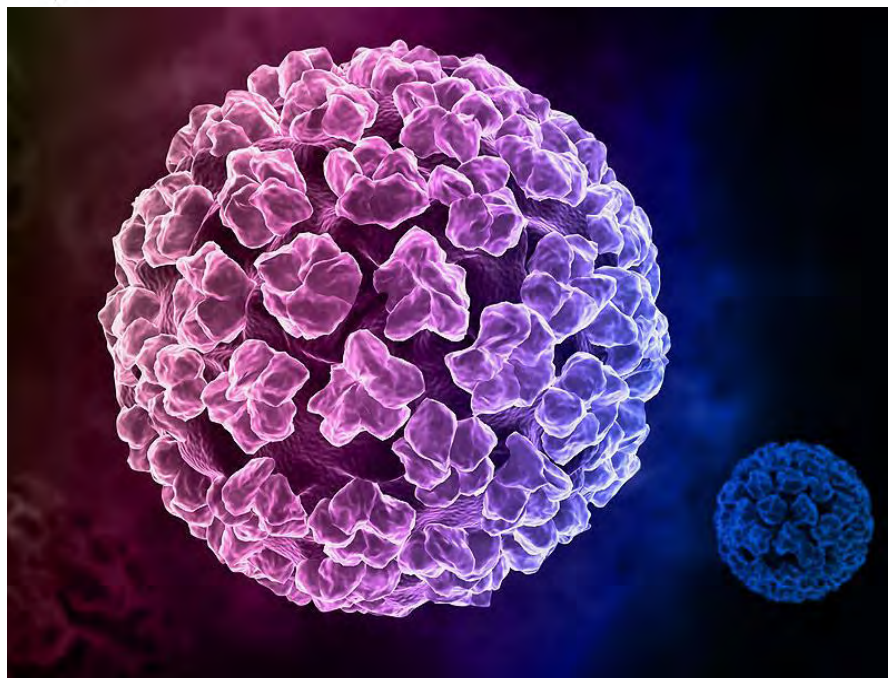




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



Πτυχιακή Εργασία

**Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) για
την ανίχνευση των ιών HPV16 και οπτικοποίηση των
αποτελεσμάτων**

**Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for
detection of HPV16 viruses and visualization of the
results**

Μανάλη Μαρία

Λάρισα 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

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

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας από τον Φεβρουάριο έως τον Ιούλιο του 2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη και συνεχή στήριξή του κατά τη διάρκεια αυτών των μηνών.

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

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Δάσκου Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια της, τη συνεχή ενθάρρυνση της και για την άψογη συνεργασία, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι HPV είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae και προσβάλλουν κυρίως το επιθήλιο του βλεννογόνου και του δέρματος. Το ιικό γονιδίωμα των HPV μπορεί να βρίσκεται είτε σε επισωματική μορφή, είτε σε ενσωματωμένη στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Αν και οι ιοί αυτοί διαθέτουν σχετικά μικρό γονιδίωμα, 8.000 βάσεων, μπορούν να κωδικοποιούν τα απαραίτητα γονίδια για την επιβίωση και την αντιγραφή τους μέσω της ύπαρξης οχτώ ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORFs), τα οποία εντοπίζονται στον έναν μόνο κλώνο του DNA.

Για τη μόλυνση από τον ιό απαιτείται η παρουσία ενός μικροτραυματισμού που θα επιτρέψει την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Μεταξύ των ασθενειών που μπορούν να προκληθούν από τους HPVs συμπεριλαμβάνονται τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο. Οι HPVs χαμηλού κινδύνου τις περισσότερες φορές προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθειες αλλοιώσεις. Αντίθετα, οι HPVs υψηλού κινδύνου μπορούν να προκαλέσουν δυσπλασίες έως και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μιας μεθόδου που θα επιτρέπει την ανίχνευση των συγκεκριμένων τύπων ιών σε σύντομο χρονικό διάστημα, με χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια.

Στην παρούσα εργασία εξετάσθηκε η εφαρμογή της μεθόδου colorimetric LAMP για τη γρήγορη και ειδική ανίχνευση των ιών HPV16 σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας. Η colorimetric LAMP είναι μια ισόθερμη τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση του δείγματος με τη χρήση τεσσάρων εκκινητών που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές. Η εξειδίκευση της μεθόδου οφείλεται στην ύπαρξη αρκετών εκκινητών, ενώ η ταχύτητα στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων οφείλεται στην σύντομη αλλαγή χρώματος των δειγμάτων σε περίπτωση που είναι θετικά.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας επιβεβαίωσαν ότι αποτελεί μια ιδανική τεχνική για την ειδική ανίχνευση των HPV16 ιών, καθώς σε πολύ σύντομο χρόνο και με χαμηλό κόστος μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη των HPV 16 ιών σε ένα κλινικό δείγμα.

ABSTRACT

HPVs are double-stranded, circular, DNA viruses without an envelope, belonging to Papillomaviridae family affecting mainly the mucosal and cutaneous epithelium. The viral genome of HPV can be found either in episomal form or integrated in the host cell genome. Although these viruses have a relatively small genome of 8,000 bases, they possess the necessary genes for their survival and replication through the presence of eight open reading frames (ORFs), located on the single strand of DNA.

Virus infection requires the presence of a microtrusion that will allow the virus to enter the cells of the basal layer of the epithelium. Among the diseases that can be caused by HPV are genital warts, which are the most common sexually transmitted disease in the world. Low risk HPVs often cause asymptomatic infections or benign lesions. Conversely, high-risk HPVs can cause malformations and even cervical cancer. For this reason, it is necessary to have a method that allows the detection of these virus rapidly, with low cost and high accuracy.

In the present study, the application of the colorimetric LAMP method for the rapid and specific detection of HPV16 viruses in clinical cervical samples was evaluated. Colorimetric LAMP is an isothermal technique that allows the amplification of the sample using four or six different primers. The specificity of the method is due to the existence of several primers, while the speed in the visualization of the results is due to the color change of the samples in case that these samples are positive.

The results obtained from the application of the colorimetric LAMP method to clinical cervical samples confirmed that it is an ideal technique for the specific detection of HPV16 viruses, as it can confirm in a very short time and with a low cost the existence of HPV 16 viruses in clinical samples .

Πίνακας Περιεχομένων

1.Εισαγωγή.....	1
1.1 Βιολογία των ιών HPV.....	1
1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών.....	1
1.3 Δομή των ιικών σωματιδίων.....	2
1.4 Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος.....	3
1.4.1 Η ιική πρωτεΐνη E1.....	4
1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E2.....	5
1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E4.....	6
1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E5.....	7
1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E6.....	8
1.4.6 Η ιική πρωτεΐνη E7.....	9
1.4.7 Οι δομικές ιικές πρωτεΐνες L1 και L2.....	11
1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος.....	12
1.6 Κύκλος ζωής των HPV.....	13
1.6.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση.....	13
1.6.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	15
1.6.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.....	15
1.6.4 Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση ..	16
1.7 Κλινικά συμπτώματα- Ιστολογικές αλλοιώσεις.....	17
2. Σκοπός.....	18
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	19
3.1 Κλινικά δείγματα.....	19
3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep.....	20
3.3 PCR στα κλινικά δείγματα.....	20
3.4 Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP).....	22

3.4.1 Δομή των εκκινητών και μηχανισμός της αντίδρασης	22
3.4.2 Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP	23
3.4.3 Colorimetric LAMP.....	24
3.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και της colorimetric LAMP	24
3.6 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης	25
3.7 Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR.....	25
3.8 Διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις πλασμιδίων	27
3.9 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων	27
4. Αποτελέσματα	28
4.1 PCR στα E6 και L1 γονίδια.....	28
4.2 Real Time PCR στις αραιώσεις πλασμιδίων	30
4.3 Έλεγχος ευαισθησίας της colorimetric LAMP.....	32
4.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colorimetric LAMP	32
4.5 Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα	33
4.6 Έλεγχος εξειδίκευσης της colorimetric LAMP	34
5. Συζήτηση	35
6. Βιβλιογραφία	38

1.Εισαγωγή

1.1 Βιολογία των ιών HPV

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι δίκλωνοι, κυκλικοί, DNA ιοί. Δεν διαθέτουν επιπλέον λιπιδικό εξωτερικό περίβλημα, ενώ το καψίδιο τους είναι εικοσαεδρικής δομής με διάμετρο 50-60nm. Το DNA των ιών βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες και σχηματίζει σύμπλοκα παρόμοια με την χρωματίνη. Ένα χαρακτηριστικό του γονιδιώματος των HPV είναι ότι όλα τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) εντοπίζονται στον έναν μόνο κλώνο του ιικού DNA, από τον οποίο μεταγράφονται όλα τα ιικά γονίδια. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 150 γονότυποι HPV. Η μόλυνση, από τους HPV, συμβαίνει μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου, εκθέτοντας τα κύτταρα της βασικής στιβάδας στον ιό προκαλώντας ασυμπτωματικές μολύνσεις, κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [1].

