

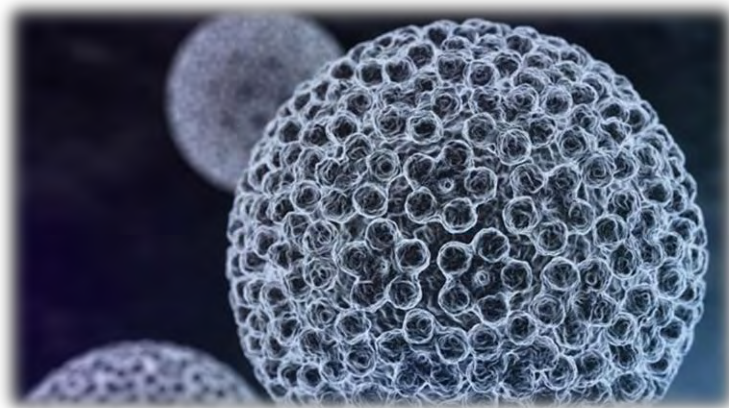


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“LAMP- loop mediated Isothermal Amplification, για την
ανίχνευση των ιών HPV-18 και άμεση οπτικοποίηση των
αποτελεσμάτων .”**

**“LAMP- loop mediated Isothermal Amplification, for the
detection of HPV-18 viruses and direct visualization of the
results”**



ΑΠΤΗ ΧΟΥΣΕΙΝ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ): Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ: Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από το Οκτώβριο του 2017 έως τον Ιούνιο του 2018.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την υπομονή του κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, για την επίλυση διαφόρων θεμάτων.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Δάσκου Μαρία και τον Δρ. Δημητρίου Τηλέμαχο με τους οποίους συνεργαστήκαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου και από την πρώτη μέχρι την τελευταία μέρα ήταν πάντα δίπλα μου για να με βοηθήσουν, πάντα έχοντας την καλύτερη πρόθεση, καθώς και τον Δρ. Δημήτρη Τσακογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια του.

Θα θελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV, Human Papilloma Virus), είναι μικροί ιοί με κυκλικό δίκλωνο DNA με μέγεθος περίπου 8kb. Το γονιδίωμά τους περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, καθώς δε διαθέτουν επιπλέον εξωτερικό περίβλημα.

Κάποιες μορφές του ιού HPV μπορούν να προκαλέσουν κονδυλώματα, ενώ κάποιες άλλες μορφές μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση η οποία θα επιφέρει προ-καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί HPV ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες: (High Risk and Low Risk), ανάλογα με την επικινδυνότητά τους και την ικανότητά τους να προκαλέσουν κακοήθεια.

Μερικές μορφές των HPVs, οι γενότυποι χαμηλού κινδύνου (Low Risk) και πιο συγκεκριμένα οι τύποι 6,11,40,42,43,44,55,61,70,71,81,84 και 89, μπορούν να προκαλέσουν κονδυλώματα, Αντίθετα, οι υψηλού κινδύνου HPVs και πιο συγκεκριμένα οι γενότυποι 16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,66,68,70,73,82 και 85 (High Risk) έχουν την τάση να ενσωματώνονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα με αποτέλεσμα να οδηγούν αρχικά σε προ-καρκινικές αλλοιώσεις που ενδέχεται να εξελιχθούν σε καρκίνο.

Το γονιδίωμα των HPVs φέρει οχτώ ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ORFs που κωδικοποιούν πρώιμες (Early: E1, E2, E4, E5, E6, E7) και όψιμες (Late: L1, L2) πρωτεΐνες.

Η εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου συνήθως συνδέεται με μόλυνση από HPVs υψηλού κινδύνου (High Risk). Έπειτα από τη μόλυνση, προκαλείται απορρύθμιση της έκφρασης των πρώιμων ιικών γονιδίων E6 και E7. Η ανεξέλεγκτη έκφραση των γονιδίων αυτών οδηγεί στον συνεχή πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων από τον HPV ιό, και στη συσσώρευση μεταλλάξεων στα κύτταρα αυτά. Αυτό συμβαίνει καθώς ο στόχος των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 είναι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και η pRB αντίστοιχα, των οποίων τροποποιούν τη λειτουργία.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια για την εφαρμογή της τεχνικής Colorimetric LAMP με σκοπό την ανίχνευση και την άμεση οπτικοποίηση των ιών HPV-18 ταχύτατα και με υψηλή εξειδίκευση σε κλινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας.

Η παρούσα τεχνική LAMP είναι μια γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική για την ενίσχυση νουκλεοτιδικών στόχων. Χρησιμοποιεί τέσσερις εκκινητές που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου και έτσι εξασφαλίζεται η υψηλή εξειδίκευση της.

Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε κλινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας επιβεβαίωσαν την ικανότητα της να ανιχνεύει τους ιούς HPV-18 ακόμη και σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ήταν άμεση, καθώς μετά το πέρας της αντίδρασης είχαμε χρωματική αλλαγή στα δείγματα, από κόκκινο που ήταν το αρχικό σε κίτρινο που σημαίνει ότι το δείγμα μας είναι θετικό ως προς τον HPV-18.

ABSTRACT:

Human Papilloma viruses (HPVs) are small non enveloped viruses. Their genome is a circular double strand DNA molecule of 8 Kb nucleotides in length, surrounded by an icosahedral protein capsid.

Some types of HPVs can cause warts, while others can cause pre-cancerous lesions. HPVs can be separated into two different groups (High Risk and Low Risk) due to their ability to cause malignancy.

Low risk HPVs such as types 6,11,40,42,43,44,55,61,70,71,81,84 and 89, can cause warts. On the other hand, high risk genotypes such as types 16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,66,68,70,73,82 and 85 can be incorporated to hosts genome and cause pre-cancerous lesions than can evolved to malignancy.

The genome of HPVs consisted of eight open reading frames (ORFs) that encode early (E1, E2, E4, E5, E6 and E7) and late (L1, L2) proteins.

Cancer development is often linked to infection with a high risk HPV. During the infection, when the virus genome is incorporated to host genome, there is a loss of regulation in the transcription and translation of E6 and E7 oncoproteins. This uncontrollable expression of these two proteins leads to continuous proliferation of the infected cells and as a result the accumulation of mutations of infected cells. The targets of E6 and E7 oncoproteins are the proteins p53 and pRB respectively.

In the present study we developed a new Colorimetric LAMP assay in order to detect and visualize HPV-18 genotype with high specificity and sensitivity in cervical samples.

LAMP assay is a rapid and low cost technique amplifying nucleotide targets. In this study we used four different primers that target to six distinct regions of the amplified gene. As a result our assay showed high specificity for the target.

The application of the assay in cervical samples proved the ability of colorimetric LAMP to detect HPV-18 even in samples with a low viral copy number. Direct visualization of the results was possible by the naked eye, since at the end of the process there was a color change from red to yellow in HPV-18 positive samples.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	1
1.2 Ταξινόμηση των Papillomaviridae	1
1.3 Δομή των Human Papillomavirus (HPV)	3
1.4 Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος	4
1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E1	6
1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E2	8
1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E4	8
1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E5	9
1.4.6 Η ιική πρωτεΐνη E6	10
1.4.7 Η ιική πρωτεΐνη E7	12
1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος	13
1.6 Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή	16
1.7 Αντιγραφή των HPV	17
1.7.1 Μεταγραφή των HPV.....	18
1.7.2 Καψιδιακή συναρμολόγηση και η απελευθέρωση του ιού HPV.....	18
1.8 Ιστολογικές αλλοιώσεις- Κλινικά συμπτώματα	19
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
3.1 Κλινικά δείγματα HPV	21
3.2 Εκχύλιση DNA από κλινικά δείγματα	21
3.3 Έλεγχος θετικών δειγμάτων για HPV18 και έλεγχος εκχύλισης	23
3.4 PCR σε HPV-18 θετικά δείγματα για κατασκευή πλασμιδίων	24
3.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	25
3.6 Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης	26
3.7 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR	26
3.8 Διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων για την εύρεση του ενός αντιγράφου..	27
3.9 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων	28
3.10 Η τεχνική LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)	28
3.10.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την ανίχνευση των ιών HPV-18	29
3.10.2 Αλληλουχία των εκκινητών	30
3.10.3 Στάδια ενίσχυσης του στόχου	30

3.11	Colorimetric LAMP για την ευαισθησία της τεχνικής εκφρασμένη σε πλασμίδα	32
3.12	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP	33
3.13	Έλεγχος για την εξειδίκευση της τεχνικής Colorimetric LAMP	33
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
4.1	PCR και LAMP στα κλινικά δείγματα.....	34
4.2	Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων	36
4.3	Πρότυπη καμπύλη (Standard curve)	36
4.4	Colorimetric LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων	37
4.5	Ηλεκτροφόρηση της Colorimetric LAMP στις πλασμιδιακές αραιώσεις	37
4.6	Colorimetric LAMP σε θετικά δείγματα.....	38
4.7	Ηλεκτροφόρηση θετικών δειγμάτων από την Colorimetric LAMP.....	38
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV, Human Papilloma Virus) ανήκουν στην οικογένεια Papillomaviridae. Το γονιδίωμά τους είναι ένα μικρό κυκλικό δίκλωνο DNA με μέγεθος περίπου 8 kb. Οι HPVs δε φέρουν εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα, αλλά διαθέτουν αποκλειστικά ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το όνομα των HPVs προέρχεται από την λατινική λέξη <<papilla>> που σημαίνει θηλή και την ελληνική κατάληξη <<-oma>> που σημαίνει όγκος.

Οι HPVs χωρίζονται σε δυο ομάδες: σε χαμηλού κινδύνου (Low Risk) όπου συνήθως προκαλούν καλοήθεις όγκους και σπάνια σχετίζονται με τον καρκίνο και σε υψηλού κινδύνου (High Risk), οι οποίοι προκαλούν κακοήθεις όγκους και σχετίζονται με περισσότερο από το 90% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας [Van Doorslaer et al 2013, Senba M et al 2012].

Επίσης, να σημειωθεί ότι ο HPV-18 είναι ο δεύτερος πιο συχνός παράγοντας που σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η πλειονότητα των καρκίνων αυτών προκαλείται από τον ιό HPV-16, ωστόσο τόσο ο HPV-18, όσο και ο HPV-16 ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου [Narisawa-Saito et al 2007].

1.2 Ταξινόμηση των Papillomaviridae

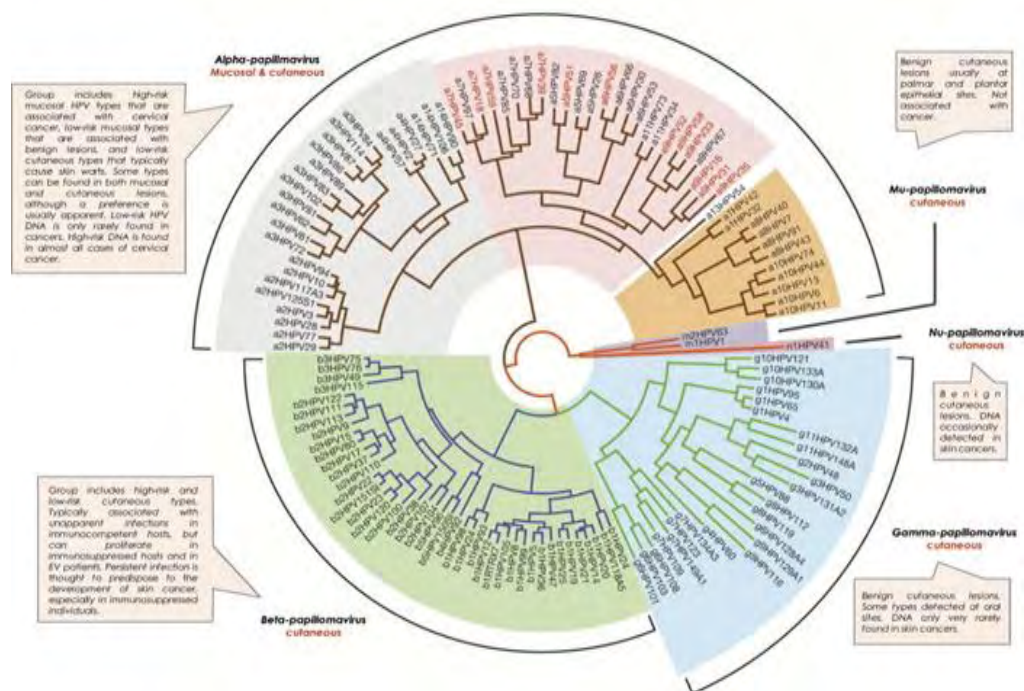
Πριν την αλληλούχηση και την ανάλυση των γονιδιωμάτων των ιών, οι Papilloma ιοί ταξινομήθηκαν στην οικογένεια Papovaviridae μαζί με τους ιούς Polyoma, καθώς είχαν παρόμοια καψιδιακή δομή, μορφή γονιδιώματος και έλλειψη εξωτερικού περιβλήματος.

Αργότερα με τη συμβολή της αλληλούχησης διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε καμία ομολογία καθώς διέφεραν ως προς την οργάνωση και στο μέγεθος, (τόσο σε νουκλεοτιδική όσο και σε αμινοξική αλληλουχία). Σύμφωνα με το (ICTV) τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των ιών, οι ιοί αυτοί διαχωρίστηκαν σε δυο διαφορετικές οικογένειες, την οικογένεια των Papillomaviridae και την οικογένεια Polyomaviridae [de Villiers EM et al 2004].

Οι Papilloma ιοί χωρίζονται σε 16 γένη τα οποία έχουν ομολογία 60% στην L1 περιοχή. Το όνομα του κάθε γένους προέρχεται από το ελληνικό αλφάβητο (Από το Άλφα μέχρι το Πι) [de Villiers EM et al 2004].

Οι PVs ταξινομούνται σε διάφορα γένη και τύπους ανάλογα με το ποιους οργανισμούς πρόκειται να προσβάλλουν. Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε διαφορετικά γένη (Alpha,Beta,Gamma,Mu και Nu), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους και τη συσχέτισή τους με διάφορες ασθένειες.

