυλίωση που προκαλείται από τη p300. Με την αδρανοποίηση της p53, ο ιός όχι μόνο αποτρέπει την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων και διευκολύνει την αντιγραφή του DNA του που διαφορετικά θα είχε μπλοκαριστεί από την p53, αλλά επίσης ευνοεί την ογκογένεση παρεμποδίζοντας τον έλεγχο της ακεραιότητας του γονιδιώματος από την p53 [22,23]. Αντίθετα οι πρωτεΐνες E6 των ιών χαμηλού κινδύνου δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν αποικοδόμηση της p53 παρόλο που είναι ικανοί να συνδεθούν μαζί της αν και με χαμηλότερη συγγένεια απ' ό,τι οι HPV υψηλού κινδύνου [24].



Επιπλέον η E6 μόνο των ιών υψηλού κινδύνου μέσω μιας σύντομης αμινοξικής αλληλουχίας στο καρβοξυτελικό άκρο μεσολαβεί στην αποικοδόμηση αρκετών πρωτεϊνών που περιέχουν PDZ περιοχές οι οποίες εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση και στην πολικότητα των κυττάρων [22,25]. Το μοτίβο PDZ απουσιάζει από την πλειοψηφία των ιών χαμηλού κινδύνου και μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης ογκογόνου δυναμικού [24].

Επιπλέον, η πρωτεΐνη E6 προάγει την κυτταρική αθανατοποίηση αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης (ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού ενζύμου που προσθέτει επαναλήψεις τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων [22] ) μέσω αποικοδόμησης του καταστολέα της μεταγραφής της. Μία πιθανότητα είναι ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης επιτρέπει την επέκταση της διάρκειας ζωής των κερατινοκυττάρων και παρέχει πλεονέκτημα στην ιική αντιγραφή [27,28].



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση των βασικών μηχανισμών δράσης της ογκοπρωτεΐνης E6 [29].

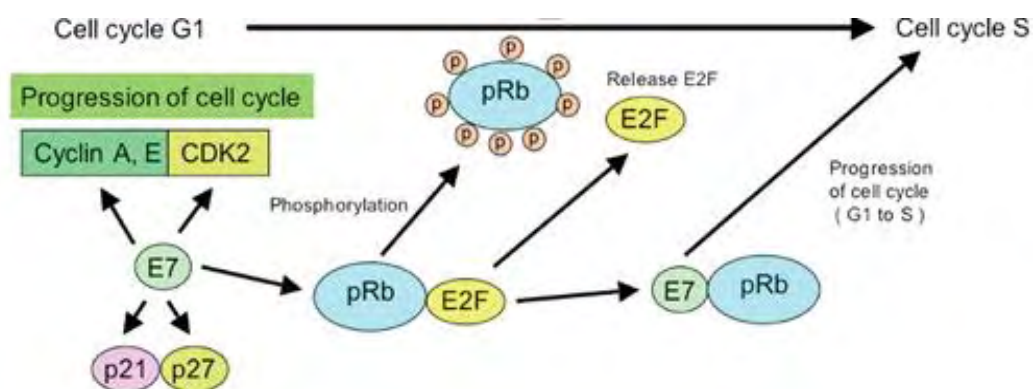
Η ενεργοποίηση του NF-κB είναι σημαντική για τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων . Οι E6 πρωτεΐνες από ιούς υψηλού κινδύνου είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον NF-κB [27,29].

Τόσο οι πρωτεΐνες E6 των ιών υψηλού κινδύνου όσο και των ιών χαμηλού κινδύνου μπορούν να δεσμευτούν στην προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bak για να προκαλέσουν την αποικοδόμηση της. Η Bak έχει ομολογία με τη Bcl-2 και δρα στα μιτοχόνδρια αλλά έχει αντίθετο αποτέλεσμα από τη Bcl-2 όσον αφορά στην αποπτωτική ενεργοποίηση . Η πρωτεΐνη Bak προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση του καταρράκτη αποπτωτικών κασπασών οδηγώντας σε απόπτωση. Η ικανότητα της E6 να αποικοδομεί τη Bak είναι ανεξάρτητη από την αδρανοποίηση της p53, αν και η p53 είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την Bak. Οι υψηλού κινδύνου πρωτεΐνες E6 μπορούν να δεσμευτούν στην προκασπάση 8 και να εμποδίσουν τα κύτταρα που εκφράζουν την E6 να αποκριθούν σε αποπτωτικά ερεθίσματα [27,30].

### 1.4.6. Η ιική πρωτεΐνη E7

Η ογκοπρωτεΐνη E7 είναι μια μικρή πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που διαχωρίζεται σε τρεις συντηρημένες περιοχές τις CR1, CR2 και CR3 [2]. Η περιοχή CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE (όπου το X είναι οποιοδήποτε κατάλοιπο, L λευκίνη, C κυστεΐνη και E γλουταμινικό οξύ), μέσω του οποίου η E7 δεσμεύει και απενεργοποιεί την pRB και τα μέλη της οικογένειάς του p107 και p130 [1,23,31]. Οι πρωτεΐνες E7 (όσο και οι E6) είναι απαραίτητες για την επαγωγή και τη διατήρηση του κυτταρικού μετασχηματισμού, λόγω της παρεμβολής τους στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση [2].

Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες pRB είναι οι κύριοι αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μετάβασης από τη φάση G1 στην φάση S μέσω δέσμευσης στους παράγοντες μεταγραφής E2F, η απενεργοποίηση της pRB οδηγεί σε ιδιοσύστατη ενεργοποίηση του E2F, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί ένα πλήθος γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA στη φάση S. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η διαμεσολαβούμενη από E7 αποικοδόμηση του pRB απαιτεί την καλπαΐνη, μία πρωτεάση κυστεΐνης ενεργοποιούμενη από το ασβέστιο. Ως πρώτο βήμα, η E7 συνδέει την καλπαΐνη στη pRB και προωθεί την επαγόμενη από καλπαΐνη διάσπαση της pRB στο καρβοξυτελικό άκρο, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση του E2F. Αυτό το γεγονός είναι η προϋπόθεση για την επακόλουθη πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της pRB [1].



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων αποικοδόμησης της πρωτεΐνης RB από την ογκοπρωτεΐνη E7. [29]

Η περιοχή CR1 είναι σημαντική για τον κυτταρικό μετασχηματισμό που προκαλείται από την E7. Επιπρόσθετα η E7 αλληλεπιδρά με τον p600 (RB protein associated factor), μέσω του CR1 [1]. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης E7 των ιών υψηλού κινδύνου είναι η δυνατότητα δέσμευσης διαφόρων τροποποιητών χρωματίνης όπως είναι οι απακετυλάσες ιστονών (HDACs) μέσω δακτύλων ψευδαργύρου της πρωτεΐνης E7 [24,32]. Στόχος τους είναι η παρεμπόδιση της δράσης των HDACs στους υποκινητές οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής [24].

Οι E7 πρωτεΐνες των ιών υψηλού κινδύνου συμβάλλουν επίσης στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (cdks). Οι cdk2 ρυθμίζονται αρνητικά από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs). Η έκφραση των κυκλινών E και A, οι οποίες είναι οι ρυθμιστικές υπομονάδες του cdk2, εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα σε κύτταρα που εκφράζουν E7 . Οι CKIs p21 και p27 ρυθμίζουν τη διακοπή της ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της επιθηλιακής διαφοροποίησης και η p21 δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας στην καρκινική ανάπτυξη . Το cdk2 είναι ο κύριος στόχος των p21 και p27 στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα . Οι υψηλού κινδύνου πρωτεΐνες E7 ρυθμίζουν την δραστηριότητα cdk2 δεσμεύοντας τις p21 και p27 μέσω των καρβοξυτελικών τους άκρων, εξουδετερώνοντας έτσι αποτελεσματικά τις ανασταλτικές επιδράσεις στις δραστηριότητες των κινασών . Αυτό οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα cdk2 σε κύτταρα που εκφράζουν E7 παρά τα υψηλά επίπεδα p21 [24,33].

Η συσσώρευση μεταβολών στα κυτταρικά γονίδια που προέρχονται από τη γενωμική αστάθεια θεωρείται ότι παίζει έναν αιτιώδη ρόλο στην ανάπτυξη των περισσότερων ανθρώπινων καρκίνων . Είναι γνωστό ότι τα E6 και E7 μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια. Έτσι, οι πρωτεΐνες E6 και E7 επάγουν αριθμητικές ανωμαλίες των κεντροσωμάτων και τελικά ανευπλοειδίες σε κύτταρα που τις υπερεκφράζουν [1,34] . Τέλος οι υψηλού κινδύνου HPV πρωτεΐνες E6 και E7 έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την έμφυτη ανοσοαπόκριση μειώνοντας την έκφραση γονιδίων απόκρισης στις ιντερφερόνες (IFN) [1].

### **1.5.Οι δύο μορφές του ιικού γονιδιώματος**

Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου ζωής του ιού HPV, η μεταγραφή των E6 και E7 από τον ιό που βρίσκεται σε επισωματική μορφή ρυθμίζεται στενά από τον παράγοντα μεταγραφής E2 και η έκφραση των E6 και E7 στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της βασικής μεμβράνης είναι δύσκολα ανιχνεύσιμη. Η χαμηλού βαθμού CIN (τραχηλική ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία), στην οποία το ιικό γονιδίωμα διατηρείται σε επισωματική μορφή, παρουσιάζει επίσης σχετικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης E6 και E7. Αυτές οι βλάβες συνήθως υποχωρούν εντός 1-2 ετών, συνοδευόμενες από απομάκρυνση του ιού ως αποτέλεσμα ανοσοαπόκρισης στις πρωτεΐνες E2, E6 και E7 . Ωστόσο, ο ιός διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς που είναι διαθέσιμοι για να ξεπεράσουν την ανοσοαπόκριση [24]. Από την άλλη πλευρά, η αποτυχία του ανοσοποιητικού συστήματος να εξουδετερώσει τέτοιες επίμονες λοιμώξεις από τον HPV μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μετά από αρκετές δεκαετίες . Σε τέτοιες καρκινικές αλλοιώσεις ή σε CIN υψηλού βαθμού (CINIII), παρατηρείται συχνά υψηλό επίπεδο έκφρασης των E6 και E7 και το υψηλού κινδύνου HPV DNA βρέθηκε να είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του