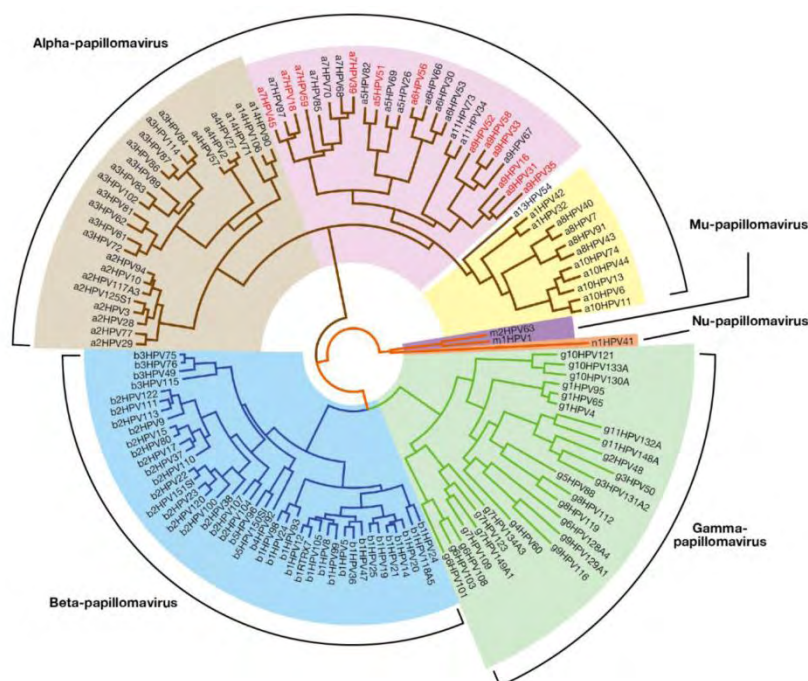
1.2 Ταξινόμηση των Papilloma ιών

Στο παρελθόν οι Papilloma ιοί είχαν ταξινομηθεί μαζί με τους πολυώμα ιούς σε μία οικογένεια, αυτή των Papovaviridae. Η ταξινόμηση αυτή προέκυψε εξαιτίας του γεγονότος ότι και οι δύο κατηγορίες ιών διέθεταν δίκλωνο κυκλικό DNA, καψίδιο εικοσαεδρικής δομής αποτελούμενο από 72 πενταμερή, κανένα εξωτερικό περίβλημα και η θέση αντιγραφής και των δύο ήταν ο πυρήνας. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος ταξινόμησης εγκαταλήφθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει καμία ομολογία στα γονιδιώματά τους. Έτσι, από το 2000 οι ιοί των θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae [1].

Η ταξινόμηση των ιών των θηλωμάτων βασίζεται στην αλληλουχία του γονιδίου L1. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο αυτό είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο των ιών, καθώς ανάμεσα και στα πιο «απομακρυσμένα» γονιδιώματα παρουσιάζει τουλάχιστον 40% ομολογία. Έτσι, μεταξύ των ιών που ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae αυτοί που εμφανίζουν τουλάχιστον 60% ομολογία μεταξύ τους ανήκουν στο ίδιο γένος. Το είδος περιλαμβάνει ιούς με ομολογία 60-70%, ο τύπος περιλαμβάνει ιούς με ομολογία 71-89%, ο υπότυπος 90-98%, ενώ οι παραλλαγές περιλαμβάνουν ιούς με ομολογία πάνω από 98% [2].

Με βάση αυτήν την ταξινόμηση οι HPV ομαδοποιούνται σε 5 γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu). Οι HPV που ανήκουν στο γένος Alpha αποτελούν ιούς χαμηλού κινδύνου που είτε προσβάλουν το δερματικό επιθήλιο και προκαλούν κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, είτε το βλεννογόνο και προκαλούν

καλοήθεις αλλοιώσεις, καθώς και ιούς υψηλού κινδύνου που σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι HPV που ανήκουν στο γένος Beta προσβάλλουν μόνο το δερματικό επιθήλιο και διακρίνονται σε ιούς χαμηλού κινδύνου και σε ιούς υψηλού κινδύνου. Τις περισσότερες φορές προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις, ωστόσο σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και καρκίνο του δέρματος. Τέλος, οι HPV που ανήκουν στα γένη Gamma, Mu και Nu προσβάλλουν μόνο το δερματικό επιθήλιο και προκαλούν καλοήθεις αλλοιώσεις [3].

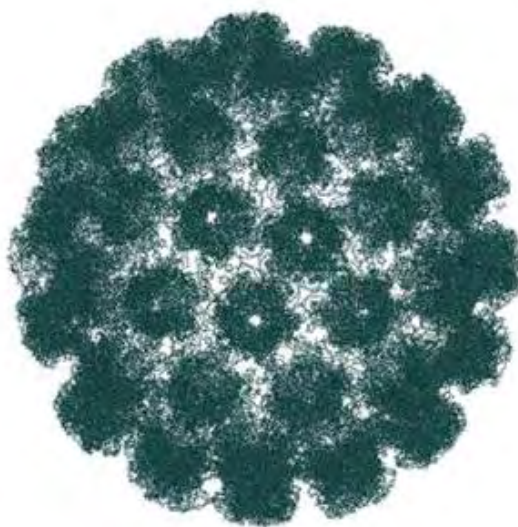


Εικόνα 1.2.1: Ταξινόμηση των HPV σε 5 γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu) [3].

1.3 Δομή των ιικών σωματιδίων

Τα ιικά σωματίδια των HPV έχουν διάμετρο 55-60nm, δεν διαθέτουν επιπλέον λιπιδικό εξωτερικό περίβλημα και αποτελούνται από ένα μόριο δίκλωνου κυκλικού DNA 8.000 βάσεων που περιβάλλεται από τις ιικές L1 και L2 πρωτεΐνες. Η L1 πρωτεΐνη σχηματίζει τα πενταμερή και είναι το κύριο συστατικό του καψιδίου, ενώ η L2 πρωτεΐνη αποτελεί ένα μικρότερης σημασίας συστατικό. Κάθε καψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας που σχηματίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης 72 πενταμερών που αποτελούνται από την L1 πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη L2 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα πενταμερή της L1, ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστό αν κάθε πενταμερές της L1 περιέχει ένα μονομερές της L2. Τέλος, εντός του ιικού σωματιδίου περιέχεται το ιικό DNA συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο όμοιο με χρωματίνη. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι L1 και L2 δεν εντοπίζονται στα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής

στιβάδας, αλλά εντοπίζονται στον πυρήνα των τελικώς διαφοροποιημένων κύτταρων στο ανώτερο στρώμα επιθηλίου [5].