Το μεγαλύτερο ποσοστό HPV ιών που έχει μελετηθεί, ανήκει στο γένος Alpha. Το γένος αυτό, διακρίνεται σε ιούς χαμηλού και υψηλού κινδύνου όπου προκαλούν αλλοιώσεις στο βλεννογόνο και στο δερματικό επιθήλιο. Τα υπόλοιπα γένη ιών μολύνουν κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος [Doorbar J et al 2012, Senba M et al 2012].



Εικόνα 1.2.1 : Τα πέντε γένη των HPV, με το γένος Alpha να καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος [Doorbar J et. al 2012].

Μια προσέγγιση για την ταξινόμηση των HPVs, αφού δεν υπάρχει η δυνατότητα κυτταροκαλλιέργειας, βασίστηκε σε ομοιότητες νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του L1 ORF. Το γονίδιο L1 είναι το πιο συντηρημένο, αφού παρουσιάζει έλλειψη ενδείξεων ανασυνδιασμού μεταξύ των διαφόρων τύπων ιών HPV [Buck CB. et al 2013, Baidya S. et al 2017].

Επιπλέον, το γονίδιο L1 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της κύριας πρωτεΐνης του καψιδίου του ιού, η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή των νέων ιικών σωματιδίων του HPV. Επίσης είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι εκτός από την ταξινόμηση

χρησιμοποιείται και για την δημιουργία φυλογενετικών δέντρων για τους HPV's [Hans-Ulrick Bernard. et al 2010].

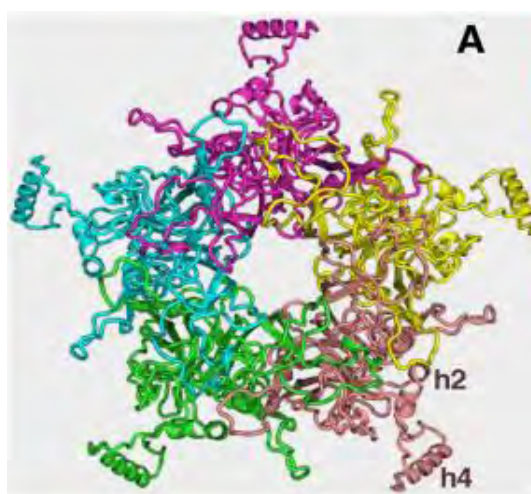
Τέλος, σύμφωνα με τον τροπισμό των ιών HPV, μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: στους HPV που μολύνουν το βλεννογόνο επιθήλιο και σε αυτούς που μολύνουν το δερματικό επιθήλιο. Οι πρώτοι διακρίνονται περαιτέρω σε υψηλού κινδύνου(High Risk), ενδιάμεσου κινδύνου(Middle Risk) και στους χαμηλού κινδύνου(Low Risk) με βάση την ογκογονικότητά τους, με τους High Risk HPV-16,18,31 να αγγίζουν το ποσοστό του 95% ως κύριος αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [Zhi-Ming Zheng. et al 2006].

1.3 Δομή των Human Papillomavirus (HPV)

Οι ιοί HPV αποτελούνται από διπλή έλικα DNA περιβεβλημένη από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο χωρίς έλυτρο με διάμετρο 55-60nm.

Το καψίδιο το οποίο περιβάλλει το γονιδίωμα του ιού, αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες εκφράζονται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. Τρισδιάστατες δομές του ιού αποκάλυψαν ότι η εξωτερική επιφάνεια των ισοσωματίων των HPV's αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1, η οποία σχηματίζει T=7 (triangulation number) εικοσαεδρικά καψίδια [Buck CB et al 2013, T S Baker et al 1991].

Έχει διαπιστωθεί ότι η κρυσταλλική δομή της μικρότερης δομικής μονάδας T=1 περιέχει δώδεκα L1 πενταμερή [Broke Bishop et al 2007].



Εικόνα 1.3.1 : Όψη του L1 πενταμερούς. Με τις πλευρικές προεξοχές από τα πέντε μονομερή [Broke Bishop. et al 2007].

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του ώριμου καψιδίου και έχει μοριακό βάρος 55 kDa. Η πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας ο οποίος συμβάλλει στην αναγνώριση των ιικών σωματιδίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να αυτοσυναρμολογείται σε Virus Like Particles (VLPs) κάτι που δεν μπορεί να κάνει η L2 [Joshua W Wang et al 2003, McBride AA et al 2017].

Η L1 συμβάλλει τόσο στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο-ιστό του ξενιστή, όσο και στην απελευθέρωση του γονιδιώματος στο εσωτερικό του κυττάρου-στόχου. Μετά τη μόλυνση ο ιός οδηγείται προς τον πυρήνα με αποτέλεσμα η L1 να καταστρέφεται [McBride AA et al 2017].

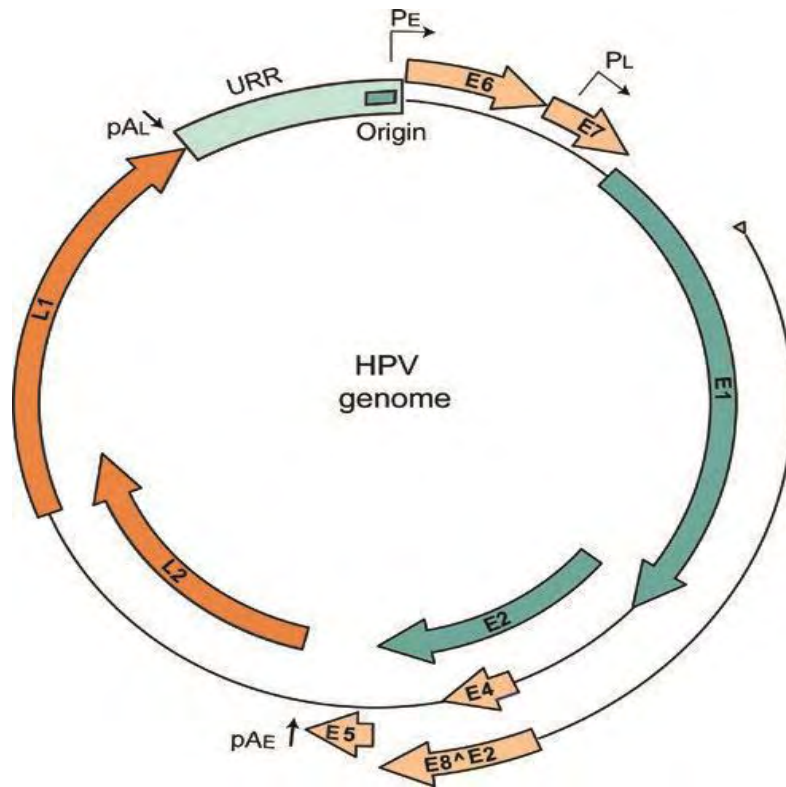
Αντίθετα, η δευτερεύουσα πρωτεΐνη L2 συνδέεται με τα πενταμερή της πρωτεΐνης L1 στην COOH-τελική περιοχή δέσμευσης της. Η πρωτεΐνη L2 χαρακτηρίζεται από πολλά κατάλοιπα προλίνης (PxxP), κάτι που σημαίνει ότι δεν επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες, όπως για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση αλάτων, ασθενών απορρυπαντικών, ουρίας, PH και υποδηλώνει ότι ο τρόπος αλληλεπίδρασης μεταξύ της L1 και L2 είναι υδρόφοβος [Joshua W Wang et al 2003].

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 αποτελείται από λιγότερα από 500 αμινοξέα με μοριακή μάζα περίπου 55 kDa. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην συναρμολόγηση του ιού HPV, όσο και στην μολυσματική διαδικασία. Η L2 έχει διάφορους λειτουργικούς ρόλους αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες-συνεργάτες. Συγκεκριμένα, η L2 αλληλεπιδρά με τις ικές πρωτεΐνες L1 και E2 κατά την συναρμολόγηση και το πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων [El Mehdaoui S et al 2000].

Τέλος, πολλές πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή έχουν αναγνωριστεί ότι αλληλεπιδρούν με την L2 με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την είσοδο με διάφορους μηχανισμούς στον πυρήνα του κυττάρου [Joshua W Wang et al 2003].

1.4 Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των HPVs είναι δίκλωνο κυκλικό με μέγεθος περίπου 8 kb. Το γονιδίωμα των HPVs χωρίζεται σε 3 περιοχές. Περιέχει οκτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORFs με δύο δομικές πρωτεΐνες-γονίδια L1 και L2 και έξι μη-δομικές ικές πρωτεΐνες-γονίδια E1, E2, E4, E5, E6 και E7 με διαφορετικές λειτουργίες η κάθε μια [Wang X et al 2011].



Εικόνα 1.4.1 : Όψη του γονιδιώματος του ανθρώπινου ιού θηλώματος (HPV). Παρατηρούμε όλες τις πρωτεΐνες του ιού E1,E2,E4,E5,E6 και E7, καθώς και τις δομικές πρωτεΐνες L1 και L2. Η ρυθμιστική περιοχή URR, οι πρώιμοι και όψιμοι υποκινητές PE και PL και οι pAE και pAL είναι οι πρώιμες και οι όψιμες θέσεις πολυαδενυλίωσης και η περιοχή ori που είναι η θέση έναρξης της αντιγραφής [Mallory E Harden et al 20017].

Η ρυθμιστική περιοχή LCR (Long Control Region), η οποία λέγεται και μακρά περιοχή ελέγχου έχει μέγεθος περίπου 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF). Η περιοχή αυτή βρίσκεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6. Η LCR περιοχή είναι μια συντηρημένη περιοχή καθώς περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιικού DNA [Wang X et al 2011, C. Demeret 1995].

Η πρώιμη περιοχή E (Early Region) η οποία βρίσκεται στο 5'-άκρο του γονιδιώματος, κωδικοποιεί ικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεταγραφή, την αντιγραφή καθώς και στην παθογένεια του ιού [Wang X et al 2011, Van Doorslaer et al 2018].

Τέλος, υπάρχει και η όψιμη περιοχή L (Late Region) η οποία κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο.

Οι τρεις αυτές περιοχές υπάρχουν σε όλους τους Human Papilloma Virus και χωρίζονται από δυο θέσεις πολυαδενυλίωσης (pA), την όψιμη θέση pA (AL) και την πρώιμη θέση pA (AE), με την πρώιμη να καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γονιδιώματος [Zhi Ming Zheng et al 2006].

Οι πρώιμες πρωτεΐνες μπορούν να υποδιαιβρεθούν περαιτέρω σε αυτές που εμπλέκονται στην αντιγραφή και τη μεταγραφή (E1 και E2), σε αυτές με ογκογόνο δράση (E5, E6 και E7) και στην E4, η οποία συμβάλλει στην παραγωγή ιοσωματίων και παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης πλησιέστερο προς τις όψιμες πρωτεΐνες [Narisawa-Saito et al 2007, H Y Ngan et al 1994].

Αφού ο ιός μολύνει τα κύτταρα της βασικής στιβάδας, το ιικό DNA αναδιπλασιάζεται χωρίς να παράγει ιοσωμάτια. Σε αυτή τη φάση τα επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 είναι χαμηλά. Αυτές οι μολύνσεις μπορούν να διατηρηθούν για χρόνια ακόμη και δεκαετίες. Όταν στα κύτταρα αυτά η έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 αυξηθεί σημαντικά, μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων που δημιουργούνται και της ολοένα και αυξημένης ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα έχουμε τα πρώτα στάδια εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [Narisawa-Saito M et al 2007].

Η όψιμη περιοχή καταλαμβάνει περίπου το 40% του γονιδιώματος του ιού όπου βρίσκεται καθοδικά της πρώιμης περιοχής και κωδικοποιεί για δυο ORFs, δηλαδή για τα γονίδια L1 και L2. Επίσης, στο μικρό γονιδίωμα αυτών των ιών υπάρχουν δυο υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των γονιδίων. Συγκεκριμένα είναι ο υποκινητής PE (Early Promoter) ή (p105 στον HPV-18) για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων, υπάρχει και ο PL (Late Promoter) για την έκφραση των όψιμων γονιδίων στα τελικός διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα [Van Doorslaer et al 2013].

1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E1

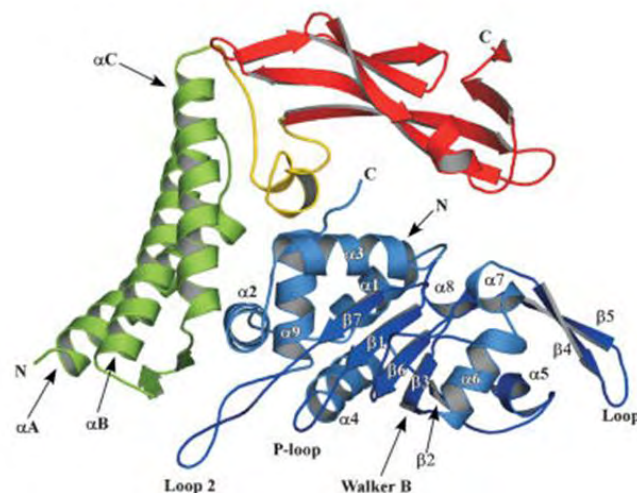
Η E1 είναι μια πρωτεΐνη εκκινητής της αντιγραφής των ιών HPV, με μέγεθος περίπου 70 kDa [Demeret C. et al 1995]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (E1) είναι μια ελικάση/ΑΤΡάση προσδεδεμένη σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής ori (Origin of Replication) η οποία βρίσκεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων [Mallory E Harden et al 2017].

Η πρωτεΐνη E1 με δραστικότητα ελικάση/ΑΤΡάσης έχει την δυνατότητα να συνδυάζεται με την E2 πρωτεΐνη και να σχηματίζει ένα μεταγραφικό δραστικό σύμπλοκο κατά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA [Demeret C. et al 1995].

Έχει δειχθεί ότι παρουσιάζει μια λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του ιού SV-40 [Hughescet F J al 1993].

Η δομή της πρωτεΐνης E1 μπορεί να διακριθεί σε τρία τμήματα:

1. Μια N-τελική ρυθμιστική περιοχή που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του γονιδιώματος
2. Την κεντρική περιοχή δέσμησης της θέσεις έναρξης της αντιγραφής (ori) , γνωστή ως περιοχή δέσμησης DNA.
3. Μια COOH-τελική επικράτεια που είναι σημαντική για την αυτοσυγκράτηση εξαμερών που είναι ικανά να ξετυλίγουν το δίκλωνο DNA μπροστά στην αντιγραφική διχάλα, με τρόπο εξαρτώμενο από το ATP [Hughes F J. et al 1993].