## 1.6.Κύκλος ζωής των HPVs

### 1.6.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

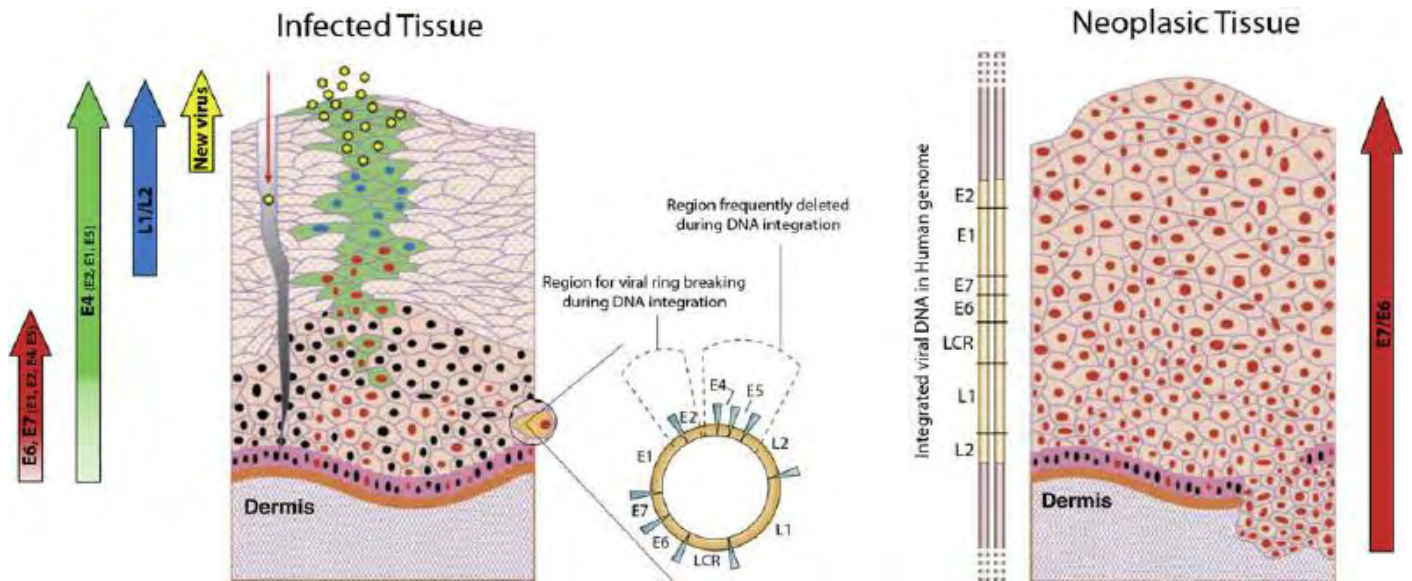
Οι HPV έχουν έναν μοναδικό κύκλο ζωής ο οποίος είναι στενά συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή. Αρχικά, πιθανότατα μέσω μικροτραυματισμών, τα ισωμάτια του ιού HPV μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Στη βασική στοιβάδα, οι HPV βρίσκονται στη φάση της λανθάνουσας μόλυνσης, όπου το γονιδίωμα τους διατηρείται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων χωρίς παραγωγή ισωματίων. Στην ανώτερη στοιβάδα, καθώς τα θυγατρικά κύτταρα κινούνται προς την επιφάνεια και υποβάλλονται σε διαφοροποίηση, η αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού συντονίζεται με την έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών για το σχηματισμό ιικών σωματιδίων. Τέλος, τα ώριμα ισωμάτια απελευθερώνονται από τα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, προς αναζήτηση νέων κυττάρων-ξενιστών. Επομένως, ο παραγωγικός κύκλος του ιού HPV δεν συνοδεύεται από κυτταρικό θάνατο ή κυτταρόλυση και έτσι δεν προκαλεί φλεγμονή ή παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπλέον, λόγω του αποκλειστικά ενδοεπιθηλιακού μολυσματικού κύκλου του, η λοίμωξη από τον HPV δεν προκαλεί ιαιμία [1].

Η αρχική αλληλεπίδραση του καψιδίου του ιού με τον ξενιστή αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στις αλληλεπιδράσεις της L1 με υδατάνθρακες θειικής ηπαράνης (HS) που εμφανίζονται σε πρωτεογλυκάνες (heparan sulfate (HS) carbohydrates displayed on proteoglycans (PG)). Η αλληλεπίδραση του καψιδίου με HSPG οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης που προκαλεί την έκθεση ενός αμινοτερματικού τμήματος της δευτερεύουσας καψιδικής πρωτεΐνης L2 και επιτρέπει τη διάσπαση του L2 από την κυτταρική πρωτεάση φουρίνη. Η διάσπαση του L2 μέσω της φουρίνης φαίνεται να επάγει μια πρόσθετη αλλαγή της διαμόρφωσης που επιτρέπει στο καψίδιο να δεσμεύσει έναν δευτερεύοντα υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων [40]. Αυτή η δευτερογενής μεταβολή της διαμόρφωσης μπορεί να μειώσει τη συγγένεια του ισωματίου για το HS [47]. Μετά την είσοδο στο κύτταρο, ο ιός εισέρχεται στο ενδόσωμα. Κατά τη διαφυγή από το ενδόσωμα, το ιικό DNA διασχίζει το κυτταρόπλασμα με τη μορφή συμπλόκου L2 / ιικού-DNA χρησιμοποιώντας τον κυτταροσκελετό έτσι ώστε να μεταφερθεί στον πυρήνα του κυττάρου [14].

### 1.6.2. Αντιγραφή του ιού

Ο κύκλος ζωής των θηλωματοϊών εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων και εξασφαλίζει μια επίμονη μόλυνση με σταθερή απελευθέρωση ιικών σωματιδίων. Το γονιδίωμα του ιού αντιγράφεται με διαφορετικούς μηχανισμούς σε διαφορετικά στάδια. Αυτά τα στάδια είναι η αρχική ενίσχυση, η εγκατάσταση, η συντήρηση και η εκθετική ενίσχυση. Όταν ο ιός μολύνει αρχικά ένα κύτταρο της βασικής

στοιβάδας πρέπει να υποβληθεί σε λίγους κύκλους αναδιπλασιασμού του DNA για να παράγει ένα χαμηλό αριθμό αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος. Στη συνέχεια, το γονιδίωμα του ιού πρέπει να καθιερωθεί ως ένα σταθερό εξωχρωμοσωμικό στοιχείο (επίσωμα). Τα γονιδιώματα στη συνέχεια διατηρούνται σε ένα χαμηλό, σταθερό αριθμό αντιγράφων και κατανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα κατά την διαίρεση των κυττάρων. Το τελευταίο στάδιο είναι η εκθετική ενίσχυση (vegetative amplification), η οποία εμφανίζεται μόνο σε διαφοροποιημένα κύτταρα και παράγει υψηλό αριθμό αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος που προορίζονται να συσκευαστούν στα νεοσυντιθέμενα καψίδια [16].



Εικόνα 1.8 : Παρουσίαση της μόλυνσης από τον ιό HPV από το αρχικό στάδιο έως την παραγωγή και απελευθέρωση νέων ιών (αριστερά) και απεικόνιση της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (δεξιά) [41].

Σε μολυσμένα κύτταρα στη βασική στοιβάδα, τα επίπεδα του ιικού επισωμικού DNA διατηρούνται σε ένα χαμηλό αριθμό αντιγράφων περίπου 50-100 ανά κύτταρο. Η πρωτεΐνη E2 συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA στρατολογώντας την ελικάση E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Η θέση έναρξης της αντιγραφής περιέχει μια θέση δέσμευσης της E1, μια περιοχή πλούσια σε A / T και τουλάχιστον μία θέση δέσμευσης E2. Η E1 είναι η πρωτογενής πρωτεΐνη αναδιπλασιασμού, αλλά η E2 ενισχύει και στηρίζει τις λειτουργίες της E1. Μετά τη στρατολόγησή της, η E1 μετατρέπεται σε μια διπλή εξαμερή ελικάση και η E2 μετατοπίζεται. Καθώς τα μολυσμένα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύουν στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου παράγονται προϊόντα όψιμων ιικών γονιδίων (L1 και L2). Η πρωτεΐνη E4 συνεχίζει να εκφράζεται στα τερματικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου, το ιογενές DNA συσκευάζεται σε καψίδια και τα ισοσώματα των απογόνων απελευθερώνονται για να ξαναρχίσουν τη μόλυνση [1,15].

### 1.6.3. Μεταγραφή του ιού

Οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου μεταγράφουν τα ιικά γονίδια τους μέσω 2 κύριων ιικών υποκινητών, τον πρώιμο και τον όψιμο. Ο πρώιμος υποκινητής βρίσκεται ανοδικά από το E6 ORF και συνθέτει μετάγραφα που μεταφράζονται νωρίς στον κύκλο ζωής του ιού. Επειδή ο πρώιμος υποκινητής λειτουργεί ανεξάρτητα από τη διαφοροποίηση, μπορεί να ξεκινήσει πριν από την παραγωγική φάση του κύκλου ζωής του ιού. Στον HPV18 ο πρώιμος υποκινητής αναφέρεται ως p105. Ο όψιμος υποκινητής βρίσκεται εντός του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης E7 (ORF) ,λειτουργεί με τρόπο εξαρτώμενο από τη διαφοροποίηση, και έτσι ενεργοποιείται μόνο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε διαφοροποιημένο ιστό. Ένας όψιμος υποκινητής έχει ταυτοποιηθεί στον HPV16 (p670), και τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι υπάρχει ένας όψιμος p811 υποκινητής και στον HPV18. Ο όψιμος υποκινητής χρησιμεύει ειδικά για την παραγωγή ενός συνόλου μεταγράφων από τα οποία προκύπτουν οι πρωτεΐνες L1 και L2 [42,43].

### 1.6.4.Συναρμολόγηση και απελευθέρωση του ιικού καψιδίου

Η συναρμολόγηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος σε καψίδια λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα στο τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής του ιού. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 έχουν δραστικότητα δέσμησης DNA in vitro , υποδεικνύοντας ότι και οι δύο πρωτεΐνες του καψιδίου μπορούν να βοηθήσουν στην καψιδίωση του ιικού γονιδιώματος με άμεση δέσμηση στο DNA χωρίς εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία. Αυτές οι περιοχές σύνδεσης με το DNA είναι συντηρημένες βραχείες αλληλουχίες θετικά φορτισμένων καταλοίπων που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης L1 καθώς και στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο της L2. Η πρωτεΐνη E2 είναι υπεύθυνη για την εισαγωγή του γονιδιώματος στο νεοσυντιθέμενο ιικό καψίδιο [14].