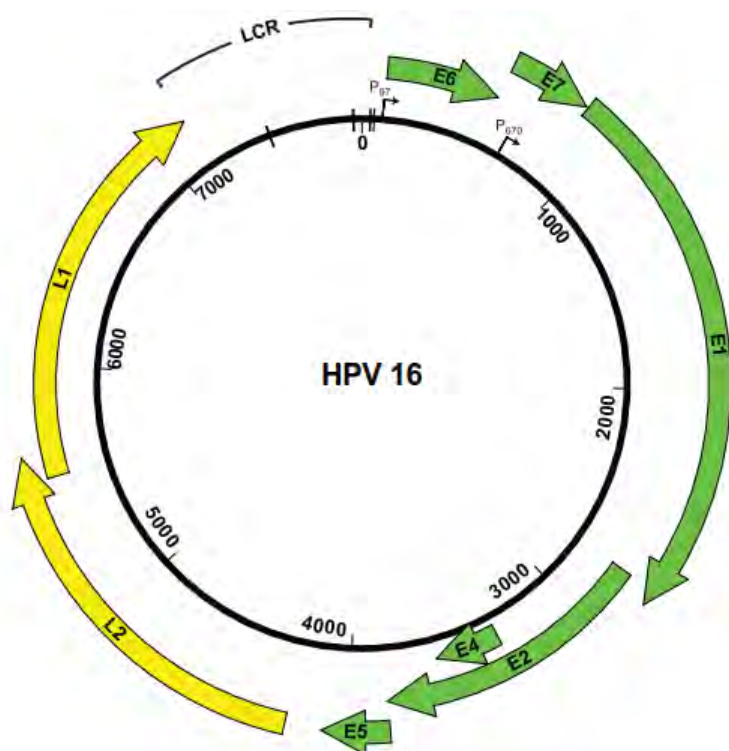


Εικόνα 1.3.1: Δομή ενός ιού HPV [4].

1.4 Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της οργάνωσης του γονιδιώματος των HPV είναι η ύπαρξη οχτώ ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORFs), τα οποία εντοπίζονται στον έναν μόνο κλώνο του ιικού DNA, παράγοντας τα διαφορετικά πολυκιστρονικά mRNAs. Τα ORFs διακρίνονται σε πρώιμα (Early, E) και όψιμα (Late, L), ανάλογα με την τοποθέτησή τους στο γονιδίωμα. Η πρώιμη περιοχή περιέχει 6 ORFs και κωδικοποιεί για τις ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6, E7, οι οποίες μεταξύ άλλων είναι υπεύθυνες για την έναρξη της αντιγραφής του ιού, ενώ η όψιμη περιοχή περιέχει 2 ORFs και κωδικοποιεί για τις L1 και L2 πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση των ιικών καψιδίων. Ακόμη, στο γονιδίωμα των HPV εντοπίζονται δύο σημαντικοί υποκινητές εκ των οποίων ο ένας βρίσκεται ανοδικά του E6 γονιδίου και κωδικοποιεί για όλες τις πρώιμες πρωτεΐνες (HPV 16→p97). Ο δεύτερος υποκινητής εντοπίζεται καθοδικά του E6 γονιδίου και

κωδικοποιεί για τις όψιμες πρωτεΐνες ή αλλιώς τις πρωτεΐνες του καψιδίου (HPV16→ p670). Τέλος, υπάρχει μια περιοχή, περίπου 1000 βάσεων, η οποία φέρει τη θέση έναρξης της αντιγραφής, δεν περιέχει κανένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και ονομάζεται LCR. Σε αυτή την περιοχή προσδένονται πάρα πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες και είναι πολύ σημαντική για την αντιγραφή του ιού [1].



Εικόνα 1.4.1: Οργάνωση του γονιδιώματος του HPV16 [1].

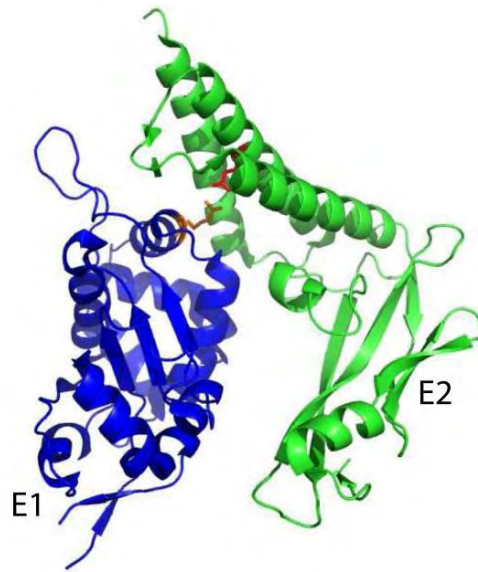
1.4.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η E1 έχει μέγεθος 68 KDa και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα HPV-θετικά κύτταρα. Το ORF της E1 είναι το πιο διατηρημένο των HPV και φαίνεται να αποτελεί απαραίτητο συστατικό για την έναρξη της αντιγραφής των HPV. Διαθέτει δύο δραστηριότητες, 3'-5' ελικάσης και ΑΤΡάσης. Έχει την ικανότητα να συνδέεται σε συγκεκριμένα στοιχεία του DNA στη θέση έναρξης της αντιγραφής και να σχηματίζει εξαμερή σύμπλοκα ελικάσης με τη βοήθεια της E2 πρωτεΐνης. Συνολικά, η πρωτεΐνη μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις ρυθμιστικές περιοχές: την αμινοτελική, η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού, την κεντρική που ευθύνεται για τη σύνδεση στο DNA στο σημείο έναρξης της αντιγραφής και την καρβοξυτελική περιοχή, η οποία συμβάλλει στην συναρμολόγηση της πρωτεΐνης σε εξαμερή και τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης [6]. Μόλις η E1 προσδεθεί στο DNA σχηματίζει έναν εξαμερή δακτύλιο διαμέσου του οποίου περνά το DNA του ιού και ξετυλίγεται. Μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά και να στρατολογεί διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αντιγραφή, όπως η DNA πολυμεράση και η RPA [7].

Η E1 αποτελεί το μοναδικό ένζυμο και ταυτόχρονα την πιο συντηρημένη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τους ιούς των θηλωμάτων. Ο ρόλος της στην αντιγραφή των ιών φαίνεται να είναι αρχικά η αύξηση των αριθμών των αντιγράφων των επισωμάτων που παράγονται στα μολυσμένα κερατινοκύτταρα. Στην συνέχεια, είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των επισωμάτων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα και τέλος, για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του ιικού κύκλου, ο οποίος πραγματοποιείται στο ανώτερο στρώμα των διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων [6]

1.4.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη έχει μέγεθος 50 KDa λειτουργεί ως διμερές συμμετέχοντας τόσο στην αντιγραφή του ιικού DNA, όσο και στην ρύθμιση της μεταγραφής. Το –COOH άκρο της κωδικοποιεί για μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), η οποία αποτελείται από μία διμερή δομή β-βαρελίου ενώ το –NH₂ άκρο της φέρει μια περιοχή trans-ενεργοποίησης. Ο κύριος ρόλος της στη μεταγραφή είναι η στρατολόγηση διάφορων κυτταρικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη διαδικασία της μεταγραφής. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων ενισχύεται περαιτέρω παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων της E2, ενώ αντίθετα καταστέλλεται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων της E2. Αυτή η ρύθμιση της μεταγραφής συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των ιικών αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Σε περίπτωση μετάλλαξης ή ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος, η λειτουργία της E2 διακόπτεται με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των γονιδίων E6, E7, συμβάλλοντας στην κακοήγη πορεία σε περίπτωση μόλυνσης με «υψηλού κινδύνου» HPV. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, συμβαίνει μια μετάβαση της έκφρασης από τον πρώιμο στον όψιμο επαγωγέα, ο οποίος δεν καταστέλλεται από την E2, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των E1 και E2 και συνεπώς σε ενίσχυση του ιικού DNA [8]. Ακόμα, η πρωτεΐνη E2 συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 ελικάσης στην θέση έναρξης. Αν και η πρωτεΐνη E1 αποτελεί την σημαντικότερη πρωτεΐνη για την αντιγραφή, ωστόσο και η E2 είναι απαραίτητη καθώς ενισχύει και υποστηρίζει τις λειτουργίες της E1. Επιπλέον, απομακρύνει τα νουκλεοσώματα από την περιοχή ori, ώστε να ξεκινήσει η αντιγραφή.