Εικόνα 1.4.2.1 :Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της E1 με την E2. Με μπλε η E1 πρωτεΐνη με κόκκινο η δομική πρωτεΐνη της E2 και με πράσινο χρώμα το NH₂-άκρο της E2 [Eric A. Abbate et al 2004].

Για να γίνει η αντιγραφή του DNA του ιού HPV-18 απαιτούνται οι δυο κύριες πρωτεΐνες E1 και E2, μια θέση για την έναρξη της αντιγραφής και αλληλουχίες που είναι πλούσιες σε A/T. Μεταλλάξεις στην E1 πρωτεΐνη παρεμποδίζουν την σύνθεσή του ATP με αποτέλεσμα να είναι ελαττωματική ως προς την αντιγραφή του ιικού DNA. Τέλος, η E1 πρωτεΐνη μπορεί να είναι ένας στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων αφού η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού [Hughes F J et al 1993, Demeret C et al 1998].

1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η ιική πρωτεΐνη E2 των HPV έχει μέγεθος περίπου 50 kDa και είναι ζωτικής σημασίας για τον ιό, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του αφού συμμετέχει σε αρκετές διεργασίες. Για παράδειγμα, συμμετέχει στην ρύθμιση της μεταγραφής, στην έναρξη της αντιγραφής καθώς και στην κατανομή του ιικού γονιδιώματος. Η E2 εκφράζεται στα πρώιμα και στα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού [McBride AA et al 2013].

Η E2 πρωτεΐνη αποτελείται από μια συντηρημένη N-τελική περιοχή μήκους περίπου 200-210 αμινοξέων συνδεδεμένη σε μια C-τελική επικράτεια σύνδεσης DNA διμερισμού μήκους 100 αμινοξέων (Terminal DNA Binding Dimerization Domain), η οποία αποτελεί μια trans περιοχή ενεργοποίησης που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με την ιική E1 [McBride et al 2013, Jang MK et al 2015]. Επίσης, επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας ορισμένων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, δρα καταστέλλοντας τον πρώιμο ιικό υποκινητή, μειώνοντας έτσι την έκφραση των E6 και E7 ογκογονιδίων.

Συγκεκριμένα όταν η E2 δεσμευθεί πλησίον του πρώιμου υποκινητή p105 του HPV18, καταστέλλει τη μεταγραφή, ενώ ενεργοποιεί την αντιγραφή παρουσία της E1. Τέλος αφού δημιουργηθεί το σύμπλοκο E1/E2, προκαλείται αναδιάταξη του DNA με αποτέλεσμα να προσελκύονται περισσότερα μόρια E1 για να ξεκινήσει η αντιγραφή [Cripe TP 1987, McBride AA et al 2013, Jang MK et al 2015].

1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται κεντρικά εντός του E2 ORF, της οποίας τα πρώτα πέντε αμινοξέα προέρχονται από το E1 ORF και αναφέρεται ως E1^{E4}. Συγκεκριμένα η E4 πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα ματισμένο μετάγραφο mRNA E1^{E4}.

Η E4 συμβάλλει σημαντικά τόσο στην σύνθεση, όσο και στον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος του ιού. Εκφράζεται κυρίως στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού και ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα από τις άλλες πρωτεΐνες σε αυτή τη φάση, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν έχει πρόσθετους ρόλους στην απελευθέρωση και στη μετάδοση του ιού [Nagayasu Egawa et al 2017, Doorbar J et al 2013].

Παρόλα αυτά όμως, η λειτουργία της E1^{E4} μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών, καθώς κάθε ομάδα HPV στην συγκεκριμένη πρωτεΐνη E1^{E4} έχει διαφορετική λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα η λειτουργία της E1^{E4} στον HPV-16 είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M, ενώ στον HPV-18 έχει δειχθεί ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου, στην μολυσματικότητα του ιού αλλά και στην ωρίμανση του [Doorbar J et al 2013].

Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1^{E4} αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων [Roberts S et al 1994].

Η συγκέντρωση της E4, μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως βιοδείκτης της ενεργού λοίμωξης με HPV και ως δείκτης της σοβαρότητας της νόσου [Doorbar J et al 2013].

Τέλος, η E1^{E4} μπορεί να συσχετισθεί με τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα να επάγει απόπτωση [Birgukov J et al 2017].

1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη περίπου 83 αμινοξέων. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στην συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Κύριος στόχος της E5 πρωτεΐνης είναι να συνδέεται με τον υποδοχέα EGF (Epidermal Growth Factor), ενώ στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών η E5 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον παράγοντα PDGF [Dimaiio D et al 2013].

Επίσης, συνδέεται με την ATPάση των χυμοτοπίων επηρεάζοντας την έκφραση των MHC τάξης I και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων.

Η E5 ογκοπρωτεΐνη της ομάδας HPV υψηλού κινδύνου έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην καρκινογένεση μέσω συνεργασίας με τις άλλες δυο ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 και

μετασχηματίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας απορρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Παρόλο που η E5 πρωτεΐνη έχει την ικανότητα μετασχηματισμού των κερατινοκυττάρων, η δράση της είναι ασθενέστερη σε σχέση με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 [Ranieri D et al 2015].

Σε μελέτες αποδείχθηκε ότι η E5 ογκοπρωτεΐνη στους HPV-16 ρυθμίζει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα VEGF, μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών όπως των EGFR, MEK, ERK-1, ERK-2, PI3K και Akt, άρα σύμφωνα με αυτά μπορούμε να πούμε ότι η πρωτεΐνη E5 καθώς και οι E6 και E7 μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου [Ala Eddin Al Moustafa et al 2015].

Όπως προαναφέρθηκε, οι HPVs έχουν ταξινομηθεί σε 5 γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu). Ιοί που ανήκουν σε διαφορετικά γένη δεν εκφράζουν τις ίδιες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, στο γένος Alpha όλοι οι ιοί κωδικοποιούν και εκφράζουν την E5 πρωτεΐνη, ενώ ιοί που ανήκουν στο γένος Beta όχι, καθώς δεν είναι απαραίτητη για τον κύκλο ζωής τους.

Τέλος, σε καρκίνο του τραχήλου το γονίδιο E5 μπορεί να διαγράφεται μετά την ενσωμάτωση του ιού [Jiang P et al 2014].

1.4.6 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 των HPVs είναι μια μικρή ογκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 150 αμινοξέα και έχει σημαντικό ρόλο στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν έρθει σε επαφή με HPV υψηλού κινδύνου [Jiang P et al 2014].

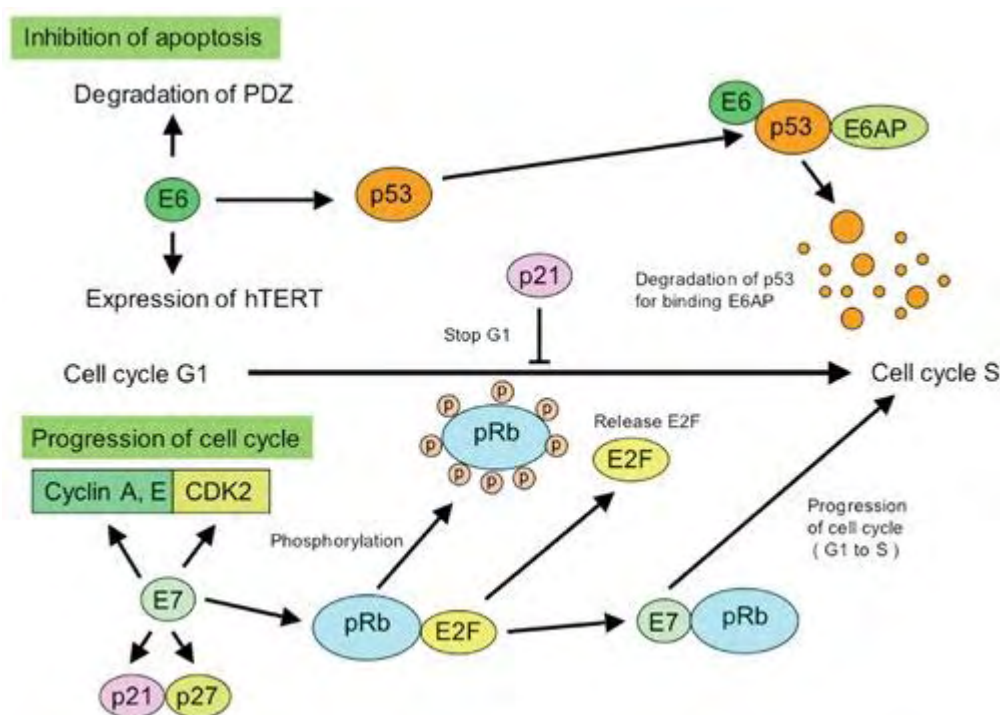
Η E6, περιλαμβάνει δυο περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αποτελεί μια συντηρημένη περιοχή των HPVs, καθώς διαδραματίζει σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής τους [Hungnes F J et al 1993].

Η E6 ογκοπρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων όπου και συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες. Για να προκαλέσει αθανатоποίηση των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων η E6 πρωτεΐνη θα πρέπει να υπάρχει ταυτόχρονη έκφραση και της ογκοπρωτεΐνης E7, καθώς από μόνη της δεν είναι ικανή να το κάνει [Hawley P-Nelson et al 1989].

Η πρώτη και η συνηθέστερη αλληλεπίδραση της E6 είναι η με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του κυττάρου p53, πιο συγκεκριμένα η E6 προσδένεται στην

λιγάση της ουβικιτίνης E6AP σχηματίζοντας το σύμπλοκο E6/E6AP. Έτσι, η p53 οδηγείται στα πρωτεασώματα όπου και αποικοδομείται [Van Doorslaer et al 2013].

Μια άλλη αλληλεπίδραση της p53 είναι με την p21, η οποία είναι αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Όταν το κύτταρο αντιμετωπίζει κάποια προβλήματα στο DNA, η p53 δρα ως μόριο αισθητήρας και ενεργοποιεί την p21, η οποία θα αναστείλει με τη σειρά της τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό να επιδιορθωθεί η βλάβη. Όμως, εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί, τότε το κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση με την βοήθεια της p53 [Artandi S E et al 2005].



Εικόνα 1.4.6.1: Μια αναπαράσταση των δράσεων των ογκοπρωτεϊνών, καθώς και η αποικοδόμηση του κυττάρου [Senba M. et al 2012].

Οι πρωτεΐνες E6 των HPV χαμηλού κινδύνου δεν προκαλούν αποικοδόμηση της p53 λόγω του ότι συνδέονται σε αυτή με πολύ χαμηλή συγγένεια [Mittal S et al 2017].

Με την αδρανοποίηση της p53 ο ιός αποτρέπει την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων και έτσι έχουμε τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA του κυττάρου [Jiang P. et al 2014].

Η απώλεια λειτουργίας της p53 έχει ως αποτέλεσμα να μην λειτουργούν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και η παράκαμψη των σημείων ελέγχου

του κυτταρικού κύκλου που τελικά θα οδηγήσουν σε γενωμική αστάθεια [Senba M et al 2012].

Μια άλλη λειτουργία της πρωτεΐνης E6 είναι η αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με την E6 και αποικοδομούνται [Nguyen ML et al 2003].

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η E6 μπορεί να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα c-myc [Jiang P. et al 2014].

Τέλος, μια άλλη αλληλεπίδραση της E6 ογκοπρωτεΐνης είναι με την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (BAK, BAX), οι οποίες σχετίζονται με αποπτωτικά μονοπάτια. Η E6 φαίνεται ότι αποικοδομεί μέσω ουβικιτίνωσης στις πρωτεΐνες αυτές [Thomas M. et al 1999].

1.4.7 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την δημιουργία αθάνατων κυττάρων. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα, όμως εντοπίζεται και στον πυρήνα. Σε συνδυασμό με την ογκοπρωτεΐνη E6 επάγει την έναρξη της ογκογένεσης καθώς και την γενωμική αστάθεια στα μολυσμένα με HPV κύτταρα.

Η ογκοπρωτεΐνη E7 είναι μια μικρή πυρηνική φώσφοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 100 αμινοξέα και διαχωρίζεται σε τρεις συντηρημένες περιοχές τις CR1, CR2 και την CR3 (Conserved Regions).

Η E7 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη pRB και τις p103, p107 που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα E2F.

Η περιοχή CR2 περιέχει το μοτίβο LXCXE το οποίο βοηθά στη σύνδεση της E7 με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Αντίθετα η περιοχή CR1 είναι απαραίτητη για τον μετασχηματισμό των κυττάρων και την αποικοδόμηση της pRB, ενώ η CR3 αποτελούμενη από δυο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRB καθώς και με άλλες πρωτεΐνες [Margaret E. McLaughlin et al 2009, Roman A. et al 2013].

Κατά την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη pRB αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F και αναστέλλει την έκφραση των

γονιδίων που συμβάλλουν στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [Narisawa-Saito M. et al 2007].

Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες E και A καθώς και με τους αναστολείς των (cdks) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα, η E7 αυξάνει τα επίπεδα των E και A κυκλινών οι οποίες μπλοκάρουν την δράση των p21 και p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της RB και άρα να οδηγούμαστε σε πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [Funk JO et al 1997]. Σύμφωνα με τα παραπάνω προκαλείται απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Τέλος, ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός της E7 είναι η δέσμευση της σε απακετυλάσες ιστονών (HDACs), μέσω δακτυλίων ψευδαργύρου. Έτσι, παρεμποδίζεται η δράση των HDACs στους υποκινητές των γονιδίων, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση της μεταγραφής τους [Narisawa-Saito M et al 2007].

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
E1	DNA ΑΤΡάση/Ελικάση, εμπλέκεται στο ξετύλιγμα του ιικού γενώματος επιτρέποντας την επιμήκυνση της αντιγραφής.
E2	Δημιουργεί σύμπλοκα με την E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή και την αντιγραφή του ιικού γενώματος αφού αναγνωρίζει την θέση αντιγραφής.
E3	Λειτουργία άγνωστη.
E4	Δημιουργεί σύμπλοκο με την E1 (E1 ^{E4}) όπου εκφράζονται στην όψιμη φάση, συμβάλλοντας στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M.
E5	Ογκοπρωτεΐνη με κύριο στόχο τον EGF.
E6	Ογκοπρωτεΐνη που προκαλεί μετασχηματισμό των κυττάρων αναστέλλοντας την δράση της p53.
E7	Ογκοπρωτεΐνη που προκαλεί μετασχηματισμό των κυττάρων αναστέλλοντας την δράση της pRB.
E8	Λειτουργία άγνωστη.
L1	Καψιδιακή πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου.
L2	Καψιδιακή πρωτεΐνη που πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA.