Η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών παρατηρείται μόνο σε κύτταρα που ήδη εκφράζουν την E4 . Έτσι λοιπόν η έκφραση της E4 προηγείται της έκφρασης της L2, η οποία με τη σειρά της προηγείται ελαφρώς της έκφρασης της L1. Επομένως, τα μολυσματικά σωματίδια του ιού παράγονται μόνο σε κύτταρα θετικά για την πρωτεΐνη E4. Η ικανότητα του E4 να διακόπτει το κυτταρικό δίκτυο κερατίνης μπορεί να διευκολύνει την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων. Τέλος τα γονίδια L1 και L2 εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα πριν εντοπιστούν στον πυρήνα και η αρχική συναρμολόγηση των μορίων L1 σε καψίδιο είναι ένα κυτταροπλασματικό γεγονός [19].

## 1.7 Ιστολογικές αλλοιώσεις- Εμβόλια

Συμπερασματικά οι ιοί HPV μπορεί να προκαλέσουν πληθώρα συμπτωμάτων που κυμαίνονται από καλοήθεις εκδηλώσεις κονδυλωμάτων έως τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και εκδήλωση καρκίνου. Η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από τον τύπο του ιού HPV που μολύνει τον εκάστοτε ασθενή. Επομένως οι προληπτικοί έλεγχοι όπως το τεστ Παπανικολάου μπορούν να προσφέρουν μεγάλο όφελος στις γυναίκες. Ωστόσο, για να αποκομίσουν αυτό το όφελος θα πρέπει να υπάρχει πλήρης τυποποίηση της ορολογίας. Το σύστημα Bethesda για την αναφορά της γυναικολογικής κυτταρολογίας αναπτύχθηκε από ένα εργαστήριο που χρηματοδοτήθηκε από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες και είχε ως στόχο την προώθηση της τυποποίησης του τεστ Παπανικολάου. Επομένως οι τραχηλικές αλλοιώσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες μετά το Test pap σύμφωνα με το σύστημα Bethesda : χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL)[44,45].

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες L1 μπορούν να αυτοσυναρμολογηθούν σε μια εξαιρετικά ανοσογόνο δομή (VLP) που μιμείται την επιφάνεια των φυσικών ιοσωματίων του ιού των θηλωμάτων. Τα VLPs είναι αντιγονικά όμοια με τα φυσικά καψίδια , δεν περιέχουν ιικό DNA και μπορούν να προκαλέσουν υψηλούς τίτλους ειδικών εξειδικευμένων αντισωμάτων εξουδετέρωσης γεγονός που τους έκανε καλούς υποψήφιους για εμβόλια HPV πρώτης γενιάς. Παρόλο που το γονίδιο L2 δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή VLPs, μία πρόοδος στην τεχνολογία VLP ενσωματώνει το L2 στο σωματίδιο υπογραμμίζοντας την πιθανή χρησιμότητα των χμαιοικών L1 / L2 VLP στην πρόκληση βελτιστοποιημένης ανοσοαπόκρισης. Τα εμβόλια δεύτερης γενιάς είναι χμαιοικά των L1 ή L1-L2 VLPs μαζί με τις πρωτεΐνες E6 ή E7 με στόχο την επαγωγή μιας προστατευτικής απόκρισης που προκαλείται από τις πρωτεΐνες L1 ή L2 και μιας κυτταρικής απόκρισης που προκαλείται από τις πρωτεΐνες E6 ή E7 [4,46,47,48].



## **2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μίας γρήγορης, εύκολης και υψηλής ευαισθησίας ισοθερμικής τεχνικής Loop Mediated Amplification (LAMP) για την ανίχνευση των ιών HPV-18.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Εκχύλιση DNA από κύτταρα HeLa

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (DNA) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης. Αναλυτικά, τοποθετήθηκαν μέσα σε erpendorf των 2ml, 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και προστέθηκαν 100μl δείγματος DNA που βρίσκονταν σε μορφή ThinPrep. Επιπλέον προστέθηκαν και 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Ακολούθως το μείγμα αναδεύτηκε ισχυρά και έπειτα αφέθηκε για επώαση 20 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της επώασης προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 14000g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στο ίζημα που σχηματίστηκε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και φυγοκέντρηση στα 14000g για 10 λεπτά. Τέλος, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100μl ddH<sub>2</sub>O. Το DNA των δειγμάτων αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

#### 3.2. PCR σε DNA από κύτταρα HeLa

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση ενός τμήματος που περιείχε το γονίδιο E6, από DNA που είχε εκχυλιστεί από κύτταρα HeLa. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε το τμήμα το οποίο ενισχύουν να περιέχει τις θέσεις υβριδισμού των εκκινητών της LAMP(FIP,BIP,B3,F3). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η αλληλουχία των εκκινητών της PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος προϊόντος
HPV-18 31	5' AAAAGGGAGTAACCGAAAACG 3'	857 bp
HPV-18 888	5' CACGGACACACAAAGGACAG 3'	

Πίνακας 3.1: Παρουσίαση της αλληλουχίας των εκκινητών HPV-18 31/ HPV-18 888, της θέσης υβριδισμού τους και του μήκους του προϊόντος PCR που προκύπτει.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε μικροσωληνάριο είναι 50μl από τα οποία τα 47μl αντιστοιχούν σε ένα μείγμα που παρασκευάζεται πρώτο και περιέχει dNTPs 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KAPATaq Buffer 1X,

εκκινητές HPV-18 31/ HPV-18 888 25 pmol/μl, 2Units ενζύμου KAPA Taq DNA Polymerase και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 47μl . Τα υπόλοιπα 3 μl που απαιτούνται για τη συμπλήρωση των 50 μl τελικού όγκου αντιστοιχούν στο DNA κάθε δείγματος που προστίθενται στο τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο.

Κατόπιν τα μικροσωληνάκια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- 2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
  - 40 κύκλους PCR καθένας από τους οποίους πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες
    - 40 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
    - 40 δευτερόλεπτα στους 55 °C για τον υβριδισμό των εκκινητών
    - 1 λεπτό στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq DNA πολυμεράση
  - 5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων
- Η επιβεβαίωση της παραγωγής ειδικών προϊόντων της PCR έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

### 3.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: Σε ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν 1,4 g αγαρόζης και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη μαζί με 70 ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA ) .Για τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης που βρίσκεται αρχικά σε μορφή σκόνης ακολούθησε θέρμανση. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε στους 40°C προστέθηκαν 70 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση στο πήκτωμα να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm καθιστώντας δυνατή την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ύστερα από έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της , η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται στα ειδικά 'πηγαδάκια' 5 μl προϊόντος PCR που προηγουμένως είχε αναμειχθεί με τη χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό τάση 120 Volts. Τέλος το πήκτωμα της αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

### **3.4. Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης**

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR το πήκτωμα εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία UV με σκοπό την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος. Οι 'ζώνες' αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα προϊόντα που προέκυψαν από τον καθαρισμό υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση αφού πρώτα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης όπου και επιβεβαιώθηκε ότι έγινε σωστά ο καθαρισμός.

### **3.5. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR που απομονώθηκαν**

Η μοριακή κλωνοποίηση πραγματοποιείται με βάση τα ακόλουθα στάδια:

1. προσθήκη άκρων A στα τμήματα DNA
2. αντίδραση της τοποϊσομεράσης,
3. μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων
4. δημιουργία υγρών καλλιεργειών
5. απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων
6. επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

Αναλυτικά η αντίδραση προσθήκης A άκρων απαιτεί 7 μl καθαρισμένου DNA, 5U KAPA Taq Pol , 10X KAPA Taq Buffer, 0,2 mM dATPs και ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από ddH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl στους 72 °C για 30 min.

Έπειτα η αντίδραση της τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning) συνδέει το επιθυμητό προϊόν (ένθεμα) στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης TOPO. Ο φορέας έχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl φορέα TOPO, 1μl ddH<sub>2</sub>O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων ξεκινά με τη μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε σωληνάρια erpendorf των 2ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στον

πάγο για 30 λεπτά. Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας “heat shock”, κατά την οποία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 λεπτά. Έπειτα από το “heat shock” προστέθηκαν 800μl θρεπτικού υποστρώματος LB Broth και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια, επιστρώθηκαν τρυβλία στερεού θρεπτικού υποστρώματος LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA) με 150μl καλλιέργειας .

Ακολούθησε ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Αφού αναπτύχθηκαν οι αποικίες, συλλέχθηκαν οι ανασυνδυασμένες αποικίες που είχαν λευκό χρώμα από το κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες που προέκυψαν επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό.

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιήσαμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Οι θέσεις κοπής του συγκεκριμένου ενζύμου στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Shiga, Japan) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37 °C και μετά την ολοκλήρωσή της προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει την ενζυμική αντίδραση. Τέλος, τα προϊόντα τα αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου αναμένουμε την ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος δηλαδή στις 857 βάσεις.

### **3.6. Διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις των πλασμιδίων για την εύρεση του ενός αντιγράφου**

Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις στα πλασμίδια που δέχτηκαν ως ένθεμα το προϊόν PCR των 857 ζευγών βάσεων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει λήψη 10μl από το αρχικό διάλυμα των πλασμιδίων και τοποθέτησή τους σε πλαστικό σωληνάριο των 500μl. Στη συνέχεια προστίθενται 90μl ddH<sub>2</sub>O και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με αποτέλεσμα τη δημιουργία της πρώτης υποδεκαπλάσιας αραιώσης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου δημιουργηθούν δέκα υποδεκαπλάσιες αραιώσεις με τη διαφορά ότι τα 10 μl πλασμιδίων λαμβάνονται από την αμέσως προηγούμενη αραιώση και όχι από το αρχικό διάλυμα πλασμιδίων. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις ήταν για την εφαρμογή της Real Time PCR που αναφέρεται στη επόμενη ενότητα.

### **3.7. Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων**

Στόχος της Real-time PCR που πραγματοποιήθηκε στις αραιώσεις των πλασμιδίων ήταν η εύρεση εκείνης της αραιώσης στην οποία αντιστοιχεί το ένα αντίγραφο πλασμιδίου. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR-Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA και να εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται στα 510nm.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl από τα οποία τα 17 μl ήταν το μείγμα που περιείχε , 1X ROX Low, 1X KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix, εκκινητές HPV-18 F3/HPV-18 B3 5pmol/μl ο καθένας, ddH<sub>2</sub>O ,ενώ τα υπόλοιπα 3μl ήταν πλασμιδιακό DNA.

Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στο MX3005 της STRATAGENE και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό τις ακόλουθες συνθήκες

- 1,5 λεπτό στους 95 °C για την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 40 κύκλοι που περιλάμβαναν
  - 3 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του DNA
  - 10 δευτερόλεπτα στους 60 °C για την υβριδοποίηση των εκκινητών
  - 10 δευτερόλεπτα στους 60 °C για την επέκταση της σύνθεσης του DNA
- Melting Curve Analysis μεταξύ των 55 °C-95 °C

### **3.8. Η τεχνική Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**

#### **I. Αρχές της μεθόδου**

Η ισόθερμη ενίσχυση με την τεχνική LAMP είναι μια μοναδική μέθοδος ενίσχυσης με εξαιρετικά υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. Χαρακτηρίζεται από τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων να αναγνωρίζουν έξι διαφορετικές περιοχές σε ένα γονίδιο στόχο. Στα αρχικά στάδια της τεχνικής συμμετέχουν και οι τέσσερις εκκινητές( εσωτερικοί και εξωτερικοί) ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιούνται μόνο οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Η χρήση των αρκετών εκκινητών εξασφαλίζει και την υψηλή εξειδίκευση για ενίσχυση του στόχου. Σε αντίθεση με μια αντίδραση PCR, η LAMP διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία συνήθως μεταξύ 60-65 ° C επομένως δεν υπάρχει ανάγκη για χρήση θερμικού κυκλοποιητή. Χρησιμοποιεί πολυμεράση με δραστικότητα εκτόπισης κλώνου από το *Bacillus stearothermophilus* (Bst πολυμεράση). Παρέχει υψηλή απόδοση ενίσχυσης, με το DNA να ενισχύεται  $10^9 - 10^{10}$  φορές σε 15-60 λεπτά. Λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της, η παρουσία του ενισχυμένου προϊόντος υποδεικνύει και την παρουσία του γονιδίου στόχου. Τα ενισχυμένα προϊόντα που προκύπτουν έχουν μια δομή που αποτελείται από εναλλάξ ανεστραμμένες επαναλήψεις της αλληλουχίας στόχου στο ίδιο κλώνο και σχηματίζουν πρότυπο ladder σε gel αγαρόζης [49-53].

#### **II. Δομή εκκινητών**

Ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής (FIP) αποτελείται από την περιοχή F2 (στο άκρο 3 ') που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή F2c και φέρει την αλληλουχία F1c στο άκρο 5'.

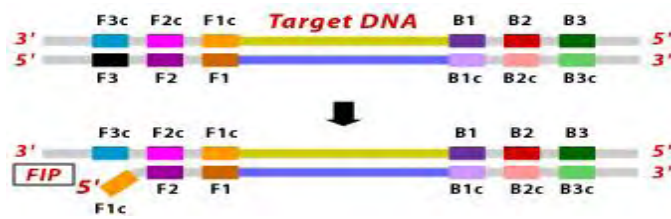
Ο εμπρόσθιος εξωτερικός εκκινητής αποτελείται από την περιοχή F3 που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή F3c.

Ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής (BIP) αποτελείται από την περιοχή B2 (στο άκρο 3 ') που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή B2c και φέρει την αλληλουχία B1c στο άκρο 5'.

Ο οπίσθιος εξωτερικός εκκινητής αποτελείται από την περιοχή B3 που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή B3c [54].

#### **III. Στάδια ενίσχυσης του στόχου**

1. Σύνδεση της αλληλουχίας F2 του εκκινητή FIP στη συμπληρωματική αλληλουχία F2c του μορίου στόχου



Εικόνα 3.1: Απεικόνιση 1<sup>ου</sup> σταδίου

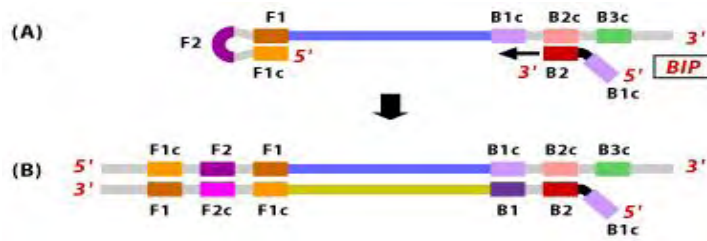
2. Μέσω της DNA πολυμεράσης με δραστικότητα εκτόπισης κλώνου, συντίθεται ένας κλώνος DNA συμπληρωματικός προς το εκμαγείο, ξεκινώντας από το 3 'άκρο της περιοχής F2 του εκκινητή FIP.
3. Ο εκκινητής F3 συνδέεται στην περιοχή F3c, εξωτερικά του FIP στο DNA στόχο και ξεκινά τη σύνθεση DNA μέσω εκτόπισης κλώνου, απελευθερώνοντας τον συμπληρωματικό κλώνο που είναι συνδεδεμένος με τον FIP.
4. Μια διπλή έλικα σχηματίζεται από τον κλώνο του DNA που συντίθεται από τον εκκινητή F3 και τον πρότυπο DNA κλώνο.
5. Ο συμπληρωματικός κλώνος που συνδέεται με FIP απελευθερώνεται ως ένας μονός κλώνος εξαιτίας της εκτόπισής από τον κλώνο DNA που συντίθεται από τον εκκινητή F3. Στη συνέχεια, αυτή η απελευθερωμένη μονόκλωνη έλικα σχηματίζει μια δομή βρόχου στο 5 'άκρο λόγω των συμπληρωματικών περιοχών F1c και F1



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση 2<sup>ου</sup>-5<sup>ου</sup> σταδίου

6. Αυτό το μονόκλωνο DNA του σταδίου (5) χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση DNA που ξεκινά με τον BIP και επακόλουθη σύνθεση DNA από το B3. Το BIP υβριδοποιείται στον κλώνο DNA που παράγεται στο Στάδιο (5). Ξεκινώντας από το 3 'άκρο του BIP, λαμβάνει χώρα η σύνθεση συμπληρωματικού DNA. Μέσω αυτής της διαδικασίας, το DNA μετατρέπεται από μια δομή βρόχου σε μια γραμμική δομή. Ο εκκινητής B3 συνδέεται εξωτερικά του εκκινητή BIP και στη συνέχεια, μέσω της δραστικότητας της DNA πολυμεράσης και ξεκινώντας στο άκρο 3 ', το DNA που συντίθεται από τον εκκινητή BIP εκτοπίζεται και απελευθερώνεται ως μονόκλωνη έλικα πριν από την σύνθεση DNA από τον εκκινητή B3.

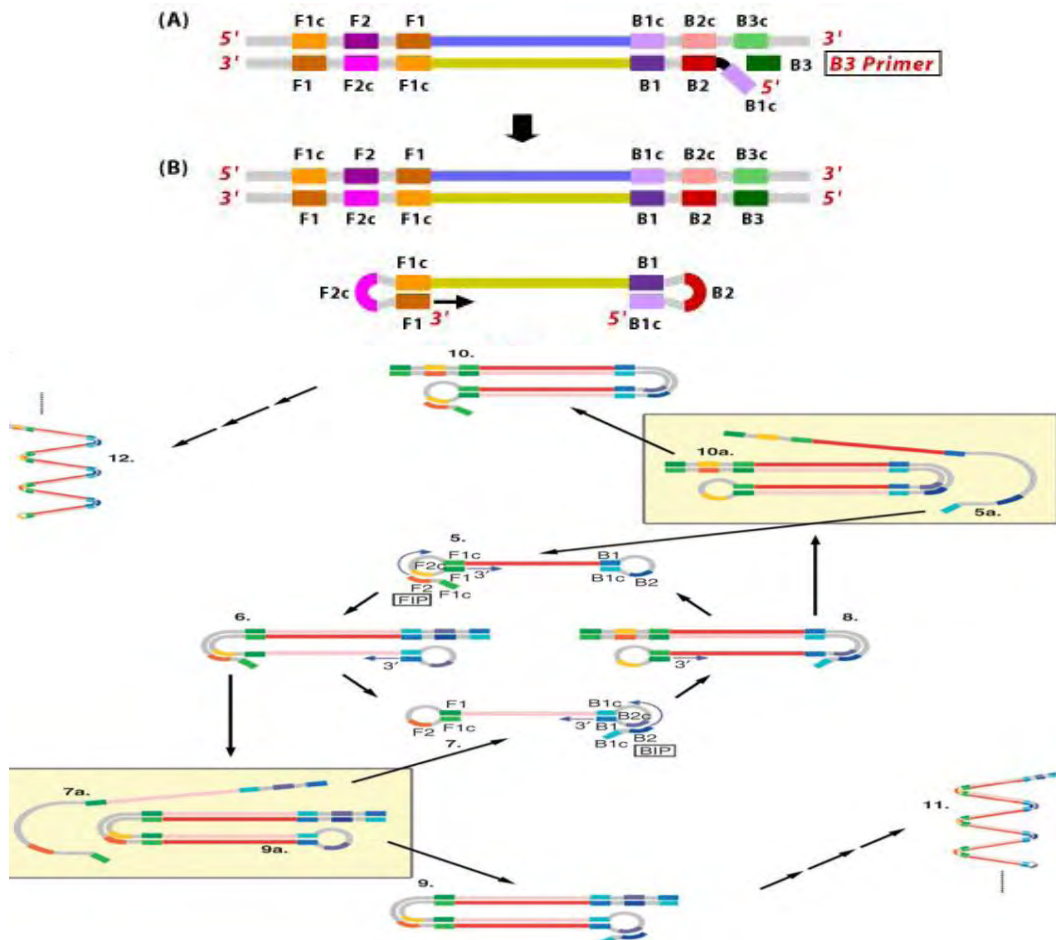




Εικόνα 3.3: Απεικόνιση 6<sup>ου</sup> σταδίου

7. Το δίκλωνο DNA παράγεται μέσω της διαδικασίας που περιγράφηκε στο στάδιο (6).

8. Ο συμπληρωματικός κλώνος που συνδέεται με τον εκκινητή BIP εκτοπίζεται στο βήμα (6) σχηματίζει μια δομή με βρόχους σε κάθε άκρο, που μοιάζει με δομή αλτήρα. Αυτή η δομή χρησιμεύει ως αρχική για τους κύκλους ενίσχυσης της μεθόδου LAMP. [36]



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση 7<sup>ου</sup> -8<sup>ου</sup> σταδίου(επάνω) και σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών δομών που προκύπτουν κατά την ενίσχυση της βασικής θηλιάς(κάτω).