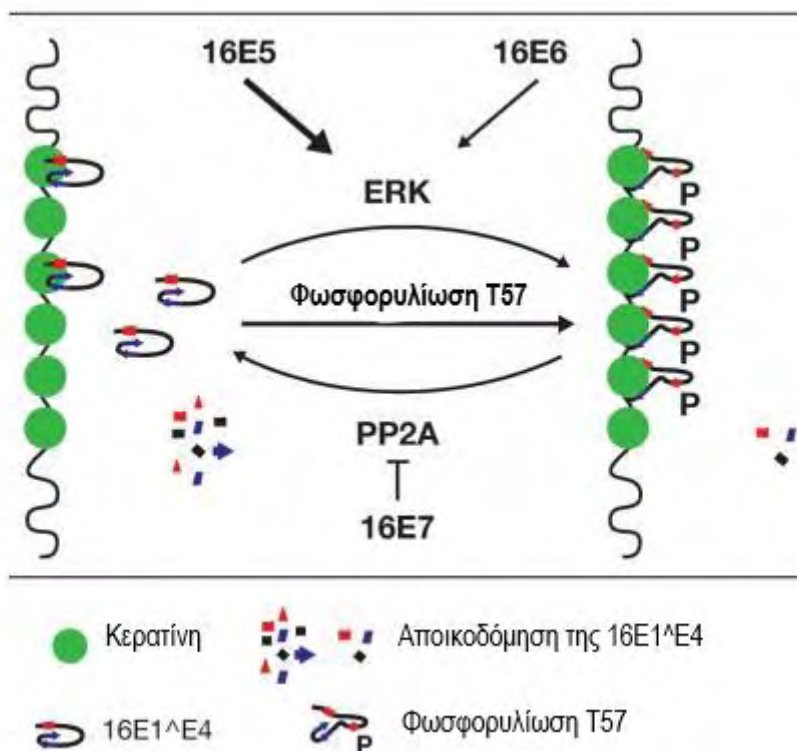


Εικόνα 1.4.2.1: Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών E1 και E2 [8].

1.4.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου E4 βρίσκεται επικαλυπτόμενο με αυτό του γονιδίου E2 και η πρωτεΐνη παράγεται από ένα ματισμένο mRNA, στο οποίο το κωδικόνιο έναρξης και αντίστοιχα τα πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του E1, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης σύντηξης E1^{E4}. Αν και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται στην πρώιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος, η πρωτεΐνη παράγεται τελικά κατά τα τελευταία στάδια της μόλυνσης, την στιγμή περίπου που ξεκινά ο πολλαπλασιασμός του γονιδιώματος [9].

Οι γνώσεις ωστόσο σχετικά με τις λειτουργίες της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού παραμένουν ανεπαρκείς. Έχει προταθεί ότι μπορεί να προσδένει την κερατίνη, σημείο-κλειδί για την απελευθέρωση του ιού, αλλά ακόμα δεν έχει επιβεβαιωθεί. Καθώς η αντιγραφή του ιού προχωρά στη φάση πολλαπλασιασμού, η πρωτεΐνη E4 φωσφορυλιώνεται στην θέση Thr57 από την κινάση p42ERK, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της και την αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης της κερατίνης. Η φωσφορυλίωση της E4 από την ERK οφείλεται στην επαγωγή της δεύτερης από τις E6 και E5 αλλά και στην καταστολή της PP2A φωσφατάσης από την ογκοπρωτεΐνη E7. Η υπερέκφραση του γονιδίου κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού του ιού έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των δικτύων κερατίνης με τα οποία αλληλεπιδρά [10].



Εικόνα 1.4.3.1: Πιθανό μοντέλο αλληλεπίδρασης της E4 με την κερατίνη [11].

1.4.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η πρωτεΐνη E5 είναι μια υδρόφοβη μεμβρανική πρωτεΐνη 83 αμινοξέων που εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Όταν υπερεκφράζεται εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στον πυρηνικό φάκελο και στο σύστημα Golgi, ενώ όταν εκφράζεται σε πιο φυσιολογικά επίπεδα, κυρίως στα κερατινοκύτταρα, είναι παρούσα κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε μικρότερο βαθμό στο σύστημα Golgi. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη E5 έχει την ικανότητα να ενισχύει την προσδετο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του EGF υποδοχέα και να διεγείρει την EGF-εξαρτώμενη ανάπτυξη καλλιιεργούμενων κυττάρων. Ακόμα, διαθέτει και μια αντίθετη λειτουργία, αυτή της καταστολής του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-R2b), οδηγώντας σε μείωση της απόκρισης του υποδοχέα μετά από τη σύνδεση με τους προσδέτες του. Φαίνεται λοιπόν ότι η E5 μπορεί να έχει δύο αντικρουόμενα αποτελέσματα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό του ιού: να συμβάλλει στην ανάπτυξη των αδιαφοροποίητων βασικών κυττάρων, επάγοντας το μονοπάτι του EGF υποδοχέα, και να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων καταστέλλοντας τη σηματοδότηση του μονοπατιού του FGF-R2b. Τέλος, η E5 μπορεί να καταστείλει την έκφραση των ογκοκαταστολέων p21 και p27, οι οποίοι αποτελούν αναστολείς κυκλινεξαρτώμενων κινασών, προκαλώντας έμμεσα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη σύνθεση του DNA [12].

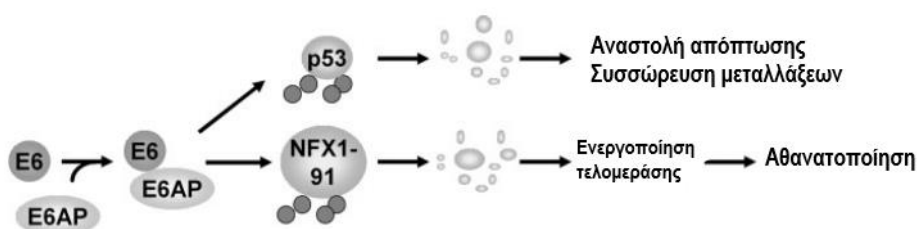
1.4.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η πρωτεΐνη E6 είναι ένα μικρό πολυπεπτίδιο περίπου 150 αμινοξέων που περιέχει δύο μοτίβα zinc-finger που παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί τη μια από τις τρεις ογκοπρωτεΐνες που φαίνεται να κωδικοποιούνται από τους HPV υψηλού κινδύνου, όπως ο HPV-16. Εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε περισσότερες από 12 διαφορετικές πρωτεΐνες εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η πρώτη ένδειξη που υποδείκνυε ότι η E6 είναι μια ιική ογκοπρωτεΐνη προέκυψε από μελέτες σε καρκινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας, όπου η E6 βρέθηκε να διατηρείται και να εκφράζεται για πολλά χρόνια μετά τα αρχικά γεγονότα μετασχηματισμού.

Ο πρώτος κυτταρικός στόχος της E6 ογκοπρωτεΐνης που ανακαλύφθηκε και είναι ο πιο σημαντικός είναι η p53. Η πρωτεΐνη p53, βρίσκεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μικρή συγκέντρωση στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λειτουργεί ως παράγοντας ρύθμισης της μεταγραφής. Βλάβες στο DNA, προσβολή του κυττάρου από ιό, υπερέκφραση κυτταρικών πρώτο-ογκογονιδίων, αλλά και βλάβη ή αδρανοποίηση της πρωτεΐνης Rb, οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της φυσιολογικής μορφής της p53. Η p53 επάγει την έκφραση του γονιδίου για την p21, ενός αναστολέα πολλών κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται το σταμάτημα του κύκλου σε διάφορα σημεία, με σκοπό να δοθεί στο κύτταρο η δυνατότητα να διορθώσει τη βλάβη. Όταν επιτευχθεί αυτό αίρεται η αναστολή και το κύτταρο μπορεί να συνεχίσει τον κύκλο. Σε περίπτωση που η δυσλειτουργία δεν μπορεί να αντιμετωπισθεί επιτυχώς από το κύτταρο, τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση, μέσω της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων κυτταρικού θανάτου. Η E6 ογκοπρωτεΐνη επιτυγχάνει την καταστολή της λειτουργίας της p53, κυρίως, επάγοντας την αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού της ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, η E6 σε συνδυασμό με την E6 λιγάση της ουβικουΐτινης προσδένονται στην p53 και δημιουργούν ένα τριμερές σύμπλοκο που οδηγεί στην ουβικουΐτίνωση της p53 και την αποικοδόμηση της από το 26S πρωτεάσωμα. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση του χρόνου ημιζωής της p53 στα κερατινοκύτταρα από μερικές ώρες σε λιγότερο από 20min. Με τον τρόπο αυτό, τα επίπεδα της p53 μειώνονται, καθώς αίρεται και η παύση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, το κύτταρο δεν μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση ως απόκριση στη βλάβη του γονιδιώματος, καταλήγοντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του και στη διαιώνιση των βλαβών. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η αποικοδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 των HPVs υψηλού κινδύνου. Η E6 των HPVs χαμηλού κινδύνου παρόλο που μπορεί να προσδεθεί στην E6AP, δεν μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της p53.