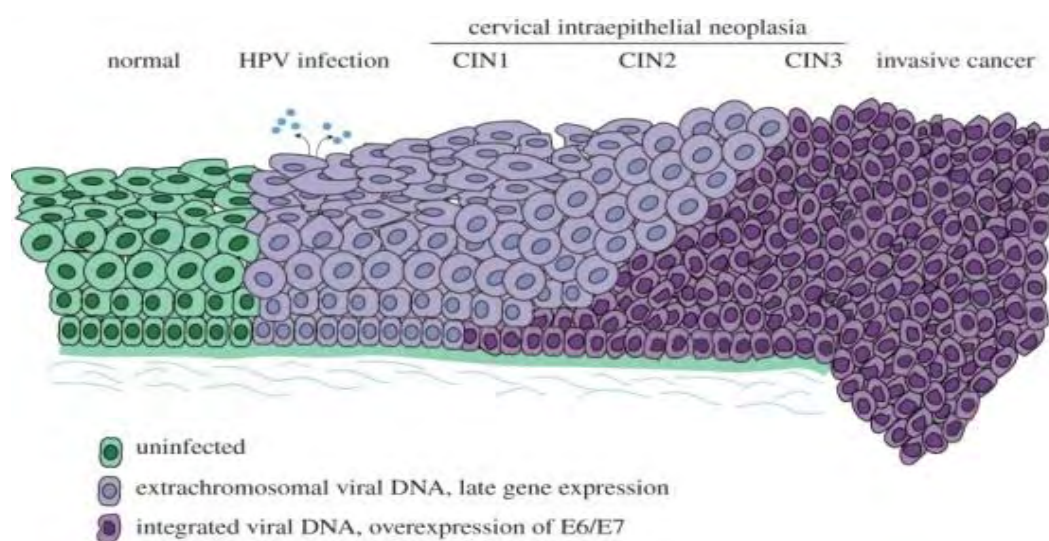
Πίνακας 1.4.7.1: Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα γονίδια των ιών HPVς καθώς και η λειτουργία του καθενός.

1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των HPVς στα κύτταρα του ξενιστή μπορεί να βρίσκεται είτε υπό τη μορφή επισώματος, είτε σε ενσωματωμένη μορφή στο DNA του ξενιστή, είτε να συνυπάρχουν ταυτόχρονα και οι δυο μορφές [Klaes R et al 1995].

Σε ποσοστό περίπου 10% μια μόλυνση με HPV προκαλεί μετασχηματισμό των κυττάρων του ξενιστή. Αυτό οφείλεται στην ανεξέλεγκτη έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7, με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε χρωμοσωμική αστάθεια. Αντίθετα, σε ένα ποσοστό περίπου 90% των μολύνσεων από High Risk-HPVs η μόλυνση μπορεί να περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης [Schmitz M et al 2012].

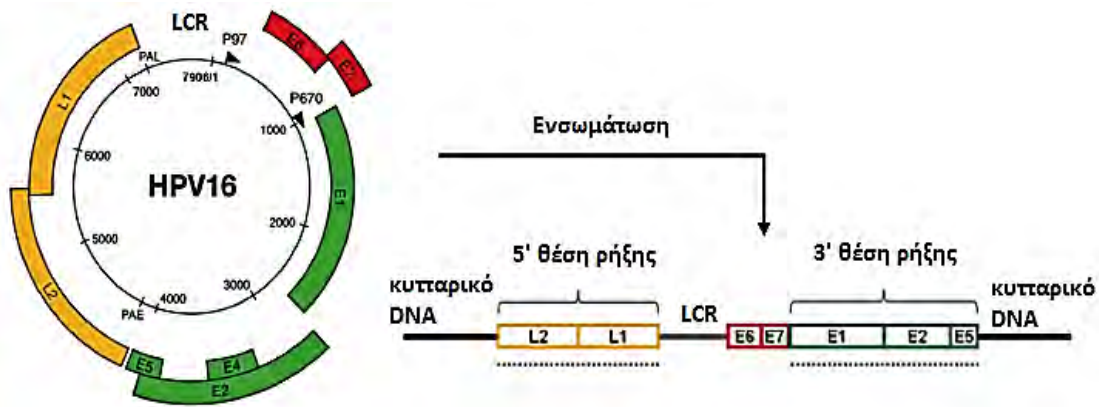
Στη τραχηλική ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία (CIN) χαμηλού βαθμού, το ιικό γονιδίωμα βρίσκεται σε επισωματική μορφή όπου έχουμε χαμηλά επίπεδα έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 και οι βλάβες αυτές υποχωρούν αυθόρμητα [Klaes R et al 1995].



Εικόνα 1.5.1: Στο παραπάνω σχήμα παρατηρούμε την τραχηλική ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία και τον βαθμό αλλοιώσεων των κυττάρων αυτών.

Ωστόσο, μια αποτυχία του ανοσοποιητικού συστήματος να εξουδετερώσει τέτοιες λοιμώξεις από τους Human Papillomavirus, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μετά από δεκαετίες. Σε τέτοιου είδους αλλοιώσεις όπως CINIII έχουμε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 και σε αυτή την φάση παρατηρήθηκε ότι το γονιδίωμα των HPV's βρέθηκε να είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή [Gao G. et al 2017].

Σε μελέτες έχει δειχθεί ότι ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή σε αλλοιώσεις τύπου CIN1 όπου έχουμε χαμηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7, ενώ σε αλλοιώσεις τύπου CINII εντοπίζεται ως ενσωματωμένο σε ποσοστό 5% , σε αλλοιώσεις CINIII σε 16% και στο 87% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου [Klaes R et al 1995, Narisawa-Saito M et al 2007].



Εικόνα 1.5.2: Σχηματική αναπαράσταση επισωματικής και ενσωματωμένης μορφής του γονιδιώματος των HPV-16 καθώς το ίδιο ισχύει και για τον HPV-18. Παρουσιάζονται και οι θέσεις ρήξης κατά την ενσωμάτωση [Χυ Βυ et al 2013].

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η ενσωμάτωση των ιών HPV υψηλού κινδύνου στο γονιδίωμα του ξενιστή αποτελεί μείζονα παράγοντα που συμβάλλει στον μετασχηματισμό των κυττάρων και σε κακοήθεια.

Για την ενσωμάτωση το ιικό γονιδίωμα υφίσταται μια ρήξη του ιικού DNA και έτσι το γονιδίωμα μετατρέπεται σε γραμμικό. Η ρυθμιστική περιοχή (LCR) καθώς και τα ογκογονίδια E6 και E7 είναι ανέπαφα κατά την ενσωμάτωση. Αφού ενσωματωθεί το ιικό DNA εκτός από τα γονίδια που μένουν ανέπαφα (E6, E7 και η LCR) ορισμένα γονίδια όπως τα E1 και E2 χάνονται ή διασπώνται. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι θέσεις ρήξης στο γονιδίωμα του ιού είναι κυρίως στα γονίδια E1 και E2, και κατά δεύτερο λόγο στα γονίδια L1 και L2 με μικρότερη συχνότητα [Χυ Βυ et al 2013].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 είναι ανέπαφες κατά την ενσωμάτωση, που σημαίνει ότι θα έχουμε μια υπερπαραγωγή αυτών και θα οδηγήσουν στην συσσώρευση λαθών, η οποία θα επιφέρει τον κακοήθη φαινότυπο [Χυ Βυ et al 2013].

Τέλος, έχει δειχθεί από διάφορες αναλύσεις ότι υπάρχει επιθετικότητα και γρήγορη εξέλιξη σε κακοήθεια κατά την πλήρη ενσωμάτωση του HPV-18 στο γονιδίωμα των ξενιστών [Badaracco Get al 2002, Villa LL et al 1991].

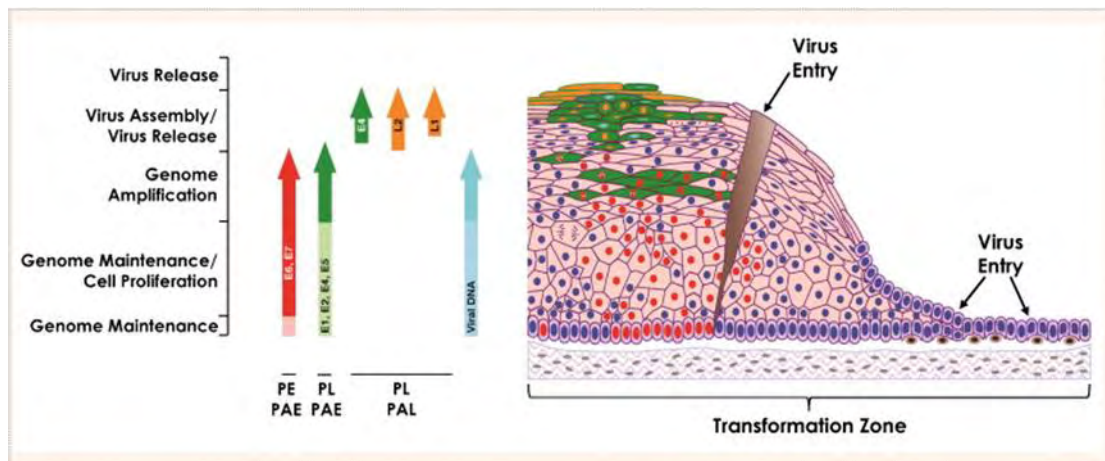
1.6 Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή

Ο κύριος στόχος των HPVs (Human Papilloma Virus) είναι τα κύτταρα του πολύστιβου επιθηλίου του δέρματος. Ο ιός εισβάλλει στο επιθήλιο μέσω μικροτραυματισμών και μολύνει τα κύτταρα της βασικής στιβάδας.

Στην βασική στιβάδα τα επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 είναι αρκετά χαμηλά, ωστόσο καθώς οι μολύνσεις διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών να αυξηθούν με αποτέλεσμα ο ασθενής να οδηγηθεί σε καρκινογένεση.

Στην βασική στιβάδα ο ιός βρίσκεται σε μια λανθάνουσα φάση μόλυνσης, όπου υπάρχει ένας χαμηλός αριθμός αντιγράφων περίπου 50-100 ανά κύτταρο χωρίς την παραγωγή ισωματίων.

Ο κύκλος ζωής των HPVs ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται κάθετα προς τα πάνω και όταν φτάσουν στην ελεύθερη επιφάνεια του βλεννογόνου του δέρματος τα ώριμα ισωμάτια αποπίπτουν για την αναζήτηση νέων κυττάρων στόχων [Narisawa-Saito M. et al 2007].



Εικόνα 1.6.1: Σχηματική αναπαράσταση μόλυνσης από HPV μέσω μικροτραυτισμού και η διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών του ιού [Doorbar J et al 2012].

Καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται και κινούνται προς την ανώτερη στιβάδα, η αντιγραφή του ιικού DNA υποστηρίζεται από τα γονίδια E1 και E2 και ακολουθεί η έκφραση των καψιδιακών L1 και L2 πρωτεϊνών για τον σχηματισμό ιοσωματίων.

Η αρχική αλληλεπίδραση για να εισέλθει ο ιός εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων γίνεται μέσω της σύνδεσης του με την θειική ηπαρίνη (HS) η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη [Shafti Keramat et al 2003].

Επίσης ο ιός απαιτεί έναν δεύτερο υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδο στο κύτταρο-στόχο και το ρόλο αυτό διαδραματίζουν οι α6-ιντεγκρίνες [Narisawa-Saito M et al 2007].

Υπάρχει ακόμη ένας υποδοχέας που εντοπίζεται στην επιφάνεια των κερατονοκυττάρων μαζί με την α6-ιντεγκρίνη που είναι η λαμίνη-5 [Culr TD et al 2006].

Ολοκληρώνοντας αφού ο ιός έχει προσδεθεί στον κατάλληλο υποδοχέα εισέρχεται εντός του κυττάρου με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης. Τα καψίδια μεταφέρονται στα ενδοσώματα όπου γίνεται απέκδυση και το ιικό DNA θα μεταφερθεί στον πυρήνα του κυττάρου-στόχου. Η μεταφορά αυτή στον πυρήνα γίνεται με την βοήθεια της L2 πρωτεΐνης, ενώ η L1 μένει στα ενδοσώματα έως ότου αποικοδομηθεί πλήρως [Baker T S et al 1991, Bergant Marasic M et al 2012].

1.7 Αντιγραφή των HPVs

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο κύκλος ζωής των Human Papillomaviruses είναι συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και κατά την διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων εκφράζονται διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο.

Οι Human Papillomaviruses περνούν από τρεις φάσεις αντιγραφής του γονιδιώματος τους, οι οποίες είναι οι εξής :

1. Η αρχική φάση της αντιγραφής είναι αμέσως μετά την είσοδο του ιού στον πυρήνα του κυττάρου-στόχου και ακολουθείται από τη διατήρηση του ιικού επισώματος σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων (50-100). Η πρώτη φάση της αντιγραφής γίνεται με την βοήθεια των δυο πρώιμων πρωτεϊνών E1 και E2 του HPV, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην θέση έναρξης της αντιγραφής (ori).

2. Η επόμενη φάση αντιγραφής γίνεται παράλληλα με την αντιγραφή του γονιδιώματος των κερατινοκυττάρων.
3. Η τελευταία φάση της αντιγραφής πραγματοποιείται στα μολυσμένα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, όπου έχουμε αύξηση των αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος [McBride AA et al 2013].

1.7.1 Μεταγραφή των HPVs

Τα γονιδιώματα των Papilloma ιών διαθέτουν δυο υποκινητές, τον πρώιμο και τον όψιμο. Συγκεκριμένα στον HPV-16 υπάρχει ο πρώιμος p97 και ο όψιμος p670 υποκινητής. Αντίθετα, στον HPV-18 υπάρχει ο πρώιμος υποκινητής που είναι ο p105 και ο όψιμος που είναι ο p811. Ο όψιμος υποκινητής βρίσκεται εντός του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και η λειτουργία του εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησης.