### 3.9. Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σχεδιάστηκαν τέσσερα εκκινητικά μόρια για το γονίδιο E6 του ιού HPV-18 με τη χρήση του προγράμματος Primer Explorer V4. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ειδικότητα των εκκινητών για τον ιό HPV-18 οι εν λόγω εκκινητές ελέγχθηκαν και σε άλλους HPV ιούς, όπου και διαπιστώθηκε η μη υβριδοποίηση τους στις αλληλουχίες που δεν προέρχονται από HPV-18. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητής	5'άκρο	3'άκρο	Sequence
HPV18 F3	272	294	AAAAACTAACTAACACTGGGTTA
HPV18 B3	456	473	ACTTGTGTTTCTCTGCGT
HPV18 FIP			GGTGTCTAAGTTTTTCTGCTGGAT-AATTTATTAATAAGGTGCCTGCG
HPV18 BIP			CGACGATTCACAACATAGCTGG-GTTGGAGTCGTTCTGTC

Πίνακας 3.2: Παρουσίαση της αλληλουχίας και της θέσης στο γονιδίωμα των εκκινητών της LAMP FIP, BIP, F3, B3.

### 3.10. LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων για την εύρεση της ευαισθησίας της μεθόδου

Για την αντίδραση της LAMP που πραγματοποιήθηκε με στόχο την εύρεση της ευαισθησίας δηλαδή τον προσδιορισμό του ελάχιστου αριθμού αντιγράφων που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με την τεχνική χρησιμοποιήθηκαν μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25 μl από τα οποία τα 22 μl αντιστοιχούσαν σε ένα μείγμα που περιείχε dNTPs 5,6mM, MgSO<sub>4</sub> 4,5mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, FIP 1,2 pmol/μl, BIP 1,2 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, ddH<sub>2</sub>O ενώ τα υπόλοιπα 3 μl αντιστοιχούσαν στο DNA.

Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- Επώαση στους 65°C για 25 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του στόχου.
- Επώαση στους 80 °C για 5 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου.

### 3.11. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP

Η διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP διαφέρει από την αντίστοιχη διαδικασία στην PCR στα εξής δύο σημεία: Η πηκτή είχε συγκέντρωση 1,4% επομένως η ποσότητα της αγαρόζης που ζυγίστηκε ήταν 0,98g και η τάση που εφαρμόστηκε για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων LAMP ήταν 120 Volts.

### 3.12. Κλινικά δείγματα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 26 θετικά και 15 αρνητικά κλινικά δείγματα για τον ιό HPV-18.

Κωδικός δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Υλικό μέσο συλλογής	Προέλευση
S 2542-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 179-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 519-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 522-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 836-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 1340-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 1403-15	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 1432-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
S 11-16	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

<b>S 150-16</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 392-16</b>	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 401-16</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 439-16</b>	Κυτταρολογική εικόνα συμβατή με HPV λοίμωξη	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 70-17</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 262-17</b>	SCC*	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 263-17</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 308-17</b>	Θέσεις Χαμηλού & Υψηλού βαθμού δυσπλασίας	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>S 5946-17</b>	Άγνωστο	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>AG 3545</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
<b>AG 3712</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
<b>AG 3764</b>	Άγνωστο	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
<b>AG 3770</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ
<b>ΑΤΤ3</b>	ASCUS*	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>ΑΤΤ11</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>ΠΝΛ38</b>	Άγνωστο	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
<b>ΠΝΛ39</b>	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	ThinPrep	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας
<b>WNLs 911-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 1026-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

<b>WNLs 1229-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 1941-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 1955-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 1958-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 1959-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 2061-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 2179-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 2187-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 2193-14</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 513-15</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 528-15</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 558-15</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ
<b>WNLs 537-15</b>	Φυσιολογική	ThinPrep	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Πίνακας 3.3: Παρουσίαση του συνόλου των θετικών και αρνητικών κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Αναφέρεται η κωδική τους ονομασία, το υλικό μέσο συλλογής και η προέλευση τους.

\*ASCUS: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (Ατυπα Πλακώδη Κύτταρα Απροσδιορίστου Σημασίας)

\*SCC: Squamous Cell Carcinoma (Καρκίνωμα Πλακωδών Κυττάρων)

### 3.13. Εκχύλιση DNA

Η εκχύλιση του DNA από ThinPrep πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης που περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.

### 3.14. Έλεγχος επιτυχίας της εκχύλισης

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της εκχύλισης των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε PCR στα γονίδια L1 και E6 με χρήση εκκινητών ειδικών για τις αλληλουχίες αυτών των γονιδίων στον ιό HPV-18. Συγκεκριμένα οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR παρουσιάζονται στον κατωτέρω πίνακα.

Όνομα εκκινητή	γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος προϊόντος
HPV-18 L1 F	L1	5' GCCCCTGCCTCTACACAGTA 3'	292 bp
HPV- 18 L1 R		5' ATCCTGCTTATTGCCACCAC 3'	
HPV-18 B3	E6	5' ACT TGT GTT TCT CTG CGT- 3'	202 bp
HPV-18 F3		5' AAAAATAACTAACACTGGGTTA 3'	

*Πίνακας 3.4: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, το γονίδιο στόχευσης τους καθώς και το μήκος του προϊόντος που προέκυψε από την PCR που διεξήχθη με στόχο τον έλεγχο της επιτυχίας της εκχύλισης των δειγμάτων DNA.*

Η αντίδραση της PCR για το γονίδιο L1 έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε μικροσωληνάριο είναι 50μl από τα οποία τα 45μl αντιστοιχούν σε ένα μείγμα που παρασκευάζεται πρώτο και περιέχει dNTPs 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KAPATaq Buffer 1X, HPV-18 L1F/ HPV-18 L1 R 25 pmol/μl, 2Units ενζύμου KAPA Taq DNA Polymerase και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου. Τα υπόλοιπα 5 μl που απαιτούνται για τη συμπλήρωση 50 μl τελικού όγκου αντιστοιχούν στο DNA κάθε δείγματος που προστίθενται στο τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- 2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
- 40 κύκλους PCR καθένα από τους οποίους πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες
  - 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
  - 30 δευτερόλεπτα στους 58 °C για τον υβριδισμό των εκκινητών
  - 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq DNA πολυμεράση
- 1 λεπτό στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Η αντίδραση της PCR για το γονίδιο E6 έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε μικροσωληνάριο είναι 50μl από τα οποία τα 45μl αντιστοιχούν σε ένα μείγμα που παρασκευάζεται πρώτο και περιέχει dNTPs 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KAPATaq Buffer 1X, HPV-18 B3/ HPV-18 F3 25 pmol/μl, 2Units ενζύμου KAPA Taq DNA Polymerase και

ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου. Τα υπόλοιπα 5 μl που απαιτούνται για τη συμπλήρωση 50 μl τελικού όγκου αντιστοιχούν στο DNA κάθε δείγματος που προστίθενται στο τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- 2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
  - 40 κύκλους PCR καθένα από τους οποίους πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες
    - 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
    - 30 δευτερόλεπτα στους 50 °C για τον υβριδισμό των εκκινητών
    - 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq DNA πολυμεράση
  - 1 λεπτό στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

### **3.15. LAMP στα κλινικά δείγματα**

Για την αντίδραση της LAMP χρησιμοποιήθηκαν μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25 μl από τα οποία τα 22 μl αντιστοιχούσαν σε ένα μείγμα που περιείχε dNTPs 5,6mM, MgSO<sub>4</sub> 4,5mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, FIP 1,8 pmol/μl, BIP 1,8 pmol/μl, F3 0,3 pmol/μl, B3 0,3 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, ddH<sub>2</sub>O ενώ τα υπόλοιπα 3 μl αντιστοιχούσαν στο DNA.

Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- Επώαση στους 65°C για 30 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του στόχου.
- Επώαση στους 80 °C για 5 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου.

### **3.16. Real-Time PCR στα κλινικά δείγματα και στις αραιώσεις των πλασμιδίων**

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε Real Time PCR, ταυτόχρονα, τόσο σε νέες αραιώσεις πλασμιδίων όσο και σε κλινικά δείγματα σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.6. Προσδιορίστηκαν με αυτόν τον τρόπο ο αριθμός των αντιγράφων που περιέχεται σε κάθε δείγμα καθώς και η τιμή Ct(cycle threshold)

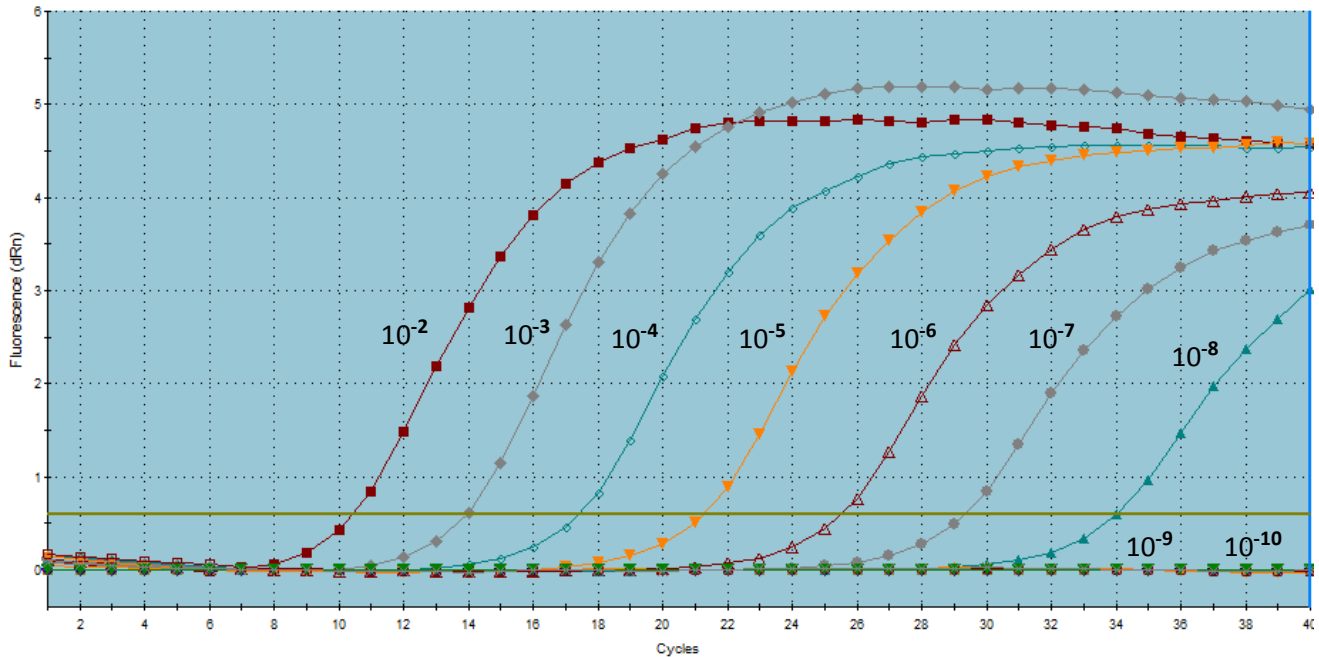
δηλαδή ο κύκλος στον οποίο γίνεται η θετικοποίηση του δείγματος. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε ότι τα κλινικά δείγματα που δεν δίνουν θετικό αποτέλεσμα στην LAMP περιέχουν αριθμό αντιγράφων που βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της τεχνικής LAMP.