Μία ακόμη λειτουργία της E6 είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης. Η τελομεράση είναι ένα μεγάλο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο υπεύθυνο για τη

σύνθεση μικρών επαναλήψεων DNA στα 3' άκρα των τελομερών (TTAAGGG), αποτρέποντας έτσι την απώλεια βάσεων του DNA σε κάθε κύκλο της αντιγραφής. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα σταματούν να αντιγράφονται όταν τα τελομερή φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος ή αλλάξει η δομή τους ως αποτέλεσμα των πολλαπλών κύκλων αντιγραφής που έχουν υποστεί. Στα καρκινικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα της τελομεράσης ενεργοποιείται μέσω επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου hTERT, το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης. Η επαγωγή αυτή πιθανολογείται ότι προκαλείται από την ογκοπρωτεΐνη E6, η οποία στοχεύει τον παράγοντα NFX1-91 οδηγώντας στην ουβικουϊτίνωση και την αποικοδόμηση του. Ο παράγοντας αυτός ωστόσο αποτελεί έναν καταστολέα του υποκινητή του γονιδίου hTERT, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελομεράσης. Ως συνέπεια, το μήκος των τελομερών διατηρείται και τα κύτταρα αθανатоποιούνται [13].



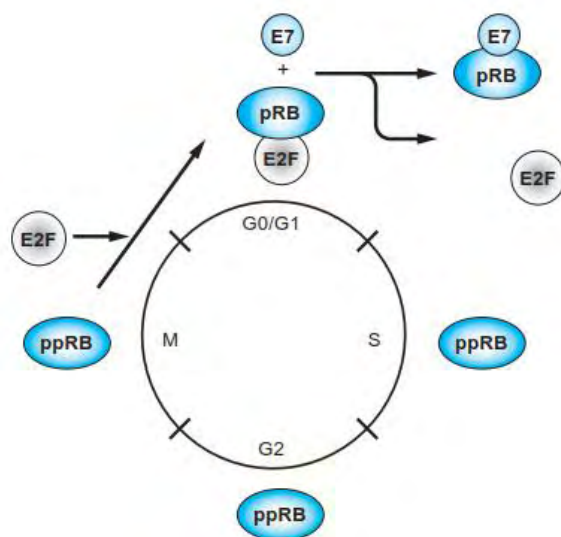
Εικόνα 1.4.5.1: Οι δράσεις της E6 ογκοπρωτεΐνης [13].

1.4.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η ιική πρωτεΐνη E7 αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα και εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα. Αποτελείται από τρεις διατηρημένες περιοχές, την CR1 στο αμινοτελικό άκρο της, την CR2 που περιέχει το μοτίβο LXCXE (X για οποιοδήποτε αμινοξύ, L για την λευκίνη, C για κυστεΐνη και E για γλουταμικό οξύ), όπου προσδένεται η Rb και τη CR3, η οποία χαρακτηρίζεται από 2 μοτίβα παρόμοια με zinc-finger που παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της E7. Όπως η E6, έτσι και η E7 είναι μία από τις τρεις ογκοπρωτεΐνες των HPVs υψηλού κινδύνου και έχει βρεθεί ότι έχει τη δυνατότητα να διατηρείται και να εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα για πολλά χρόνια μετά τα αρχικά γεγονότα μετασχηματισμού. Η κύρια δράση της είναι η αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη

του ρετινοβλαστώματος, (pRB) και η διατήρηση των διαφοροποιημένων κυττάρων σε μια διαδικασία συνεχούς αντιγραφής [14].

Ο ογκοκαταστολέας pRB είναι ένα συστατικό-κλειδί στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Σε αδρανή κύτταρα ή σε κύτταρα κατά τη διάρκεια του πρώτου μέρους της φάσης G1, η pRB είναι προσδεσμένη στο μεταγραφικό παράγοντα E2F. Αυτό έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι καθοριστικής σημασίας για τη φάση S εξαρτάται από την ενεργότητα του E2F. Απομονώνοντας τον παράγοντα E2F, η RB διασφαλίζει τη μη μετάβαση στη φάση S. Δεύτερον, το σύμπλοκο E2F/RB καταστέλλει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων. Πλησιάζοντας στο σημείο περιορισμού, η RB φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες cdk4, 6-κυκλίνη D. Η φωσφορυλίωση προκαλεί την αποδέσμευση της RB από τον παράγοντα E2F, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων των οποίων η λειτουργία είναι απαραίτητη για τη φάση S, σταματώντας ταυτόχρονα την καταστολή των γονιδίων από το σύμπλοκο E2F/RB. Η E7 προσδένεται στην RB μέσω της περιοχής CR2 που αποτελεί τη μία από τις τρεις διατηρημένες περιοχές της. Η πρόσδεση αυτή έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση του παράγοντα E2F από την RB, επιτρέποντας του να δράσει ως μεταγραφικός ενεργοποιητής κυτταρικών γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA, αλλά και στη μετάβαση στη φάση S. Οι E7 των HPV χαμηλού κινδύνου αλληλεπιδρούν επίσης με την RB, αλλά με πολύ μικρότερη συγγένεια λόγω της παρόμοιας αλλά όχι ταυτόσημης αμινοξικής αλληλουχίας της CR2 περιοχής με αυτή των HPV υψηλού κινδύνου.



Εικόνα 1.4.6.1: Αλληλεπίδραση της E7 ογκοπρωτεΐνης με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB) και τον παράγοντα E2F. Κατά τη μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου η RB φωσφορυλιώνεται (ppRB) από κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, (Cdk) με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της. Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας E2F συνδέονται στην αποφωσφορυλιωμένη μορφή της

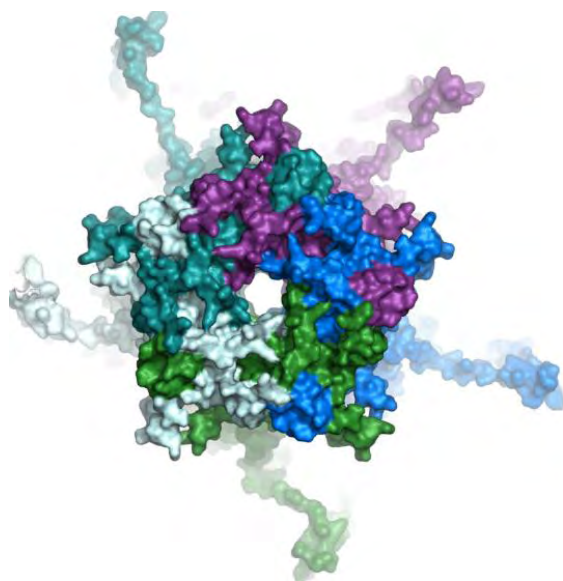
RB, (pRB) και η μεταγραφή γονιδίων καταστέλλεται. Η σύνδεση της E7 με το σύμπλοκο pRB/E2F οδηγεί στην αποδέσμευση του E2F, ο οποίος μπορεί να δράσει πλέον ως μεταγραφικός παράγοντας και να ενεργοποιήσει γονίδια που εμπλέκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου [1].