Η μεταγραφή των ιών HPV ελέγχεται κυρίως από την ρυθμιστική περιοχή LCR διότι εκεί υπάρχει ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

Στα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα ή στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα εκφράζονται οι έξι ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1,E2,E4,E5,E6,E7) από την πρώιμη περιοχή του ιού, δηλαδή αυτές οι έξι πρωτεΐνες βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου υποκινητή. Συγκεκριμένα ο p97 για τους HPV-16 και ο p105 για τους HPV-18 [Zhi-Ming Zheng et al 2006].

Αντίθετα ο όψιμος υποκινητής ενεργοποιείται σε διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου και βοηθά στην έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2 που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος στα νέα ιοσωμάτια [Wang X et al 2011, Kajitani N et al 2012, Wang X et al 2017].

1.7.2 Καψιδιακή συναρμολόγηση και η απελευθέρωση του ιού HPV.

Για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής των ιών HPV απαιτείται η συναρμολόγηση του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων.

Αρχικά σε πρώτο στάδιο παράγονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 πρωτεΐνη βοηθά για τον εγκλεισμό του γονιδιώματος στο εσωτερικό των καψιδίων.

Η διαδικασία της συναρμολόγησης λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα όπου πρώτα θα παραχθεί η L2 πρωτεΐνη του ιού και έπειτα η L1. Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών γίνεται μόνο σε κύτταρα που εκφράζουν την E4 πρωτεΐνη.

Ολοκληρώνοντας, μολυσματικά σωματίδια ιών παράγονται μόνο όταν εκφράζεται η E4 πρωτεΐνη, διότι συμμετέχει στην απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων έπειτα από διακοπή του κυτταρικού δικτύου κερατίνης [Doorbar J et al 2013, Buck CB et al 2004].

1.8 Ιστολογικές αλλοιώσεις- Κλινικά συμπτώματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων προκαλούν διάφορες αλλοιώσεις οι οποίες κυμαίνονται από κονδυλώματα μέχρι και κακοήθεις νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας. Αυτό εξαρτάται από τον τύπο του ιού που μολύνει το κύτταρο-στόχο. Οι ιοί που ταξινομούνται ως χαμηλού κινδύνου συνδέονται σπάνια με τον καρκίνο, σε αντίθεση με την ομάδα υψηλού κινδύνου που συνδέονται στενά με πολλές περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Επομένως διάφοροι προληπτικοί έλεγχοι όπως για παράδειγμα το Test Pap και το HPV-DNA test μπορούν να προσφέρουν μεγάλο όφελος στον πληθυσμό των γυναικών.

Σύμφωνα με το σύστημα Bethesda οι τραχηλικές αλλοιώσεις κατηγοριοποιούνται σε δυο ομάδες έπειτα από έναν προληπτικό έλεγχο όπως το Test Pap που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ιστοπαθολόγοι.

1. Η πρώτη ομάδα είναι η χαμηλού κινδύνου, ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion ή LSIL)
2. Η δεύτερη ομάδα είναι η υψηλού κινδύνου, ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου(High-grade Squamous Intraepithelial Lesion ή HSIL)

Ολοκληρώνοντας υπάρχει και η ταξινόμηση για τις αλλοιώσεις του επιθηλίου ως CIN 1,2,3 ανάλογα με την διείσδυση του ιού. Αλλαγή της μορφής του ιού από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή σχετίζεται με την εξέλιξη σε καρκίνο [Narisawa-Saito M et al 2007, Doorbar J et al 2012, Solomon D et al 2001, Colgan TJ et al 2001].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας ισοθερμικής τεχνικής Colorimetric LAMP (Colorimetric Loop Mediated Isothermal Amplification) για την ανίχνευση των ιών HPV-18 και η άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να έχουμε σε μικρό χρονικό διάστημα τα επιθυμητά αποτελέσματα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλινικά δείγματα HPV

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 47 κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας προερχόμενα από τον ελληνικό γυναικείο πληθυσμό (22 δείγματα αρνητικά για τον HPV-18 και 23 θετικά δείγματα για τον HPV-18). Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Αθηνών «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ», και το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες, αυτά που ήταν αρνητικά για τον HPV-18, σε δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας και σε δείγματα υψηλού βαθμού δυσπλασίας.

3.2 Εκχύλιση DNA από κλινικά δείγματα

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού (DNA) του HPV-18 πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) [Casas I. et al 1995].

Πιο συγκεκριμένα μέσα σε σωλήνα Eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν:

- 100μl δείγματος DNA που βρισκόταν σε διάλυμα ThinPrep
- 10μl γλυκογόνο
- 300μl Lysis Buffer αποτελούμενο από 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1Mm dithiothreitol και 25Mm sodium citrate

Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση μέσω VORTEX του μείγματος, και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το τέλος της επώασης προστέθηκαν:

- 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C)

όπου ακολούθησε ανάδευση μέσω VORTEX του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά στους (-20°C). Στην συνέχεια τα δείγματα μετά την επώαση φυγοκεντρήθηκαν στα 14000 rcf για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Μετά την φυγοκέντρηση το ίζημα που σχηματίστηκε διαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη:

- 500μl αιθανόλης 70% και στην συνέχεια ακολούθησε ανάδευση με VORTEX έως ότου διαλυθεί το ίζημα και φυγοκέντρηση στις 14000 rcf για 10 λεπτά.

Τέλος, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε:

- 100μl ddH₂O

Έγινε αποθήκευση του δείγματος στους (-20°C) για περαιτέρω χρήση.

ΚΩΔΙΚΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΥΛΙΚΟ ΜΕΣΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΚΩΔΙΚΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΥΛΙΚΟ ΜΕΣΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
S519-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	S439.16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S522-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΤΤ11	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S836-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL911-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S1403-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL1026-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S1432-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL1955-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S11-16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL1958-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S401-16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL1959-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S70-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL2179-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S262-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL2187-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S308-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL513-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S5946-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	WNL528-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
AG3545	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	9994-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
AG3712	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	9997-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
AG3764	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	10005-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
AG3770	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	10006-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ38	ThinPrep	ΠΑΝΕΜΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	10015-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
ΠΝΛ39	ThinPrep	ΠΑΝΕΜΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	10016-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S118/13	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	10017-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S1099/13	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	10028-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S1426/14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	10033-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
9973.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	9977-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
9991.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	9995-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
10021.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	10024-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ
S1340.40	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ			

Πίνακας 3.1.1: Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζεται το σύνολο των θετικών και αρνητικών κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Αναφέρεται επίσης η κωδική τους ονομασία, το υλικό μέσο συλλογής και η προέλευση τους.

3.3 Έλεγχος θετικών δειγμάτων για HPV18 και έλεγχος εκχύλισης

Για τον έλεγχο της ύπαρξης HPV18 στα δείγματα, καθώς και για τον έλεγχο της επιτυχίας της εκχύλισης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε PCR στα γονίδια L1 και E6. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικοί για τον HPV-18 και παρουσιάζονται παρακάτω:

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΜΗΚΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
HPV-18 L1 R	L1	5' – ATCCTGCTTATTGCCACCAC –3'	292bp
HPV-18 L1 F	L1	5' – GCCCCTGCCTCTACACAGTA –3'	292bp
HPV-18 F3	E6	5' – AAAAATAACTAACAACACTGGGTTA –3'	202bp
HPV-18 B3	E6	5' – ACTTGTGTTTCTCTGCGT –3'	202bp

Πίνακας 3.3.1: Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα ονόματα των εκκινητών, το γονίδιο στο οποίο εντοπίζονται, η αλληλουχία του εκκινητή και το μήκος του προϊόντος PCR.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR στο γονίδιο L1 σε μικροσωληνάρια (tubes) των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε tube ήταν 50μl από τα οποία τα 47μl αντιστοιχούν στο μείγμα και τα 3μl αντιστοιχούν στο DNA των δειγμάτων. Τα 47 μl που αντιστοιχούν στο μείγμα περιέχουν τα εξής: Dream Taq Buffer 1X, HPV-18 L1F/ HPV-18 L1 R 25 pmol/μl, 1.5 Units ενζύμου Dream Taq DNA Polymerase, dNTPs 1mM, MgCl₂ 2mM, και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47 μl .

Στην συνέχεια τα tubes τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή (eppendorf) με τις εξής συνθήκες:

- 3 λεπτά στους 95°C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
- 40 κύκλους PCR όπου πραγματοποιούνται οι εξής συνθήκες, 30 δευτερόλεπτα στους 95°C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 30 δευτερόλεπτα στους 58°C για τον υβριδισμό των εκκινητών, 1 λεπτό στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την DNA πολυμεράση
- 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων.

Ακολούθησε μια PCR στο γονίδιο E6 σε tubes των 200μl. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε tube ήταν 50μl από τα οποία τα 47μl αντιστοιχούν στο μείγμα και τα 3μl αντιστοιχούν στο DNA των δειγμάτων. Τα 47 μl που αντιστοιχούν στο μείγμα περιέχουν

τα εξής: Dream Taq Buffer 1X, HPV-18 F3/ HPV-18 B3 25 pmol/μl, 1.5 Units ενζύμου Dream Taq DNA Polymerase, dNTPs 1mM, MgCl₂ 2mM, και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47 μl .

Στην συνέχεια τα tubes τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή (eppendorf) με τις εξής συνθήκες:

- 3 λεπτά στους 95°C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
- 40 κύκλους PCR όπου πραγματοποιούνται οι εξής συνθήκες, 30 δευτερόλεπτα στους 95°C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 30 δευτερόλεπτα στους 50°C για τον υβριδισμό των εκκινητών, 1 λεπτό στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την DNA πολυμεράση
- 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων.

Για την ολοκλήρωση ακολούθησε μια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.4 PCR σε HPV-18 θετικά δείγματα για κατασκευή πλασμιδίων

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος του γονιδίου E6 από κλινικά δείγματα:

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ
HPV-18 F3	5'-AAAAGGGAGTAACCGAAAACG-3'
HPV-18 B3	5'-CACGGACACACAAAGGACAG-3'

Πίνακας 3.4.1: Στον πίνακα παρουσιάζονται τα ονόματα και οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl, με τελικό όγκο αντίδρασης τα 50μl. Στο συνολικό όγκο των 50 μl, τα 47 μl αντιστοιχούν στο μείγμα (mix) που παρασκευάζεται πρώτο και περιέχει τα εξής συστατικά: DreamTaq Buffer 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 1mM, τους δυο παραπάνω εκκινητές HPV-18(F3) και HPV-18(B3)_ 25 pmol/μl, 1.5 Units ενζύμου Dream Taq DNA Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl και τα υπόλοιπα 3μl αντιστοιχούν στο DNA δείγμα που προστίθεται στο τέλος της αντίδρασης όπου και θα συμπληρωθούν τα 50μl.

Στην συνέχεια τα tubes τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή (erpendorf) με τις εξής συνθήκες:

1. 2 λεπτά στους 95° για την αποδιάταξη του DNA
2. 40 κύκλους PCR όπου θα πραγματοποιηθούν τα εξής, 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
3. 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνσή των ημιτελικών κλώνων.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR.

3.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR 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 σε μορφή σκόνης ακολούθησε θέρμανση και αφού η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε περίπου στους 40°C προστέθηκαν 70 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση στο πήκτωμα να είναι περίπου 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο αλληλεπιδρά 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 σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής τάξης I .

Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται στα ειδικά 'πηγαδάκια' 5 μl προϊόντος PCR όπου έχει αναμειχθεί με 1μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων σαν μάρτυρας μοριακού βάρους. Η τάση της ηλεκτροφόρησης στην οποία πραγματοποιήθηκε ήταν στα 120V. Τέλος, το πήκτωμα της αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV και στην συνέχεια φωτογραφήθηκε.

3.6 Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR το πήκτωμα εκτέθηκε ξανά σε υπεριώδη ακτινοβολία UV με σκοπό την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος.

Οι ζώνες που υπήρχαν στο πήκτωμα αποκόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% όπου και επιβεβαιώθηκε ότι έγινε σωστά ο καθαρισμός. Τα προϊόντα που προέκυψαν από τον καθαρισμό υποβλήθηκαν σε μοριακή κλωνοποίηση.

3.7 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR

Μετά την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος έχουμε:

Την αντίδραση της τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning kit), όπου ενσωματώνεται το επιθυμητό προϊόν (δηλαδή το ένθεμα μας) στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης. Ο φορέας έχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία θα ενσωματωθεί το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε.

Η αντίδραση περιέχει τα εξής διαλύματα:

- 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution)
- 1μl φορέα TOPO (Vector)
- 1μl ddH₂O και 3μl του προϊόντος της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Ο μετασηματισμός έχει τα εξής βήματα:

Από τους -80°C γίνεται η μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων JM 109 σε σωληνάρια erppendorf των 2ml τοποθετημένα σε πάγο. Τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν μέχρι να γίνουν ρευστά. Ακολουθεί προσθήκη 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης με ελαφρώς κυκλικές κινήσεις και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 30 λεπτά.

Χρησιμοποιώντας το υδατόλουτρο θα γίνει ο μετασηματισμός των JM 109 δεκτικών κυττάρων μέσω της διαδικασίας "heat shock", όπου τα δείγματα τοποθετούνται στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά τοποθετούνται ακαριαία στον πάγο για 2 λεπτά.

Μετά το "heat shock" γίνεται η προσθήκη 800μl από το LB-Broth στα κύτταρα και τα αφήνουμε στους 37° με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό για 1 ώρα. Στη συνέχεια,

επιστρώθηκαν τρυβλία στερεού θρεπτικού υποστρώματος LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA) και από την καλλιέργεια επιστρώνουμε 100μl. Μετά την επίστρωση ακολουθεί 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 όπου και περιμέναμε να θολώσει το δείγμα. Οι υγρές καλλιέργειες που προέκυψαν επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό.

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το kit EXTRACTME PLASMID DNA KIT σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ολοκληρώνοντας, για να είμαστε σίγουροι ότι η απομόνωση του πλασμιδίου έχει γίνει σωστά, καθώς και ότι το ένθεμά μας έχει το επιθυμητό μέγεθος, πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI.

Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με τα εξής διαλύματα και η τελική συγκέντρωση της αντίδρασης είναι 20μl : 2μl 10x buffer K, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Minotech), 2μl πλασμιδιακού DNA και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl.

Ακολουθεί μια επώαση για 2ώρες στους 37°C και μετά την ολοκλήρωσή της προστίθενται 3-5μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση.

Ακολουθεί μια τελευταία ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% όπου αναμένουμε την ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος δηλαδή στις 202 bp.

3.8 Διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων για την εύρεση του ενός αντιγράφου

Ο λόγος που γίνονται αυτές οι αραιώσεις είναι για να βρούμε μέσω της REAL-TIME PCR το 1 αντίγραφο πλασμιδίου.

Στην διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις στα πλασμίδια που δέχτηκαν ως ένθεμα το προϊόν PCR των 202 bp. Έγινε λήψη 5μl από το αρχικό διάλυμα των πλασμιδίων και τοποθέτησή τους σε πλαστικό σωληνάριο των 500μl, δηλαδή 495 ddH₂O και 5μl από το διάλυμα πλασμιδίων και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με αποτέλεσμα τη δημιουργία της πρώτης 1/100 αραιώσης.

Στη συνέχεια προστίθενται 450μl ddH₂O και 50μl από την πρώτη αραιώση. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με ισχυρή ανάδευση έως ότου δημιουργηθούν δέκα

υποδεκαπλάσιες αραιώσεις με τη διαφορά ότι τα 50 μl πλασμιδίων λαμβάνονται από την αμέσως προηγούμενη αραιώση και όχι από το αρχικό διάλυμα πλασμιδίων.

3.9 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η REAL-TIME PCR εκτελείται με αποτέλεσμα να βρούμε το 1 αντιγράφο. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη χρωστική SYBR-Green η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA και να εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται στα 510nm.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl, όπου τα 17μl είναι το μείγμα των αντιδράσεων και 3μl είναι το πλασμιδιακό DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μικροσωληνάρια των 200μl. Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τα εξής: εκκινητές HPV-18 F3, HPV-18 B3, 5pmol/μl, ddH₂O, SYBR Select qPCR Master Mix 2X.

Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα STRATAGENE MX 3005 και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τις εξής συνθήκες:

- 2 λεπτά στους 50°C (Ενεργοποίηση UDG)
- 2 λεπτά στους 95°C για την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 40 κύκλοι που θα περιλαμβάνουν (στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα, και στους 60°C για 1 λεπτό για την επέκταση της σύνθεσης του DNA)
- Dissociation curve στους 55°-95°.

Μετά την ολοκλήρωση της REAL-TIME PCR τρέχουμε μια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για να δούμε την ένταση των ζωνών των διαφορετικών συγκεντρώσεων.

3.10 Η τεχνική LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Η τεχνική LAMP είναι μια απλή, ειδική, γρήγορη, και χαμηλού κόστους τεχνική για την ενίσχυση νουκλεοτιδικών στόχων.

Η LAMP έχει αρκετές ομοιότητες με την PCR, όμως υπάρχουν κάποιες ιδιαιτερότητες όσον αφορά την εκτέλεσή της. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί τέσσερις διαφορετικούς εκκινητές που στοχεύουν σε έξι περιοχές του γονιδίου-στόχου. Η χρήση των εκκινητών εξασφαλίζει την υψηλή εξειδίκευση της ενίσχυσης του στόχου.

Σε αρχικό στάδιο συμμετέχουν και οι τέσσερις εκκινητές, δηλαδή εσωτερικοί και εξωτερικοί, ενώ στην συνέχεια χρησιμεύουν μόνο οι εσωτερικοί.

Το πρώτο στάδιο στην τεχνική LAMP είναι η δημιουργία της βασικής δομής θηλιάς, στο οποίο συμμετέχουν και οι τέσσερις εκκινητές. Στη συνέχεια, η βασική δομή θηλιάς ενισχύεται με τη συμμετοχή μόνο των δύο εσωτερικών εκκινητών.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.10.3.1 το αποτέλεσμα της ενίσχυσης είναι η δημιουργία πολλών και διαφορετικών δομών, δηλαδή στην LAMP παράγεται εν τέλει ένα εύρος προϊόντων με διαφορετικά μεγέθη και διαμορφώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία γύρω στους 60^ο-65^οC που σημαίνει ότι για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν είναι απαραίτητη η χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

Η ενίσχυση του στόχου είναι αρκετά αποτελεσματική αφού ο στόχος ενισχύεται έως και 10⁻⁹ φορές μέσα με μικρό χρονικό διάστημα 30- 60 λεπτών. Η LAMP χρησιμοποιεί μια ειδική πολυμεράση εκτόπισης κλώνου την Bst 3.0 (Bacillus Stearothermophilus). Τέλος, η τεχνική μπορεί να είναι χρήσιμη στο μέλλον ως εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους για την ανίχνευση ορισμένων ασθενειών [Soe MJ et al 2013, Notomi Tsugunori et al 2015, Wong YP et al 2018, Notomi Tsugunori et al 2000].

3.10.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την ανίχνευση των ιών HPV-18

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση LAMP απαιτούνται τέσσερις ή έξι εκκινητές. Με την βοήθεια του προγράμματος Primer Explorer V5 σχεδιάστηκαν οι τέσσερις εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του γονιδίου E6 του HPV-18.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	5'-ακρο	3'-ακρο	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ
HPV-18 F3	272	294	AAAACTAACTAACACTGGGTTA
HPV-18 B3	456	473	ACTTGTGTTTCTCTGCGT
HPV-18 FIP			GGTGTCTAAGTTTTTCTGCTGGATAATTTATTAATAAGGTGCCTGCG
HPV-18 BIP			CGACGATTTACAACATAGCTGGGTTGGAGTCGTTTCCTGTC

Πίνακας 3.10.1.1: Παρουσιάζονται οι εκκινητές, οι αλληλουχίες καθώς και οι θέσεις τους στο γονιδίωμα του HPV-18.

3.10.2 Αλληλουχία των εκκινητών

Όπως αναφέρθηκε στην παρούσα τεχνική χρησιμοποιήθηκαν 4 εκκινητές εκ των οποίων 2 είναι απλοί F3/B3 και δύο σύνθετοι FIP/BIP.

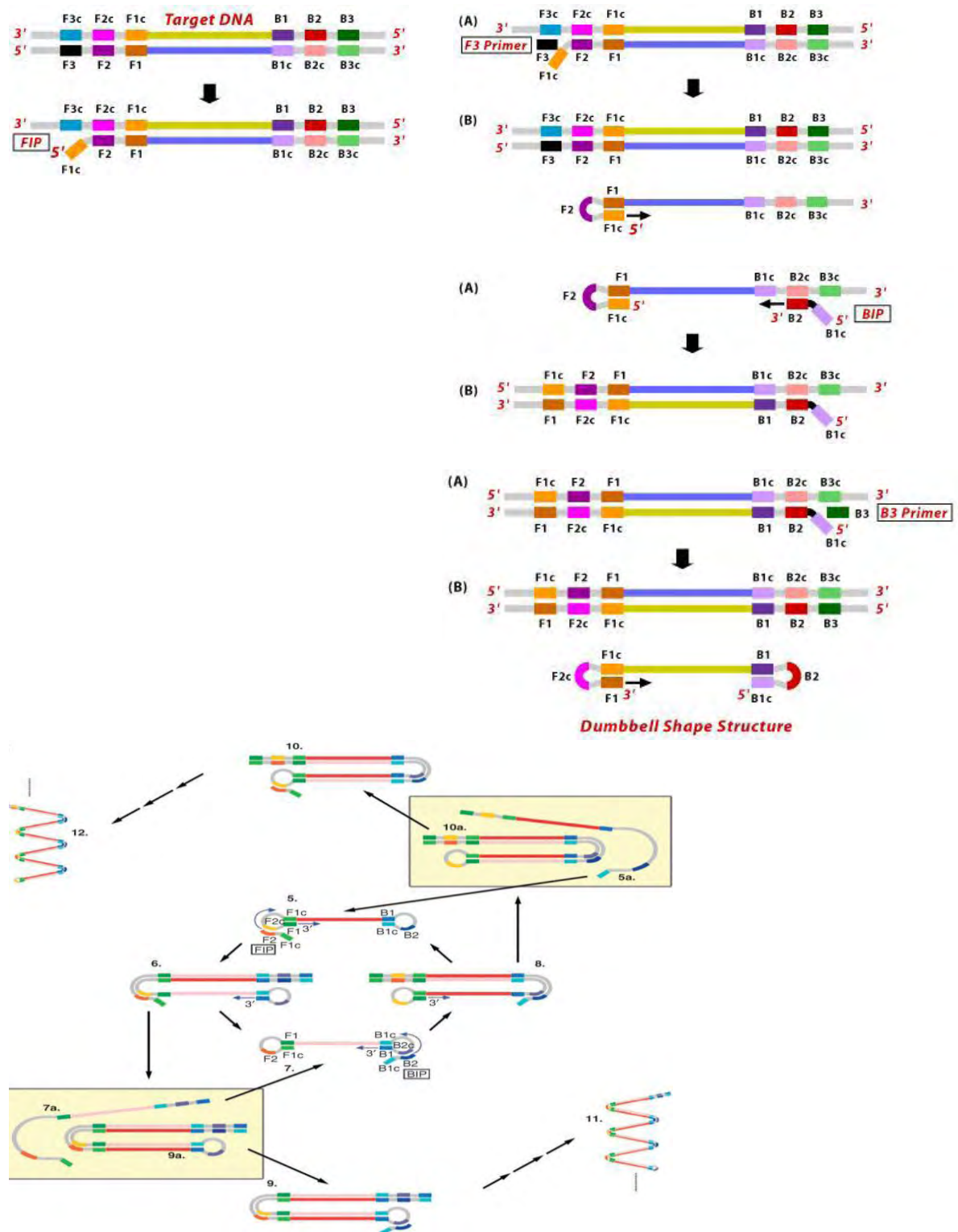
- FIP: ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής ο οποίος αποτελείται από την περιοχή F2 στο 3'-άκρο που είναι συμπληρωματικός προς την F2c και φέρει την αλληλουχία F1c στο 5'-άκρο.
- BIP: ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής ο οποίος αποτελείται από την περιοχή B2 στο 3'-άκρο που είναι συμπληρωματικός προς την B2c και φέρει την αλληλουχία B1c στο 5'-άκρο.
- F3: ο εμπρόσθιος εξωτερικός εκκινητής ο οποίος είναι συμπληρωματικός προς την F3c περιοχή.
- B3: ο οπίσθιος εξωτερικός εκκινητής που είναι συμπληρωματικός προς την B3c περιοχή.

Υπάρχει η δυνατότητα και για την προσθήκη τρίτου ζεύγους εκκινητών (loop primers) οι οποίοι μπορούν να αυξήσουν την ταχύτητα και την ευαισθησία της μεθόδου, αλλά δεν είναι απαραίτητοι για την εκτέλεση της [Notomi Tsunori et al 2000].

3.10.3 Στάδια ενίσχυσης του στόχου

Έστω ότι έχουμε ένα μονόκλωνο ή ένα δίκλωνο τμήμα:

- Αρχικά γίνεται μια σύνδεση της αλληλουχίας F2 του εκκινητή FIP στην συμπληρωματική αλληλουχία F2c του στόχου.
- Η Bst 3.0 DNA pol έχει δραστηριότητα εκτόπισης κλώνου και έτσι συντίθεται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA ξεκινώντας από το 3'-άκρο της περιοχής F2 του εκκινητή FIP.
- Ακολουθεί ο υβριδισμός του F3 primer στο αντίστοιχο τμήμα του γενετικού υλικού F3c, εξωτερικά του FIP στο DNA στόχο και ξεκινά τη σύνθεση DNA μέσω εκτόπισης κλώνου, απελευθερώνοντας τον συμπληρωματικό κλώνο.
- Έχουμε τον σχηματισμό μια διπλής έλικας από τον κλώνο του DNA που συντίθεται από τον F3 και τον πρότυπο DNA κλώνο.
- Ο συμπληρωματικός κλώνος που συνδέεται με την FIP απελευθερώνεται. Αυτή η απελευθερωμένη μονόκλωνη έλικα σχηματίζει μια δομή βρόχου στο 5'-άκρο λόγω συμπληρωματικότητας των περιοχών F1c και F1.



Εικόνα 3.10.3.1: Παρουσίαση των διάφορων σταδίων της τεχνικής LAMP, και οι δομές που προκύπτουν σαν τελικό αποτέλεσμα.

- Το μονόκλωνο τμήμα χρησιμεύει ως εκμαγείο για την ίδια διαδικασία αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας τον BIP σαν εκκινητή και επακόλουθη σύνθεση DNA από το B3 αντίστοιχα. Ο BIP θα υβριδοποιηθεί στον κλώνο που παράγεται στο 5^ο στάδιο, ξεκινώντας από το 3'-άκρο του BIP γίνεται η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA. Στην διαδικασία αυτή έχουμε την μετατροπή από μια δομή βρόχου σε γραμμική δομή. Ο B3 θα υβριδοποιηθεί εξωτερικά του BIP και άρα μέσω της δραστηριότητας της Bst από το 3'-άκρο, το DNA που συντίθεται από τον BIP απελευθερώνεται ως μονόκλωνη έλικα πριν γίνει σύνθεση από τον B3.
- Άρα έχουμε την παράγωγή δίκλωνου DNA.
- Ο συμπληρωματικός κλώνος που συνδέεται με τον BIP εκτοπίζεται στο 6^ο στάδιο, σχηματίζονται βρόχοι σε κάθε άκρο και αυτή η δομή χρησιμεύει ως αρχή ενίσχυσης της μεθόδου LAMP.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω προκύπτουν διάφορες δομές κατά την ενίσχυση της βασικής θηλιάς.

3.11 Colorimetric LAMP για την ευαισθησία της τεχνικής εκφρασμένη σε πλασμίδα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια χρωματομετρική δοκιμασία (WarmStart Colorimetric LAMP) προκειμένου να εντοπιστεί ο ιός HPV-18.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μικροσωλήνα 200μl με τελικό όγκο αντίδρασης 25μl, εκ των οποίων τα 22μl είναι το μείγμα της αντίδρασης και τα υπόλοιπα 3 μl είναι το DNA δείγμα.