## 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις των πλασμιδίων και από την καμπύλη προκύπτει ότι η αραιώση που αντιστοιχεί στο ένα αντίγραφο είναι η  $10^{-8}$ .

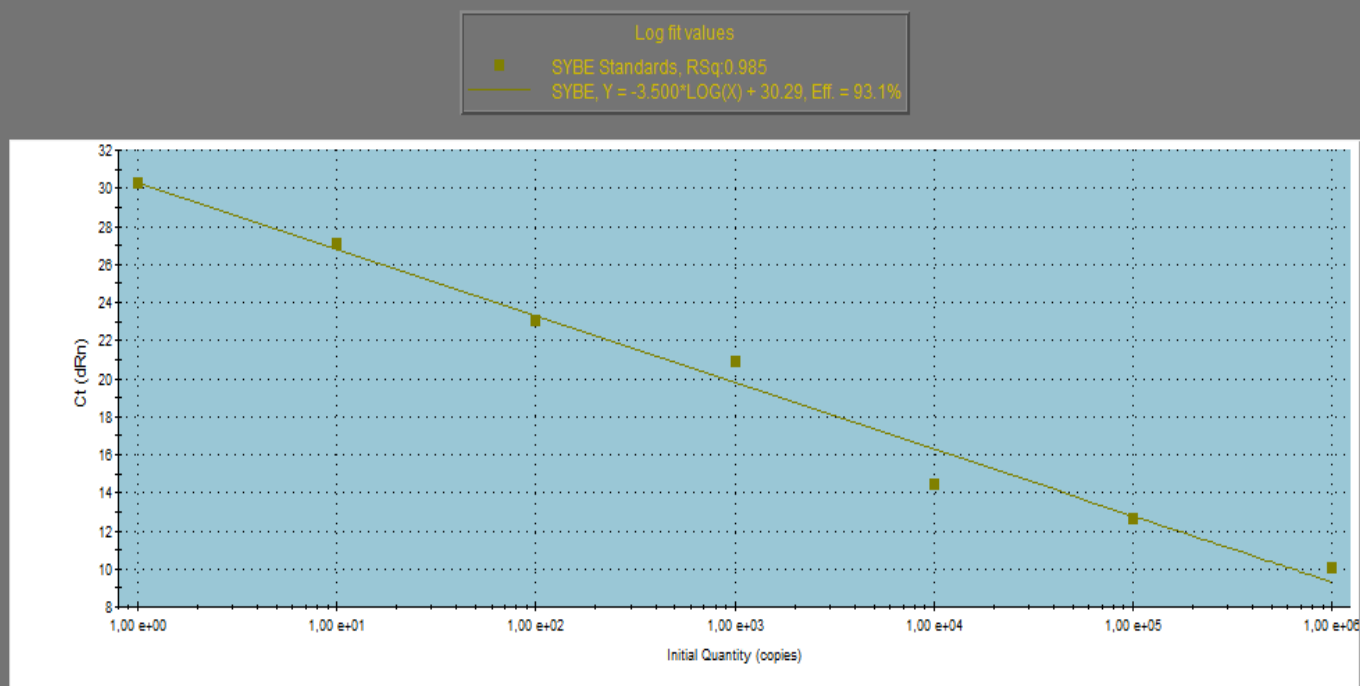


Διάγραμμα 4.1: Στο διάγραμμα (Amplification plots) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις των πλασμιδίων. Οι αριθμοί στις καμπύλες εκφράζουν τις αντίστοιχες αραιώσεις των πλασμιδίων και η αραιώση  $10^{-8}$  αντιστοιχεί στο ένα αντίγραφο.

#### 4.1.1. Πρότυπη καμπύλη (Standard curve)

Παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη που πραγματοποιήθηκε έπειτα από Real Time PCR σε κλινικά δείγματα και στις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις με στόχο τον υπολογισμό των αντιγράφων ώστε να εξακριβωθεί ότι όσα δείγματα έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στη LAMP έχουν μικρότερο αριθμό αντιγράφων από το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της τεχνικής LAMP.

## Standard Curve



Διάγραμμα 4.2: Παρουσίαση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε έπειτα από Real Time PCR σε κλινικά δείγματα και στις διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων.

### 4.2 LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της τεχνικής LAMP η τεχνική εφαρμόστηκε στις διαδοχικές υπαδεκακλάσιες αραιώσεις των πλασμιδίων και εν τέλει καθορίστηκε ότι η ευαισθησία της είναι τα 10 αντίγραφα. Επίσης καθορίστηκαν μέσω πολλαπλών δοκιμών και τροποποιήσεων οι βέλτιστες συνθήκες της τεχνικής οι οποίες είναι οι εξής: dNTPs 5,6mM, MgSO<sub>4</sub> 4,5mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, FIP 1,2 pmol/μl, BIP 1,2 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από κύτταρα SiHa και Caski που φέρουν ενσωματωμένο τον ιό HPV-16 και είναι αρνητικά για HPV-18.

### 4.3 PCR και LAMP στα κλινικά δείγματα

Τα αποτελέσματα της PCR και της LAMP στα κλινικά δείγματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

Κωδικός δειγμάτων	Κλινική εικόνα	Προέλευση	PCR στο γονίδιο L1	PCR στο γονίδιο E6	LAMP
S 2542-14	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 179-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 519-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 522-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 836-15	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 1340-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
S 1403-15	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 1432-15	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 11-16	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 150-16	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 392-16	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 401-16	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 439-16	Κυτταρολογική εικόνα συμβατή με HPV λοίμωξη	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
S 70-17	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S 262-17	SCC*	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ

<b>S 263-17</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>S 308-17</b>	Θέσεις Χαμηλού & Υψηλού βαθμού δυσπλασίας	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>S 5946-17</b>	Άγνωστο	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>AG 3545</b>	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>AG 3712</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>AG 3764</b>	Άγνωστο	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>AG 3770</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>ΑΤΤ3</b>	ASCUS*	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>ΑΤΤ11</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>ΠΝΛ38</b>	Άγνωστο	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>ΠΝΛ39</b>	Υψηλού βαθμού δυσπλασία	Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
<b>WNLs 911-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1026-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1229-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1941-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1955-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1958-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 1959-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 2061-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 2179-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

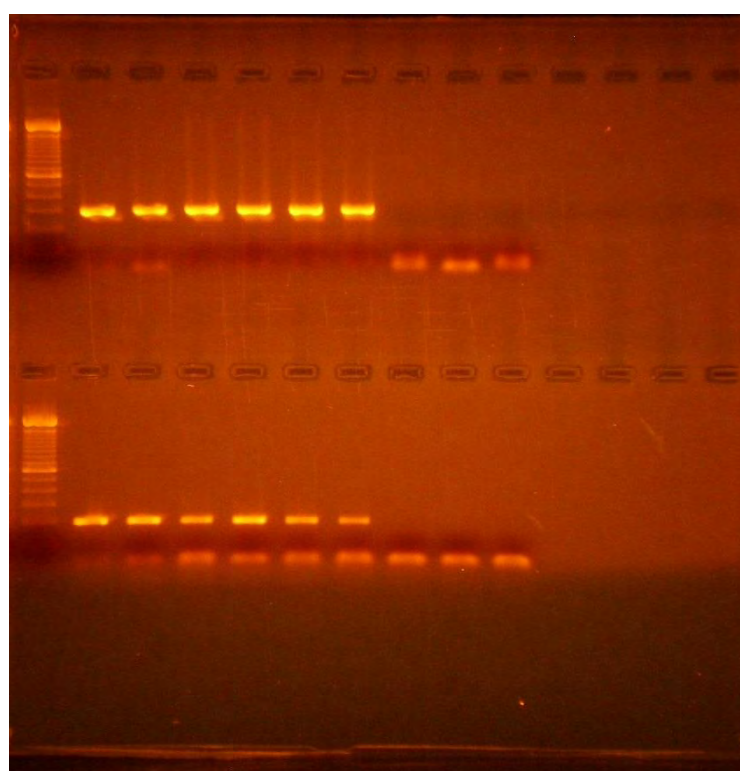
<b>WNLs 2187-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 2193-14</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 513-15</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 528-15</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 558-15</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
<b>WNLs 537-15</b>	Φυσιολογική	Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

*Πίνακας 4.1 : Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της PCR (γονίδια L1 και E6) και της LAMP τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά κλινικά δείγματα.*

*\*ASCUS: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (Άτυπα Πλακώδη Κύτταρα Απροσδιορίστου Σημασίας)*

*\*SCC: Squamous Cell Carcinoma (Καρκίνωμα Πλακωδών Κυττάρων)*

#### 4.4 Ηλεκτροφόρηση PCR θετικών και αρνητικών κλινικών δειγμάτων



Αριθμός	Δείγμα	Αποτέλεσμα στο γονίδιο L1(επάνω)	Αποτέλεσμα στο γονίδιο E6 (κάτω)
1	S 262-17	+	+
2	S 5946-17	+	+
3	AG 3545	+	+
4	AG 3712	+	+
5	AG 3764	+	+
6	AG 3770	+	+
7	WNLs 1955-14	-	-
8	WNLs 1958-14	-	-
9	WNLs 1959-14	-	-