Η E7 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά επίσης με τους καταστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs), p21 και p27. Παρουσία της πρωτεΐνης, η δραστηριότητα των καταστολέων μειώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση στη δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και συγκεκριμένα της cdk2, αλλά και των κυκλινών E και A με τις οποίες αλληλεπιδρά. Ακολουθεί η ενισχυμένη φωσφορυλίωση της RB, διατηρώντας τα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα σε μια συνεχή φάση ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού [15].

Ένας ακόμη στόχος της E7 πρωτεΐνης είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Οι HDACs φυσιολογικά στρατολογούνται από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και καταστέλλουν τη μεταγραφή υποκινητών που επάγονται από τον παράγοντα E2F αφαιρώντας τις ακετυλομάδες από τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών με αποτέλεσμα την συμπίκνωση της χρωματίνης και την καταστολή της μεταγραφής. Παρουσία της E7, αυτή προσδένεται στην HDAC-1, παρεμποδίζοντας την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων της φάσης S και προκαλώντας τον συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αθανатоποίηση των κυττάρων [16].

1.4.7 Οι δομικές ιικές πρωτεΐνες L1 και L2

Η δομική L1 πρωτεΐνη έχει μέγεθος περίπου 55kD και αποτελεί το κύριο συστατικό των καψιδίων των HPV. Όπως προαναφέρθηκε κάθε ιικό καψίδιο διαθέτει εικοσαεδρική συμμετρία και σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση 72 πενταμερών που αποτελούνται από την L1. Στο εσωτερικό κάθε καψομερούς σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των κυστεϊνών των καρβοξυτελικών άκρων της L1, οι οποίοι φαίνεται ότι είναι απαραίτητοι για τη σταθερότητα των ιωσωματίων [17].



Εικόνα 1.4.7.1 : Πενταμερές της L1 [17].

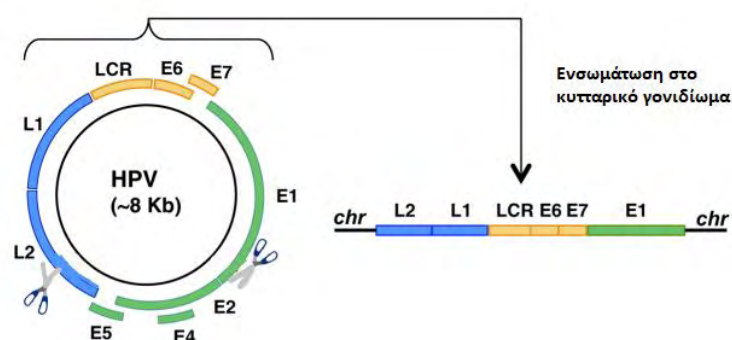
Η δομική L2 πρωτεΐνη έχει επίσης μέγεθος περίπου 55kD και αποτελεί μικρότερης σημασίας συστατικό των καψιδίων των HPV. Αν και ο αριθμός δεν είναι γνωστός, εκτιμάται ότι σε κάθε καψίδιο συμμετέχουν 72 L2 πρωτεΐνες. Έχει δειχθεί επίσης ότι στο καρβοξυτελικό άκρο της L2 υπάρχει μια θέση σύνδεσης της L1, καθώς και ότι ο δεσμός που αναπτύσσεται μεταξύ τους είναι μάλλον υδρόφοβος. Ο κύριος ρόλος της L2 φαίνεται να αφορά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή, καθώς αμέσως μετά την πρόσδεση του καψιδίου σε ειδικές πρωτεΐνες που υπάρχουν στην επιφάνεια της βασικής μεμβράνης πραγματοποιούνται δομικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση μέρους της L2 [18].

1.5 Μορφές του ιικού γονιδιώματος

Το ιικό γονιδίωμα του HPV μπορεί να βρίσκεται είτε σε επισωματική μορφή, είτε σε ενσωματωμένη στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, είτε σε μεικτή, δηλαδή και στις δύο μορφές. Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου ζωής του ιού, το γονιδίωμα του βρίσκεται σε μορφή επισώματος στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου σε περίπου 50-100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Για να προκύψει ο καρκινικός φαινότυπος η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων θα πρέπει να διατηρηθεί αυξημένη και στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, αυτή η υψηλή έκφραση προκαλείται εξαιτίας της ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος και της απώλειας της ικανότητας του να καταστείλει τα ογκογονίδια. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία του κύκλου ζωής του ιού, αλλά ένα «ατύχημα», καθώς συνοδεύεται με την απώλεια γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των ιικών καψιδίων [19].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι στην ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος συμβάλλουν οι βλάβες στο DNA, και κυρίως οι δίκλωνες βλάβες που προκαλούνται μετά από απώλεια του παράγοντα Ku70, έναν πολύ σημαντικό παράγοντα που συμμετέχει στην μη ομόλογη ένωση άκρων [20].

Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται κυρίως μέσω διάρρηξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις του γονιδίου E1. Τα ογκογονίδια E6 και E7 καθώς και η ρυθμιστική περιοχή LCR διατηρούνται πάντα ανέπαφα κατά την ενσωμάτωση. Τα E4 και E5 γονίδια συνήθως χάνονται, ενώ παράλληλα παρατηρείται έντονη αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην απώλεια του γονιδίου της E2, η οποία φυσιολογικά καταστέλλει την έκφραση των ογκογονιδίων [21].



Εικόνα 1.5.1: Η επισωμική και η ενσωματωμένη μορφή του ιού. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται κυρίως μέσω διάρρηξης της συνέχειας του γονιδίου E2 [22].

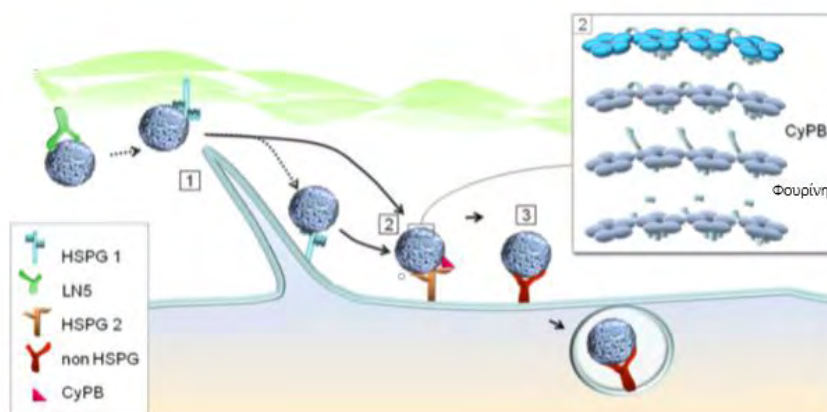
1.6 Κύκλος ζωής των HPVs

1.6.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απέκδυση

Για τη μόλυνση από τον HPV φαίνεται ότι απαιτείται η παρουσία ενός μικροτραυματισμού που θα επιτρέψει την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Στα κύτταρα αυτά το ιικό γονιδίωμα διατηρείται σε επισωμική μορφή και σε λίγα αντίγραφα. Καθώς τα κύτταρα διαιρούνται,

παράγονται τα θυγατρικά κύτταρα τα οποία «σπρώχνονται» προς την επιφάνεια του επιθηλίου. Στόχος του ιού είναι να ενεργοποιήσει τον κυτταρικό κύκλο στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, τα οποία φυσιολογικά δεν αντιγράφονται, έτσι ώστε να πολλαπλασιάσει το γονιδίωμα του και να το πακετάρει στα μολυσματικά ιοσωμάτια. Μέσω των E5, E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών του μπορεί να απορρυθμίζει τον φυσιολογικό κύκλο ζωής των κυττάρων και να αποτρέπει την απόπτωση τους. Οι υψηλού κινδύνου HPVs μπορούν επίσης να προκαλούν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της βασικής στιβάδας του επιθηλίου, προκαλώντας νεοπλασίες [3].