Η τεχνική αυτή περιέχει τα εξής διαλύματα: WarmStart Color Mix 1X, FIP 1,6 pmol/μl, BIP 1,6 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl το DNA δείγμα και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 25μl .

Στη συνέχεια τα tubes τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή (eppendorf) στις εξής συνθήκες:

- Επώαση στους 65°C για 60 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του στόχου

Έπειτα από τα 60 λεπτά, για τα θετικά δείγματα παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από ροζ σε κίτρινο χρώμα, αντίθετα τα δείγματα που είναι αρνητικά παραμένουν στο ίδιο χρώμα όπως και πριν τοποθετηθούν σε θερμικό κυκλοποιητή.

3.12 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4 με την μόνη διαφορά ότι η συγκέντρωση ήταν 1,2%.

3.13 Έλεγχος για την εξειδίκευση της τεχνικής Colorimetric LAMP

Η εξειδίκευση της τεχνικής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τον HPV-18 σε κλινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας τα οποία ήταν αρνητικά για τον HPV-18 αλλά θετικά για τον HPV-16.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 PCR και LAMP στα κλινικά δείγματα

Τα αποτελέσματα της PCR και της LAMP παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

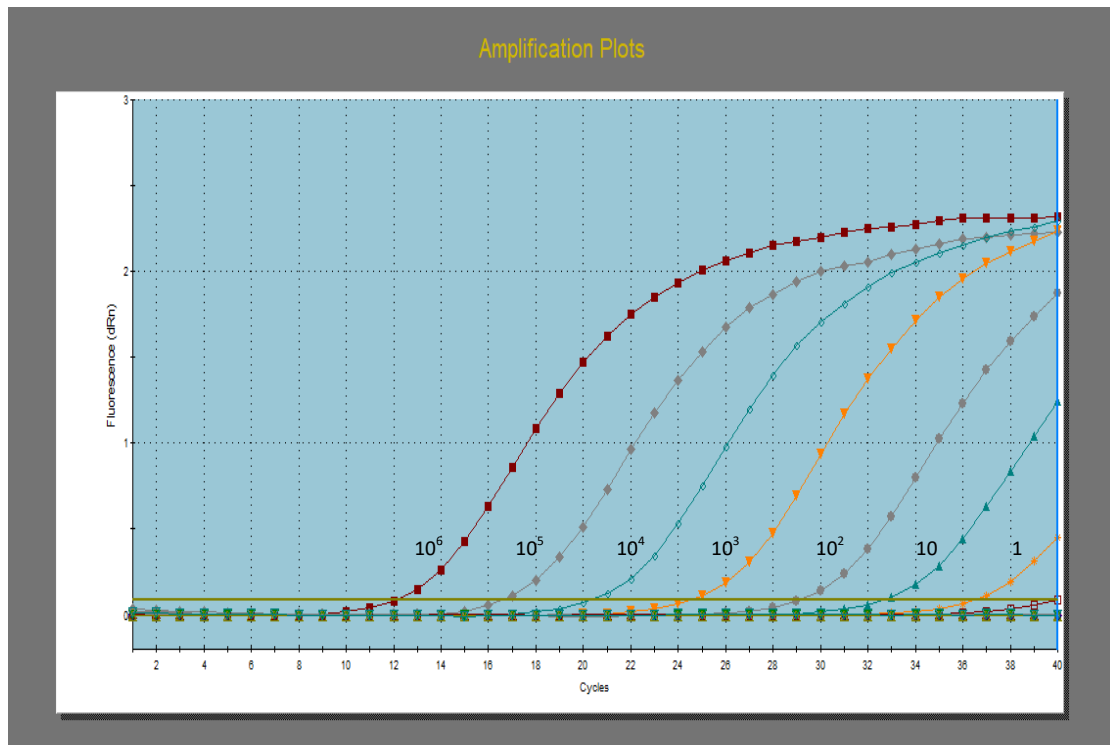
ΚΩΔΙΚΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΥΛΙΚΟ ΜΕΣΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	PCR ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ L1	PCR ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ E6	Colorimetric LAMP
S519-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S522-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S836-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S1403-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S1432-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S11-16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S401-16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S70-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S262-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S308-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S5946-17	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
AG3545	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
AG3712	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
AG3764	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
AG3770	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
ΠΝΛ38	ThinPrep	ΠΑΝΕΜΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
ΠΝΛ39	ThinPrep	ΠΑΝΕΜΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S118/13	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S1099/13	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
S1426/14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
9973.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
9991.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
10021.14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ

S1340.40	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
S439.16	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
ATT11	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL911-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL1026-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL1955-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL1958-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL1959-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL2179-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL2187-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL513-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
WNL528-15	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
9994-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
9997-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10005-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10006-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10015-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10016-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10017-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10028-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10033-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
9977-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
9995-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
10024-14	ThinPrep	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Πίνακας 4.1.1: Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα κλινικά δείγματα.

4.2 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων

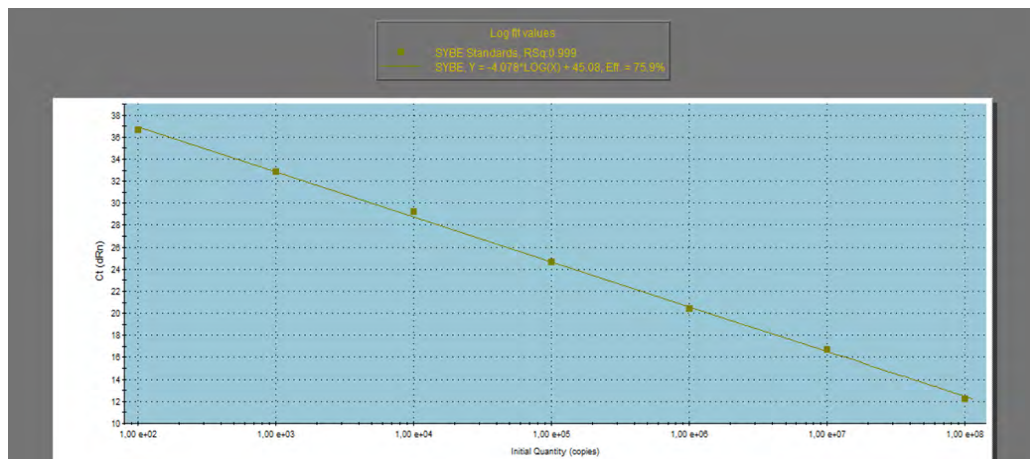
Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR των πλασμιδιακών αραιώσεων για τον καθορισμό της αραιώσης που αντιστοιχεί στο ένα αντίγραφο.



Διάγραμμα 4.2.1. : Στο διάγραμμα (Amplification plots) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων. Οι αριθμοί αριστερά από κάθε καμπύλη αντιστοιχούν στον αριθμό αντιγράφων κάθε αραιώσης

4.3 Πρότυπη καμπύλη (Standard curve)

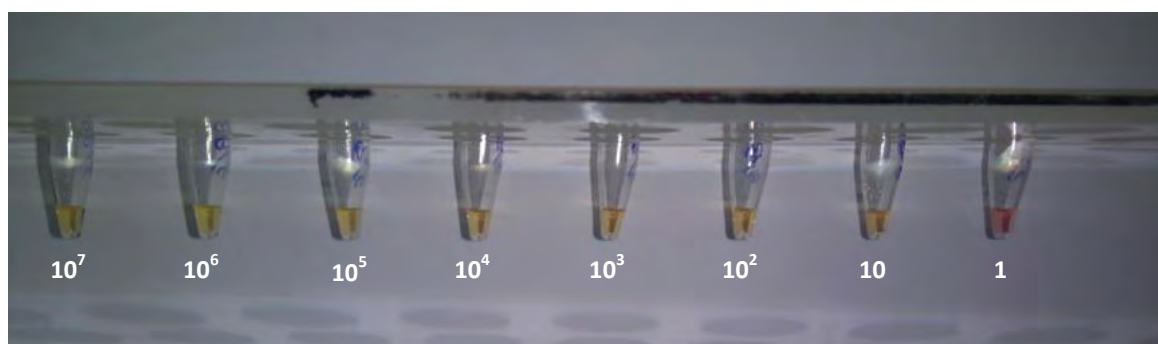
Παρακάτω παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από την Real Time PCR στις διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων.



Διάγραμμα 4.3.1 : Παρουσίαση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε έπειτα από Real Time PCR στις διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων.

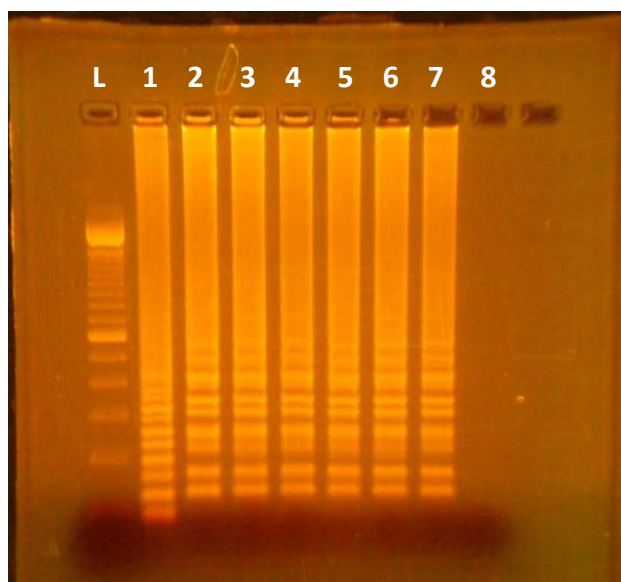
4.4 Colorimetric LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Για την ευαισθησία της τεχνικής Colorimetric LAMP, η τεχνική εφαρμόστηκε στις διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων. Η ευαισθησία της τεχνικής βρέθηκε να είναι στα 10 αντίγραφα/test.



Εικόνα 4.4.1 : Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της τεχνικής Colorimetric LAMP στις πλασμιδιακές αραιώσεις. Με κόκκινο χρώμα στα δεξιά παρουσιάζεται το ένα αντίγραφο, που σημαίνει ότι η ευαισθησία της τεχνικής είναι στα 10 αντίγραφα/test.

4.5 Ηλεκτροφόρηση της Colorimetric LAMP στις πλασμιδιακές αραιώσεις

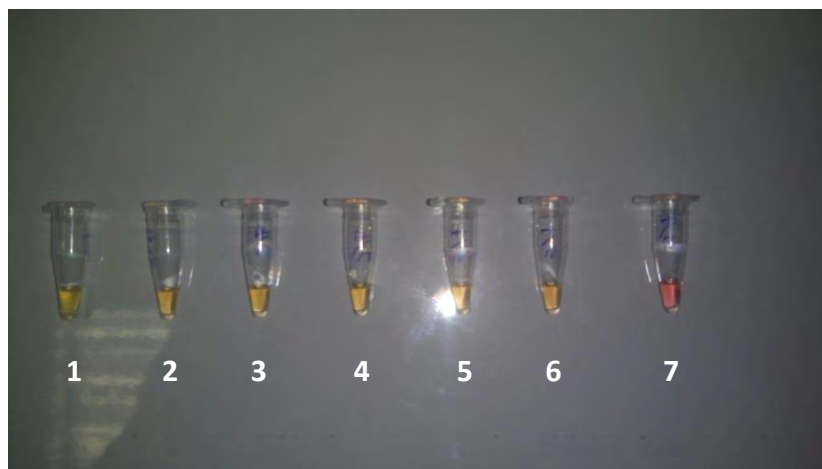


Θέση	Αντίγραφα
1	10^7
2	10^6
3	10^5
4	10^4
5	10^3
6	10^2
7	10
8	1

Εικόνα 4.5.1 : Στην παραπάνω εικόνα επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα μέσω της ηλεκτροφόρησης στις πλασμιδιακές αραιώσεις. Επίσης στην θέση L έχουμε την προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder.

4.6 Colorimetric LAMP σε θετικά δείγματα.

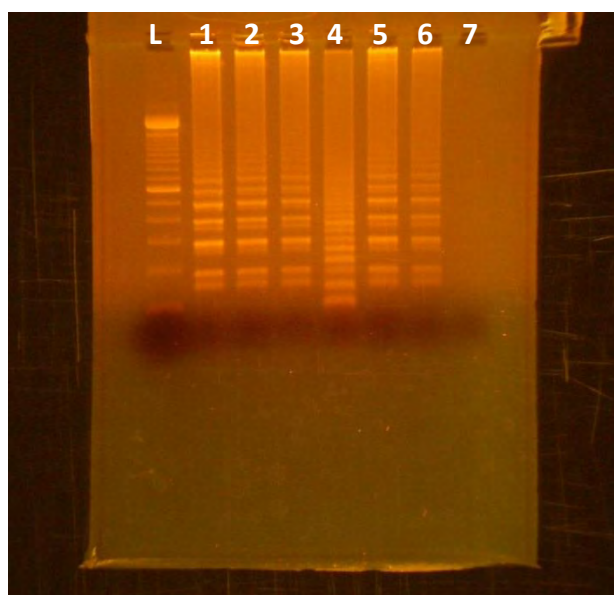
Άμεση οπτικοποίηση των θετικών δειγμάτων μέσω της Colorimetric LAMP.



Θέση	Δείγμα
1	S1403-15
2	S1432-15
3	S11-16
4	S70-17
5	S308-17
6	S5946-14
7	ddH ₂ O

Εικόνα 4.6.1 : Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε την χρωματική αλλαγή των θετικών δειγμάτων στο κίτρινο χρώμα.

4.7 Ηλεκτροφόρηση θετικών δειγμάτων από την Colorimetric LAMP



Θέση	Δείγμα
1	S1403-15
2	S1432-15
3	S11-16
4	S70-17
5	S308-17
6	S5946-17
7	ddH ₂ O

Εικόνα 4.7.1 : Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έξι θετικών δειγμάτων 1 έως 6 και στην θέση 7 υπάρχει ο αρνητικός έλεγχος ddH₂O. Επίσης στη θέση L υπάρχει ο μαρτυράς μοριακού βάρους ο 100 bp DNA ladder.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPVs) είναι DNA ιοί με μικρό γονιδίωμα μεγέθους περίπου 8 kb. Το γονιδίωμά τους περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, χωρίς επιπλέον λιπιδικό έλυτρο και μολύνουν είτε δερματικές είτε βλεννογόνες επιφάνειες.