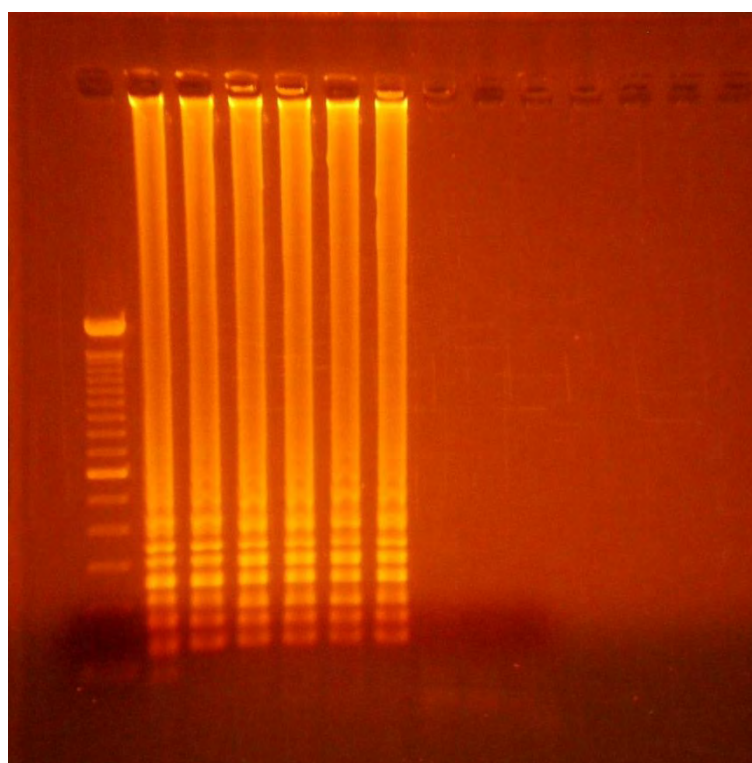
Εικόνα 4.1: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έξι θετικών (1-6) και τριών αρνητικών δειγμάτων (7-9) τόσο για το γονίδιο L1(επάνω) όσο και για το γονίδιο E6( κάτω).

Στο επάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το γονίδιο L1 και το μήκος του τμήματος που προκύπτει από τη χρήση των εκκινητών L1 F/L1 R είναι 292 bp

Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το γονίδιο E6 και το μήκος του τμήματος που προκύπτει από τη χρήση των εκκινητών F3/B3 είναι 202 bp

#### 4.5 Ηλεκτροφόρηση LAMP θετικών και αρνητικών δειγμάτων

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται ορισμένα θετικά και αρνητικά δείγματα ( ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω εικόνα) έπειτα από ηλεκτροφόρηση της LAMP. Όπως προαναφέρθηκε τα δείγματα έχουν χαρακτηριστική εμφάνιση πολλαπλών ζωνών λόγω των πολύπλοκων δομών που προκύπτουν κατά την τεχνική LAMP. Η παρουσία ζωνών υποδηλώνει την ύπαρξη θετικού δείγματος.



Αριθμός	Δείγμα	Αποτέλεσμα στο γονίδιο L1(επάνω)
1	S 262-17	+
2	S 5946-17	+
3	AG 3545	+
4	AG 3712	+
5	AG 3764	+
6	AG 3770	+
7	WNLs 1955-14	-
8	WNLs 1958-14	-
9	WNLs 1959-14	-

Εικόνα 4.2 :Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης LAMP έξι θετικών (1-6) και τριών αρνητικών δειγμάτων (7-9) .

## **5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Οι ιοί των θηλωμάτων (PVs) είναι μια πολυάριθμη οικογένεια μικρών ιών με δίκλωνο κυκλικό DNA γονιδίωμα που μολύνουν σχεδόν όλα τα θηλαστικά [63]. Συγκεκριμένα οι ανθρώπινοι ιοί των θηλωμάτων είναι ευρέως διαδεδομένοι για την πρόκληση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ο οποίος κατατάσσεται στη δεύτερη θέση μεταξύ των πέντε επικρατέστερων καρκίνων που πλήττουν τις γυναίκες παγκοσμίως και αποτελεί μια πολύπλοκη ασθένεια που επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων εκτός από τη μόλυνση από ιό HPV, όπως είναι η επακόλουθη υπερ-ενεργοποίηση των ογκογονιδίων καθώς και η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων [60].

Οι HPV ιοί τύπου Beta και Gamma προκαλούν χρόνιες μη εμφανείς λοιμώξεις, με παραγωγή ισοωματίων απουσία εμφανούς ασθένειας. Ωστόσο, οι τύποι Alpha του ιού έχουν αναπτύξει στρατηγικές ανοσοκαταστολής που τους επιτρέπουν να προκαλούν επίμονα ορατά θηλώματα. Επιπλέον οι ιοί αυτής της κατηγορίας ενεργοποιούν τον κυτταρικό κύκλο καθώς διαφοροποιείται το μολυσμένο επιθηλιακό κύτταρο προκειμένου να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον κατάλληλο για αναπαραγωγή το οποίο επιτρέπει την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος και τη συναρμολόγησή του σε μολυσματικά σωματίδια. Αυτό προκαλείται από τις ιικές πρωτεΐνες E6, E7 και E5. Οι υψηλού κινδύνου πρωτεΐνες E6 και E7 διαφέρουν από τις ομόλογες τους χαμηλού κινδύνου και είναι ικανές να οδηγήσουν στην είσοδο στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων στα ανώτερα επιθηλιακά στρώματα και επίσης να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη βασική στοιβάδα. Η απορυθμισμένη έκφραση αυτών των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου προωθεί τη νεοπλασία και την τελική εξέλιξή της σε καρκίνο [59]. Επιπλέον οι ιοί HPV μπορεί επίσης να σχετίζονται με διάφορες καλοήθειες όσο και κακοήθειες στοματικές και δερματικές διαταραχές[62]. Έχουν επίσης συσχετιστεί με ένα υποσύνολο καρκίνων της κεφαλής και του λαιμού, ιδιαίτερα με το στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα καθώς επίσης και με τον καρκίνο του λάρυγγα[61].

Ο κυτταρολογικός έλεγχος δειγμάτων του τραχήλου της μήτρας είναι ένα καθιερωμένο προληπτικό μέτρο που επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση και την επιτυχή αντιμετώπιση των προκαρκινικών τραχηλικών βλαβών. Όμως στις περισσότερες περιπτώσεις, η έγκαιρη ανίχνευση μιας προκαρκινικής βλάβης είναι δύσκολη ακόμη και αδύνατη και ο εμβολιασμός κατά του HPV παραμένει το μόνο προληπτικό μέτρο κατά των περισσότερων ασθενειών που σχετίζονται με τον HPV [62]. Επομένως η έγκαιρη ανίχνευση απαιτεί μεθόδους με αυξημένη ευαισθησία που θα έχουν την δυνατότητα να ανιχνεύσουν την παρουσία ογκογόνων ή μη HPV ιών σε αρχικά στάδια, πριν την ανεξέλεγκτη πρόοδο της αλλοίωσης.



Η διάγνωση των μολύνσεων από HPV ιούς περιλαμβάνει κυρίως μοριακές τεχνικές ανίχνευσης τους, όπως για παράδειγμα PCR, Real Time-PCR σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας. Όμως παρά την επιτυχή ανίχνευση που εξασφαλίζουν, κάθε μία από αυτές τις μεθόδους φέρει και μειονεκτήματα. Αναλυτικά, ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ανίχνευση μέσω αυτών των τεχνικών είναι αρκετά ακριβός καθώς περιλαμβάνει εξειδικευμένα μηχανήματα και οι μέθοδοι οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων είναι περίπλοκες. Έτσι, είναι αναγκαίο να καθιερωθεί η χρήση νέων μοριακών τεχνικών με κύρια χαρακτηριστικά την αυξημένη ειδικότητα, την ταχύτητα, την ευκολία διεξαγωγής τους και το χαμηλό κόστος.

Μία τέτοια εναλλακτική προσέγγιση μπορεί να αποτελέσει η LAMP ( Loop-mediated isothermal amplification). Η LAMP είναι μία σχετικά νέα τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, που πραγματοποιείται σε ένα βήμα [54].

Η τεχνική LAMP αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο ανίχνευσης των ιών HPV καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση λόγω της χρήσης τεσσάρων ειδικών για την αλληλουχία στόχο εκκινητικών μορίων καθώς και υψηλή ευαισθησία λόγω της ικανότητας της να ανιχνεύει έως και 10 μόνο αντίγραφα του ιού. Σε αντίθεση με μια κανονική αντίδραση PCR, η LAMP διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία συνήθως μεταξύ 60-65 ° C επομένως δεν υπάρχει ανάγκη για χρήση θερμικού κυκλοποιητή μειώνοντας κατακόρυφα το κόστος καθώς δεν απαιτούνται εξειδικευμένα μηχανήματα για τη διεξαγωγή της. Επιπρόσθετα παρέχει υψηλή απόδοση ενίσχυσης, με το DNA να ενισχύεται  $10^9 - 10^{10}$  φορές σε 15-60 λεπτά. Λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της, η παρουσία του ενισχυμένου προϊόντος υποδεικνύει και την παρουσία του γονιδίου στόχου [49-53]. Κατ' επέκταση, η μαζική σύνθεση DNA κατά την αντίδραση έχει άμεση σχέση με την αύξηση της θολερότητας του διαλύματος (για την οποία ευθύνεται ο σχηματισμός του πυροφωσφορικού μαγνησίου ως παραπροϊόντος) και η μέτρησή της, με τη χρήση θολοσίμετρου, επιτρέπει την ποιοτική παρακολούθηση της αντίδρασης [64 γι].

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μιας γρήγορης και υψηλής ευαισθησίας τεχνικής LAMP για την ανίχνευση των ιών HPV-18 σε δείγματα του τραχήλου της μήτρας.

Επιλέχθηκε το γονίδιο E6 ως στόχος διότι όπως προαναφέρθηκε όταν πραγματοποιείται η ενσωμάτωση του ιού HPV στο γονιδίωμα το γονίδιο E6 (καθώς και το E7) δεν χάνεται ποτέ. Αντίθετα τα υπόλοιπα γονίδια μπορεί να χαθούν κατά την ενσωμάτωση είτε ολόκληρα είτε τμήματά τους επομένως δεν θα ήταν δυνατή η ανίχνευση του ιού παρά την παρουσία του.

Επιπλέον σε αυτό το γονίδιο ήταν δυνατή η εύρεση εκκινητών που μπορούν να διακρίνουν τον ιό HPV-18 που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία από τον HPV-16 αυξάνοντας την ειδικότητα της τεχνικής για την ανίχνευση του υπό μελέτη ιού.