Η φύση του υποδοχέα στον οποίο προσδένεται ο ιός για να εισέλθει στο κύτταρο δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, ωστόσο είναι γενικά αποδεκτό ότι το καψίδιο του ιού συνδέεται στη βασική μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης της L1 δομικής πρωτεΐνης με πρωτεΐνες που περιέχουν θειική ηπαρίνη (HSPGs). Επιπλέον, έχει ενεχοποιηθεί η εμπλοκή ενός δευτερεύοντος υποδοχέα, καθώς και της L2 δομικής πρωτεΐνης. Ένα πιθανό μοντέλο είναι ότι η αλληλεπίδραση του καψιδίου του ιού με την HSPG προκαλεί δομικές αλλαγές στο πρώτο με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας υψηλά διατηρημένης θέσης αποκοπής από την φουρίνη. Μετά την αποκοπή πραγματοποιούνται περαιτέρω δομικές αλλαγές που είτε οδηγούν στην εμφάνιση μιας περιοχής πρόσδεσης με το δευτερεύοντα υποδοχέα, είτε μειώνουν τη συγγένεια για τον πρώτο υποδοχέα. Η σύνδεση του ιού με τον δεύτερο υποδοχέα φαίνεται να απαιτείται για την ενδοκύτωση του [23].



Εικόνα 1.6.1.1: Πιθανό μοντέλο αλληλεπίδρασης του HPV με τον υποδοχέα του. Οι περισσότεροι HPV συνδέονται στον υποδοχέα HSPG1 που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, με εξαίρεση τον HPV11, ο οποίος έχει δειχθεί ότι συνδέεται στην λαμινίνη 5(LN5). Φαίνεται επίσης ότι το κυτταρικό CyPB επάγει δομικές αλλαγές στην L2 [4].

Τέλος, έχει προταθεί ότι η απέκδυση του ιού πραγματοποιείται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια, πριν τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα, κατά τη

διάρκεια της οποίας η L1 πρωτεΐνη απομακρύνεται πλήρως από το καψίδιο, ενώ η L2 βοηθά στην έξοδο του ιού από τα ενδοσώματα [4].

1.6.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Όλοι οι HPVs διαθέτουν έναν παρόμοιο κύκλο ζωής, ο οποίος συνδέεται στενά με τη διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων του επιθηλίου. Σε ένα φυσιολογικό επιθήλιο, μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται στο κατώτερο στρώμα της βασικής στιβάδας είναι μιτωτικά ενεργά και είναι αυτά που εισέρχεται πρώτα ο ιός. Αμέσως μετά τη μεταφορά του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα, αυτό πολλαπλασιάζεται, καταλήγοντας στη δημιουργία 50 με 100 αντιγράφων ανά κύτταρο. Αυτή η φάση, είναι η φάση της εγκαθίδρυσης, στην οποία εγκαθιδρύεται η μόλυνση από τον ιό. Ακολουθεί η φάση της διατήρησης, όπου το γονιδίωμα αντιγράφεται και διατηρείται σε έναν σταθερό αριθμό αντιγράφων στα μιτωτικά ενεργά κύτταρα [24].

Υπάρχουν δύο τρόποι που μπορούν να οδηγήσουν στη διατήρηση του αριθμού αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος. Σύμφωνα με τον πρώτο, το DNA του ιού αντιγράφεται μόνο κατά την S φάση, όπως ακριβώς και το κυτταρικό DNA. Σύμφωνα με τον δεύτερο τρόπο, το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται τυχαία, κάποια μόρια DNA αντιγράφονται μερικές φορές κατά την S φάση, κάποια μία μόνο φορά, ενώ κάποια δεν αντιγράφονται καθόλου. Και οι δύο τρόποι, μπορούν θεωρητικά να διατηρήσουν το ιικό DNA σε έναν συγκεκριμένο αριθμό αντιγράφων ανά κύτταρο κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού του κυττάρου-ξενιστή [25]. Η τελευταία φάση, αυτή της αντιγραφής, πραγματοποιείται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν και χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία εκατοντάδων έως και χιλιάδων αντιγράφων του γονιδιώματος, τα οποία τελικά θα πακεταριστούν στα νέα ιικά καψίδια [24].

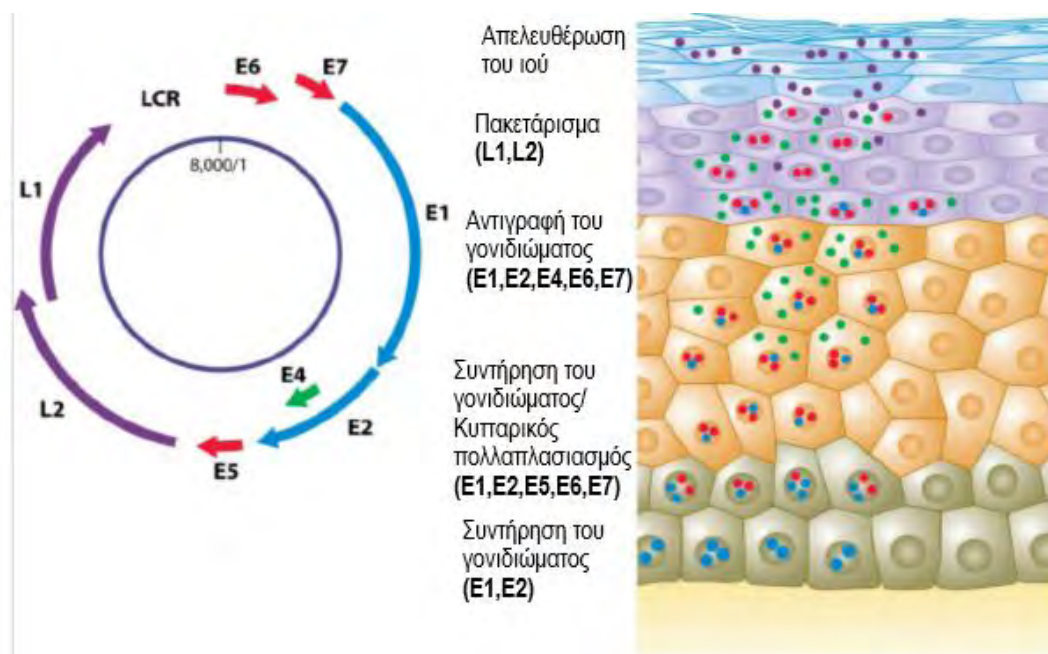
1.6.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Η μεταγραφή των HPVs είναι πολύπλοκη εξαιτίας της παρουσίας πολλαπλών εκκινητών καθώς και των πολλαπλών μοτίβων ματίσματος και πραγματοποιείται μόνο από τον έναν κλώνο του κυκλικού DNA. Επίσης, σχετίζεται στενά με το στάδιο διαφοροποίησης των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων, την κυτταρική μεταγραφή, το μάτισμα και με άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην επεξεργασία του RNA. Συγκεκριμένα, η LCR περιοχή του γονιδιώματος των ιών περιέχει στοιχεία ενισχυτών που αποκρίνονται τόσο σε κυτταρικούς παράγοντες, όσο και σε ιικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της μεταγραφής. Η LCR του HPV16 περιέχει εκτός άλλων, θέσεις πρόσδεσης για τις E2 ρυθμιστικές πρωτεΐνες, καθώς και την θέση έναρξης της αντιγραφής, στην οποία προσδένονται οι E1 ιικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία της αντιγραφής [1].

Όπως έχει προαναφερθεί οι HPVs διαθέτουν δύο υποκινητές που ρυθμίζουν την μεταγραφή του γονιδιώματος τους, έναν πρώιμο και έναν όψιμο. Για τον HPV16, ο πρώιμος υποκινητής είναι ο p97, εντοπίζεται στην LCR περιοχή και είναι ενεργός καθόλη τη διάρκεια του κύκλου αντιγραφής του ιού. Περιέχει 4 θέσεις πρόσδεσης για την E2 πρωτεΐνη και σε μια απλή μόλυνση καταστέλλεται από την E2 προκείμενου η έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών να διατηρηθεί σε χαμηλά επίπεδα. Ο όψιμος υποκινητής είναι ο p670, εντοπίζεται στο E7 ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή των όψιμων γονιδίων και κατά συνέπεια την παραγωγή των L1 και L2 πρωτεϊνών κατά τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων [26].