Υπάρχουν πέντε γένη εκ των οποίων οι τύποι Beta και Gamma προκαλούν λοιμώξεις οι οποίες είναι χρόνιες, αλλά μη εμφανείς. Αντίθετα οι τύποι Alpha προκαλούν εμφανείς λοιμώξεις, δηλαδή κακοήθη φαινόμενα που οδηγούν στην καρκινογένεση [Groves IJ et al 2015].

Η μόλυνση των γεννητικών οργάνων με τον HPV είναι η πιο κοινή σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη. Οι τύποι HPV 6-11 προκαλούν σε ποσοστό 90% κονδυλώματα και δεν είναι καρκινογόνοι. Ωστόσο, οι τύποι HPV 16-18 που εμπλέκονται με ποσοστό 10% στις λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων είναι υπεύθυνοι για την πλειονότητα των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [Siddiqui MA et al 2006].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να αποφευχθεί μέσω εμβολίων, πριν το άτομο ξεκινήσει την σεξουαλική επαφή [Vicky B. Benard et al 2014].

Το γονιδίωμα του HPV αντιγράφεται επισωμικά στα κύτταρα του ξενιστή, ενώ στην ενσωματωμένη του μορφή μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε υψηλή έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην εμφάνιση καρκίνου και στη διατήρηση του μετασχηματισμένου φαινοτύπου [Yugawa T. et al 2009].

Πιο αναλυτικά, η E6 αναστέλλει τη λειτουργία της p53 η οποία ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου, ενώ η E7 αλληλεπιδρά με την pRB, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [Narisawa-Saito et al 2007].

Όπως έχει είδη αναφερθεί υπάρχει μια πληθώρα ερευνών που έχουν ασχοληθεί με τον HPV. Ο στόχος της εργασίας ήταν η μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών αυτών σε τραχηλικά επιχρίσματα. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε μία ισοθερμική χρωματομετρική τεχνική Colorimetric LAMP η οποία αποσκοπεί στην ανίχνευση του HPV-18. Η LAMP σαν τεχνική, καθιερώθηκε για πρώτη φορά από μια ομάδα ερευνητών στην Ιαπωνία [Notomi Tsugunori et al 2000].

Η ισοθερμική τεχνική LAMP θεωρείται μια απλή, γρήγορη και εύκολη τεχνική για την ενίσχυση μικρών νουκλεοτιδικών στόχων σε ισοθερμικές συνθήκες. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία γρήγορη, ευαίσθητη και ειδική WarmStart Colorimetric LAMP για την ανίχνευση του HPV-18. Η ανίχνευση έγινε στοχεύοντας μια συγκεκριμένη και συντηρημένη περιοχή του ιού HPV-18, που είναι το γονίδιο E6 του ιού. Τα αποτελέσματα ήταν άμεσα ορατά μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε, καθώς είχαμε χρωματική αλλαγή μετά το πέρας της αντίδρασης, μειώνοντας το χρόνο και το κόστος για την ανίχνευση του HPV-18.

Η διαφορά της Colorimetric LAMP με την απλή LAMP έγκειται στο γεγονός ότι στο μείγμα της αντίδρασης υπάρχει επιπλέον ένας δείκτης, ο οποίος προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του δείγματος ανάλογα με το pH. Η αλλαγή στο pH οφείλεται στην παραγωγή πυροφοσφωρικών ιόντων, ως παραπροϊόντα της αντίδρασης της DNA πολυμεράσης με τα DNTPs . Έτσι, όταν ένα δείγμα είναι θετικό γίνεται κίτρινο, ενώ όταν είναι αρνητικό, παραμένει κόκκινο . Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, 22μl από το μείγμα της αντίδρασης και 3μl από το δείγμα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε: WarmStart Color Mix 1X (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0,2μmol από τον εκκινητή HPV-18 F3, 0,2μmol από τον εκκινητή HPV-18 B3, 0,8μmol από τον εκκινητή HPV-18 FIP, 0,8μmol από τον εκκινητή HPV-18 BIP και 7,7μl ddH₂O. Το WarmStart Color Mix 1X περιέχει: το buffer της αντίδρασης χαμηλής περιεκτικότητας σε Tris μαζί με όλους τους απαραίτητους συμπράγοντες, την DNA πολυμεράση Bst 2.0, 8mM MgSO₄ και τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης (Phenol red).

Η εξειδίκευση της τεχνικής Colorimetric LAMP ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τον HPV-18 σε δείγματα που ήταν αρνητικά για τον HPV-18, αλλά θετικά για τον HPV-16. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν να μην υπάρχει χρωματική αλλαγή από κόκκινο σε κίτρινο χρώμα, αποδεικνύοντας έτσι την ειδικότητα της τεχνικής.

Η χρωματομετρική μέθοδος WarmStart Colorimetric LAMP, δείχθηκε ότι ανιχνεύει έως και 10 αντίγραφα, γεγονός που την καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητη για την ανίχνευση του HPV-18. Επιπλέον η μέθοδος αυτή ήταν πιο γρήγορη συγκριτικά με τη συμβατική PCR αφού ολοκληρώθηκε μέσα σε 60 με 80 λεπτά .

Συμπερασματικά, η χρωματομετρική μέθοδος WarmStart Colorimetric LAMP απέδειξε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανίχνευση των ιών HPV-18. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της τεχνικής καθώς και η πρόβλεψη των αναλύσεων σε κλινικά δείγματα ήταν απόλυτα επιτυχής. Τέλος, το πρωτόκολλο της LAMP μπορεί να

θεωρηθεί ως ισχυρό μοριακό εργαλείο, το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο και εξαιρετικά εύχρηστο σε εργαστηριακές αναλύσεις μεγάλης κλίμακας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbate EA, Berger JM, Botchan MR. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1981-96. Epub 2004 Aug 2.
- Al Moustafa AE. E5 and E6/E7 of high-risk HPVs cooperate to enhance cancer progression through EMT initiation. *Cell Adh Migr.* 2015;9(5):392-3. doi: 10.1080/19336918.2015.1042197. Epub 2015 Jul 15.
- Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):881-90.
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002 Aug;67(4):574-82.
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002 Aug;67(4):574-82
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J.* 1991 Dec;60(6):1445-56.
- Bergant Marušič M, Ozburn MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic.* 2012 Mar;13(3):455-67. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01320.x. Epub 2012 Jan 8.
- Bergvall M, Gagnon D, Titolo S, Lehoux M, D'Abramo CM, Melendy T, Archambault J. Requirement for the E1 Helicase C-Terminal Domain in Papillomavirus DNA Replication In Vivo. *J Virol.* 2016 Jan 6;90(6):3198-211. doi: 10.1128/JVI.03127-15.
- Biryukov J, Myers JC, McLaughlin-Drubin ME, Griffin HM, Milici J, Doorbar J, Meyers C. Mutations in HPV18 E1^{E4} Impact Virus Capsid Assembly, Infectivity Competence, and Maturation. *Viruses.* 2017 Dec 19;9(12). pii: E385. doi: 10.3390/v9120385.
- Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):169-74. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038. Epub 2013 Jun 22.

- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):751-7.
- Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):224-31. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.015. Epub 2013 Aug 5.
- Castillo A, Wang L, Koriyama C, Eizuru Y, Jordan K, Akiba S. A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open Biol*. 2014 Oct;4(10). pii: 130119. doi: 10.1098/rsob.130119.
- Christensen ND. HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell*. 2016 Sep 5;3(9):476-490. doi: 10.15698/mic2016.09.530.
- Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*. 1987 Feb 20;193(4):599-608.
- Colgan TJ. Pap test results. Responding to Bethesda system reports. *Can Fam Physician*. 2001 Jul;47:1425-30.
- Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009 Apr;88(4):307-17. doi: 10.1177/0022034509333446.
- Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG 3rd, Dürst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*. 1987 Dec 1;6(12):3745-53.
- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*. 2006 Sep;80(18):8940-50.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):2-10. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.023. Epub 2013 May 16.

- Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology*. 1998 Mar 15;242(2):378-86.
- Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology*. 1998 Mar 15;242(2):378-86.
- Demeret C, Le Moal M, Yaniv M and Thierry F. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 1995 Dec 11; 23(23): 4777–4784.
- DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):99-114. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006. Epub 2013 May 31.
- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008. Epub 2013 Sep 7.
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(12):3812-5.
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015 Jul 16;7(7):3863-90. doi: 10.3390/v7072802.
- Egawa N, Wang Q, Griffin HM, Murakami I, Jackson D, Mahmood R, Doorbar J. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. *PLoS Pathog*. 2017 Mar 17;13(3):e1006282. doi: 10.1371/journal.ppat.1006282. eCollection 2017 Mar
- El Mehdaoui S, Touzé A, Laurent S, Sizaret PY, Rasschaert D, Coursaget P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10332-40.
- Hughes F J and Romanos M A. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*. 1993 Dec 25; 21(25): 5817–5823.

- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997 Aug 15;11(16):2090-100.
- Gao G, Johnson SH, Vasmatzis G, Pauley CE, Tombers NM, Kasperbauer JL, Smith DI. 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.* 2017 Jan;56(1):59-74. doi: 10.1002/gcc.22415. Epub 2016 Nov 1.
- Ngan H Y, Stanley M, Liu S S, and Ma H K. HPV and p53 in cervical cancer. *Genitourin Med.* 1994 Jun; 70(3): 167–170.
- Hans-Ulrich Bernard, Robert D. Burk, Zigui Chen, Koenraad van Doorslaer, Harald zur Hausen, and Ethel-Michele de Villiers. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology.* 2010 May 25; 401(1): 70–79.
- Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017 Apr - Jun;772:3-12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002. Epub 2016 Jul 5.
- Hawley-Nelson P, Vousden K H, Hubbert N L, Lowy D R, and Schiller J . HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 1989 Dec 1; 8(12): 3905–3910.
- Jang MK, Anderson DE, van Doorslaer K, McBride AA. A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics.* 2015 Jun;15(12):2038-50. doi: 10.1002/pmic.201400613. Epub 2015 Apr 28.
- Jiang P, Yue Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Exp Ther Med.* 2014 Jan;7(1):3-7. Epub 2013 Oct 30.
- Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol.* 2012 Apr 24;3:152. doi: 10.3389/fmicb.2012.00152. eCollection 2012.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial

neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6132-6.

- Manini I, Montomoli E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig.* 2018 Jul-Aug;30(4 Suppl 1):28-32. doi: 10.7416/ai.2018.2231.
- McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):57-79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006. Epub 2013 Jul 10.
- McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem.* 2017 Jul 26;398(8):919-927. doi: 10.1515/hsz-2017-0113.
- McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):335-44. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.006. Epub 2008 Nov 12.
- Mittal S, Banks L2. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017 Apr - Jun;772:23-35. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.08.001. Epub 2016 Aug 5.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1505-11. Epub 2007 Jul 23.
- Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol.* 2003 Jun;77(12):6957-64.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015 Jan;53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9. Epub 2015 Jan 4.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.
- Ranieri D, Belleudi F, Magenta A, Torrisi MR. HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. *Int J Cancer.* 2015 Jul 1;137(1):61-72. doi: 10.1002/ijc.29373. Epub 2014 Dec 13.
- Roberts S, Ashmole I, Gibson L G, Rookes S M, Barton G J, Gallimore P H. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features

important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells.
Published online October 1, 1994.

- Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):138-68. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013. Epub 2013 May 31.
- Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, Howley PM. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol*. 1991 May;65(5):2739-44.
- Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e39632. doi: 10.1371/journal.pone.0039632. Epub 2012 Jun 27.
- Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*. 2012 Oct 5;6(2):e17. doi: 10.4081/oncol.2012.e17. eCollection 2012 Oct 2.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 2003 Dec;77(24):13125-35.
- Shuying Li, Zhanjun Liu, Jianghong Yan, Shangbo Sun, Xiaoli Hou, Dianqing Liu, Ke Zhang and Jin-Tao Li. Integration sites of human papillomavirus 18 in esophageal cancer samples. *Oncol Lett*. 2018 May; 15(5): 7438–7442.
- Søre MJ, Rohde M, Mikkelsen J, Warthoe P. IsoPCR: an analytically sensitive, nested, multiplex nucleic acid amplification method. *Clin Chem*. 2013 Feb;59(2):436-9. doi: 10.1373/clinchem.2012.193664. Epub 2012 Oct 31.
- 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. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
- Sunanda Baidya, Rasel Das Md. Golam Kabir and Md. Arifuzzaman. Epitope design of L1 protein for vaccine production against Human Papilloma Virus types 16 and 18. *Bioinformation*. 2017; 13(3): 86–93.

- Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol.* 1999 Jun;80 (Pt 6):1513-7.
- Tsakogiannis D, Diamantidou V, Toska E, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Ruether IG, Gortsilas P, Markoulatos P. Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Arch Virol.* 2015 Jan;160(1):207-14. doi: 10.1007/s00705-014-2261-6. Epub 2014 Oct 25.
- Ustav M and Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* 1991 Feb; 10(2): 449–457.
- Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol.* 2018 Aug;99(8):989-990. doi: 10.1099/jgv.0.001105. Epub 2018 Jun 21.
- Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):11-20. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.012. Epub 2013 Jun 14.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer.* 2011 Nov 11;10:140. doi: 10.1186/1476-4598-10-140.
- Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology.* 1991 Mar;181(1):374-7.
- Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):175-86. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017. Epub 2013 May 17.
- Wang X, Liu H1, Ge H2, Ajiro M1, Sharma NR1, Meyers C3, Morozov P4, Tuschl T4, Klar A1, Court D1, Zheng ZM5. Viral DNA Replication Orientation and hnRNPs Regulate Transcription of the Human Papillomavirus 18 Late Promoter. *MBio.* 2017 May 30;8(3). pii: e00713-17. doi: 10.1128/mBio.00713-17.
- Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM. Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol.* 2011 Aug;85(16):8080-92. doi: 10.1128/JVI.00670-11. Epub 2011 Jun 15.

- Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018 Mar;124(3):626-643. doi: 10.1111/jam.13647. Epub 2018 Feb 12.
- Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One.* 2013 Jun 18;8(6):e66693. doi: 10.1371/journal.pone.0066693. Print 2013.
- Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006 Sep 1;11:2286-302.