Έπειτα από την πραγματοποίηση PCR (στα γονίδια E6 και L1 ) και LAMP η πλειοψηφία των θετικών δειγμάτων έδωσαν το αναμενόμενο θετικό αποτέλεσμα και στις τρεις μεθόδους. Ωστόσο τα δείγματα S 2542-14, S 392-16 και S 263-17 όπως φαίνεται και στον πίνακα των αποτελεσμάτων έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στο γονίδιο L1 και τη LAMP αλλά αρνητικό αποτέλεσμα στο γονίδιο E6. Πιθανώς θα έχει δημιουργηθεί κάποια σημειακή μετάλλαξη στο σημείο υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο E6 παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή τους και την επιτυχή ενίσχυση του DNA στόχου μέσω της PCR. Τα συγκεκριμένο ζήτημα δεν εξετάστηκε περαιτέρω αλλά είναι πιθανή η μελλοντική του ανάλυση σε κάποια νέα μελέτη.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας επιβεβαίωσαν με επιτυχία τα πλεονεκτήματα της LAMP . Συγκεκριμένα η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε ταχύτατα μέσα σε 25-30 λεπτά, χρονικό διάστημα εξαιρετικά μικρότερο από το αντίστοιχο που απαιτείται για την ανίχνευση του ιού μέσω της PCR. Επιπλέον αποδείχτηκε ως μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική με ελάχιστο όριο ανίχνευσης περίπου των 10 αντιγράφων του ιού στα κλινικά δείγματα γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη ως μελλοντικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό της μόλυνσης από τους ιούς HPV.

Κλείνοντας, ορισμένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου LAMP είναι η ταχύτητά της, η υψηλή ευαισθησία, η εξειδίκευση της ως προς την αλληλουχία στόχο και το χαμηλό κόστος της μεθόδου καθώς πραγματοποιείται ισοθερμικά και δεν απαιτεί ακριβά μηχανήματα για τη ρύθμιση των συνθηκών διεξαγωγής της. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με την αυξημένη επικινδυνότητα των ιών HPV καθώς και της ικανότητας της να τους ανιχνεύει επιτυχώς καθιστούν την LAMP μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο που θα μπορούσε να αποτελεί αναπόσπαστη τεχνική του διαγνωστικού ελέγχου για την ανίχνευση του ογκογόνου ιού HPV-18.

## **6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Yugawa T, Kiyono T.(2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* Mar;19(2):97-113
2. Narisawa -Saito M and Kiyono T.(2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* Oct;98(10):1505–11
3. Bergvall M, Melendy T , Archambault J.(2013) The E1 proteins. *Virology.* Oct; 445(1-2) :35–56
4. Conway M.J,Meyers C.(2009) Replication and Assembly of Human Papillomaviruses.*J Dent Res.* Apr;88(4):307-17
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausena H.(2004) Classification of papillomaviruses. *Virology.* Jun 20;324(1):17-27.
6. Bernard HU, Burk RD,Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM.(2010)Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology.* May 25; 401(1): 70–9.
7. de Villiers EM.(2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* Oct;445(1-2):2-10
8. Christensen ND.(2016)HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell.* Sep 5;3(9):476-490.
9. Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology.* Oct;445(1-2):11-20
10. Egawa N , Egawa K , Griffin H ,Doorbar J. (2015) Human Papillomaviruses, Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* Jul 16;7 (7):3863-90
11. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H.(2002)Modulation of the Cell Division Cycle by Human Papillomavirus Type 18 E4.*J Virol.* Nov;76(21):10914-20
12. Al Moustafa AE.(2015)E5 and E6/E7 of high-risk HPVs cooperate to enhance cancer progression through EMT initiation. *Cell Adh & Migr.* Apr ;9(5):392-3
13. Schiller JT, Müller M.(2015)Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *Lancet Oncol.* May;16(5): e217–25

14. Wang JW , Roden RB. (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. Oct; 445(1-2):175-86
15. McBride AA.(2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. Oct;445(1-2):57-79
16. McBride AA.(2017)Mechanisms and strategies of papillomavirus replication.*Biol Chem Jul*. 26; 398(8): 919–927
17. Wilson VG,West M,Woytek K,Rangasamy D.(2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. Jun;24(3):275-90
18. McKinney CC, Kim MJ, Chen D, McBride AA.(2016)Brd4 Activates Early Viral Transcriptio upon Human Papillomavirus 18 Infection of Primary Keratinocytes. *mBio*. Nov 22;7(6):e01644-16
19. Doorbar J.(2013) The E4protein:structure,function and patterns of expression. *Virology*. Oct; 445(1-2) :80-98
20. DiMaio D, Petti LM.(2013)The E5 proteins. *Virology*.Oct;445(1-2):99-114
21. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A,Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G.(2011)Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. Nov 11;10:140
22. Nomine Y ,Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F,Sibler AP, Desplancq D,Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G.(2006)Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein: Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis. *Mol Cell*. Mar 3;21(5):665–78
23. Jiang P,Yue Y.(2013)Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Exp Ther Med*. Jan;7(1):3-7
24. Mittal S, Banks L.(2017) Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation.*Mutat Res Rev Mutat Res*. Apr-Jun;772:23-35
25. Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaic V , Banks L.(2015)The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses*. Jul 2;7(7):3530-51
26. Zheng ZM , Baker CC.(2006) Papillomaviruses genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. Sep 1; 11: 2286–302.

27. Vande Pol SB, Klingelutz AJ.(2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. Oct; 445 (1-2):115-37
28. Mutirangural A, Sriuranponge V, Termrunggraunglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, Niruthisard S.(1998) Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer*. Oct; 78(7):933-9
29. Senba M, Mori N.(2012) Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*. Oct 5 ;6(2):e17
30. Thomas M, Banks L.(1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*. Jun;80 (Pt 6):1513-7
31. Roman A, Munger K.(2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. Oct;445 (1-2):138-68
32. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA.(2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J*. May 18; 24(10):1821-30
33. Fan X, Chen JJ.(2014) Role of Cdk1 in DNA damage-induced G1 checkpoint abrogation by the human papillomavirus E7 oncogene. *Cell Cycle*. ;13(20):3249-59
34. Chen JJ.(2010) Genomic Instability Induced By Human Papillomavirus Oncogenes. *N Am J Med Sci (Boston)*. April ; 3(2): 43-47.
35. Gao G, Johnson SH, Vasmatazis G, Pauley CE, Tombers NM, Kasperbauer JL, Smith DI.(2017) Common Fragile Sites (CFS) and Extremely Large CFS Genes Are Targets for Human Papillomavirus Integrations and Chromosome Rearrangements in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. Jan;56(1):59-74
36. Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI.(2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res*. Nov 1;60(21):5916-21
37. Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML.(2002) HPV16 and HPV18 in Genital Tumors: Significantly Different Levels of Viral Integration and Correlation to Tumor Invasiveness. *J Med Virol*. Aug;67(4):574-82
38. Villa LL, Schlegel R.(1991) Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology*. Mar; 181(1):374-7

39. Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One*. Jun 18;8(6):e66693
40. Day PM, Schiller JT.(2009)The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol*. Dec;4(10):1255–62
41. Simonetti AC, Melo JH , de Souza PR , Brunaska D ,de Lima Filho JL.(2009) Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. *Microbes Infect*. Apr;11(4):435-42
42. Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM.(2011)Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. *J Virol*. Aug;85(16):8080-92
43. Wang X, Liu H, Ge H, Ajiro M, Sharma NR, Meyers C, Morozov P, Tuschl T, Klar A, Court D, Zheng ZM. (2017)Viral DNA Replication Orientation and hnRNPs Regulate Transcription of the Human Papillomavirus 18 Late Promoter. *MBio*. May 30;8(3) pii:e00713-17
44. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. Apr 24;287 (16):2114-9
45. Colgan TJ.(2001) Pap test results. Responding to Bethesda system reports. *Can Fam Physician* Jul;47:1425-30.
46. Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* Oct;445(1-2):169-74
47. Hillemanns P, Soergel P ,Hertel H, Jentschke M.(2016)Epidemiology and Early Detection of Cervical Cancer. *Oncol Res Treat* ;39(9):501–6
48. Breitburd F ,Coursaget P.(1999)Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol*. Dec;9(6):431-44.
49. Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, Honda M, Kawase M, Nakagawa H.(2007)Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Human Papillomavirus Type 6, 11, 16, and 18.*J Med Virol*. May;79:605–15
50. Luo L, Nie K, Yang MJ, Wang M, Li J, Zhang C, Liu HT, Ma XJ.(2011)Visual Detection of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes 16,18, 45, 52, and 58 by Loop-Mediated Isothermal Amplification with Hydroxynaphthol Blue Dye. *J Clin Microbiol*. Oct;49(10):3545–50

51. Winer RL, Harris TG, Xi LF, Jansen KU, Hughes JP, Feng Q, Welebob C, Ho J, Lee SK, Carter JJ, Galloway DA, Kiviat NB, Koutsky LA.(2009)Quantitative Human Papillomavirus 16 and 18 Levels in Incident Infections and Cervical Lesion Development. *J Med Virol.* Apr;81(4): 713–21.
52. Saetiew C, Limpaboon T, Jearanaikoon P, Daduang S, Pientong C, Kerdsin A, Daduang J.(2011)Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* Dec;178(1-2):22-30
53. Yang JF, Zhao CZ , Lu KX.(2016)Development and application of a rapid detection system for human papillomavirus and Herpes simplex virus-2 by loop-mediated isothermal amplification assay. *Microb Pathog.* Aug;97:178-82
54. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000)Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;28(12):E63
55. Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F.(1998) The Human Papillomavirus Type 18 (HPV18) Replication Protein E1 Is a Transcriptional Activator When Interacting with HPV18 E2. *Virology* Mar. 15;242(2): 378–86
56. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO.(1990)The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* Feb;64(2):723-30
57. Nguyen HP, Ramírez-Fort MK, Rady PL.(2014) The Biology of Human Papillomaviruses. *Curr Probl Dermatol* ;45:19-32
58. Pretet JL,Charlot JF,Mougin C.(2007)Virological and carcinogenic aspects of HPV. *Bull Acad Natl Med.* Mar;191(3):611-23
59. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C , Murakami I.(2015) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* Mar;25 Suppl 1:2-23
60. Husain RS, Ramakrishnan V.(2015) Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Ann Glob Health.* Sep-Oct;81(5):675-83
61. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A.(2011) Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* Apr;33(4):581-6
62. Grce M, Mravak-Stipetić M.(2014)Human papillomavirus–associated diseases. *Clin Dermatol.* Mar-Apr;32(2):253-8

63. Bravo IG, Félez-Sánchez M.(2015) Papillomaviruses: Viral Evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health*. Jan 28;2015(1): 32–51
64. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T.(2004) Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*. May 31; 59(2):145–57