1.6.4 Συναρμολόγηση του καψιδίου και απελευθέρωση

Η ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του HPV περιλαμβάνει την έκφραση της L2 πρωτεΐνης, την έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και την έκφραση της L1 πρωτεΐνης για το πακετάρισμα του γονιδιώματος. Η διαδικασία της καψιδίωσης του γονιδιώματος περιλαμβάνει την στρατολόγηση της L2 πρωτεΐνης από την E2 σε περιοχές αντιγραφής και τη συναρμολόγηση του εικοσαεδρικού καψιδίου στον πυρήνα. Η ωρίμανση του ιού πραγματοποιείται στα επιφανειακά κερατινοκύτταρα. Στα κύτταρα αυτά τα αυξημένα επίπεδα της E4 πρωτεΐνης φαίνεται να συμβάλλουν στην απελευθέρωση του ιού, καθώς διαταράσσεται η σταθερότητα της πλασματικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων [3].



Εικόνα 1.6.1: Τα στάδια του κύκλου ζωής του ιού.

1.7 Κλινικά συμπτώματα- Ιστολογικές αλλοιώσεις

Οι HPVs εμφανίζουν διαφορετικούς επιθηλιακούς τροπισμούς και βάσει αυτών μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες. Μπορούν να προσβάλουν είτε το δερματικό επιθήλιο των γεννητικών οργάνων, είτε το βλεννογόνο. Μεταξύ των ασθενειών συμπεριλαμβάνονται τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο. Οι HPVs υψηλού κινδύνου μπορούν επίσης να προκαλέσουν δυσπλασίες και ενδοθηλιακές νεοπλασίες, μέχρι και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αντίθετα, οι HPVs χαμηλού κινδύνου τις περισσότερες φορές προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθεις αλλοιώσεις [3].

Αλλαγές στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας που μπορούν να εντοπιστούν με τεστ Παπανικολάου μπορούν να υποδηλώσουν μόλυνση από HPV. Κυτταρολογικές αλλαγές στο επιθήλιο ονομάζονται αλλοιώσεις του τραχηλικού ενδοθηλίου (SILs) και χαρακτηρίζονται ως χαμηλού ή υψηλού κινδύνου. Οι ιστολογικές αλλαγές ονομάζονται νεοπλασίες του τραχηλικού ενδοθηλίου (CINs) και ταξινομούνται ως CIN1, CIN2, CIN3 ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που έχουν υποστεί αλλοίωση. Στη δυσπλασία CIN1 παρατηρούνται κονδυλώματα και οι αλλοιώσεις αφορούν το 1/3 περίπου του επιθηλίου. Στη δυσπλασία CIN2, οι αλλοιώσεις αφορούν τα 2/3 του επιθηλίου, ενώ η δυσπλασία CIN3 περιλαμβάνει σοβαρή δυσπλασία και εμφάνιση καρκινώματος *in situ* και όλο το επιθήλιο έχει υποστεί αλλοιώσεις [27].

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού HPV16 σε δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων μέσω χρήσης μίας νέας ισοθερμικής τεχνικής Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 20 θετικά κλινικά δείγματα για τον HPV16, καθώς και 20 αρνητικά προερχόμενα από διαφορετικά νοσοκομεία της Ελλάδας. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep και διατηρημένα στους -20 °C. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνολικά τα 40 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Ονομασία δείγματος	Κλινική εικόνα για τον HPV16
ATT5	θετικό
ATT10	θετικό
Δ61	θετικό
Δ16	θετικό
LG 1759 14	θετικό
LG 212 15	θετικό
HG 153 15	θετικό
HG 2420 14	θετικό
10732 14	θετικό
LG 2095 14	θετικό
LG 105 15	θετικό
HG 626 14	θετικό
HG 158 15	θετικό
HG 532 15	θετικό
10657 14	θετικό
10715 14	θετικό
10720 14	θετικό
9969 14	θετικό
10658 14	θετικό
9983 14	θετικό
WNL 1955 14	αρνητικό
WNL 1959 14	αρνητικό
WNL 1026 14	αρνητικό
WNL 911 14	αρνητικό
9971 14	αρνητικό
9980 14	αρνητικό
9982 14	αρνητικό
9988 14	αρνητικό
9989 14	αρνητικό
s189 17	αρνητικό
s191 17	αρνητικό
s207 17	αρνητικό
9997 14	αρνητικό
10005 14	αρνητικό
10006 14	Αρνητικό

10015 14	Αρνητικό
10016 14	Αρνητικό
10017 14	Αρνητικό
10028 14	Αρνητικό
10033 14	Αρνητικό
10037 14	Αρνητικό

3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Για την απομόνωση του DNA των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), η οποία έχει τη δυνατότητα απενεργοποίησης νουκλεασών σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [28].

Σε erppendorfs των 2ml προστίθενται 10μl γλυκογόνου που έχει ψυχθεί στους -20 °C, 300μl Lysis Buffer που περιέχει την GuSCN και 100μl από το δείγμα. Πραγματοποιείται Vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά προκειμένου να δημιουργηθεί το σύμπλοκο. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης που έχει ψυχθεί στους -20 °C, πραγματοποιείται vortex και επώαση για 20 λεπτά στην κατάψυξη. Η χαμηλή θερμοκρασία απαιτείται προκειμένου να σταθεροποιηθεί το σύμπλοκο, καθώς όσο πιο χαμηλή η θερμοκρασία, τόσο περισσότερο αυξάνεται η διηλεκτρική σταθερά και άρα ασκούνται μεγαλύτερες δυνάμεις. Η ισοπροπανόλη επίσης χρησιμοποιείται για να αυξηθεί η διηλεκτρική σταθερά, ε. Μετά το πέρας των 20 λεπτών πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, προστίθενται 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%, γίνεται vortex και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 10min. Η χρησιμότητα της 70% αιθανόλης είναι ότι μπορεί να χαλαρώνει τους δεσμούς ανάμεσα στο γλυκογόνο και το DNA, καθώς το γλυκογόνο είναι αδιάλυτο στις αλκοόλες αλλά διαλυτό στο νερό και η 70% αιθανόλη είναι αραιωμένη με νερό. Το τελευταίο στάδιο της εκχύλισης περιλαμβάνει και πάλι την προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου προκειμένου να παραμείνει όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα αιθανόλης στο Erppendorf και η προσθήκη 100μl ddH₂O. Το δείγμα αναδεύεται ισχυρά για μια τελευταία φορά και αποθηκεύεται στους -20 °C.

3.3 PCR στα κλινικά δείγματα

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα δείγματα ήταν θετικά για τον HPV16, αλλά και για να γίνει ταυτόχρονα έλεγχος αν η διαδικασία απομόνωσης του DNA ήταν επιτυχής, διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα δύο PCR, μία για την ενίσχυση του γονιδίου E6 και μία για την ενίσχυση του γονιδίου L1. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος προϊόντος
<u>HPV16 L1F</u>	5'-CAC TAT TTT GGA GGA CTG GAA T -3'	291bp
<u>HPV16 L1R</u>	5'- GAT GAG GTG GTG GGT GTA GC -3'	
<u>DHPV16F3</u>	5'- ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC -3'	186bp
<u>DHPV16B3</u>	5'- ACA GCA TAT GGA TTC CCA TCT C -3'	

Η PCR για το γονίδιο L1 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Eppendorf) στις ακόλουθες συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 min, για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 58 °C για 30 sec, επέκταση στους 72 °C για 1 min. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 5 min.

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl, 45μl από το μείγμα της αντίδρασης και 5μl από το δείγμα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε: 1mM dNTPs, 2mM MgCl₂, Dream Taq Buffer 1X (Thermo Scientific™), 25pmol από τον εκκινητή HPV16L1F, 25Pmol από τον εκκινητή HPV16L1R, DreamTaq 1,25U (Thermo Scientific™) και 35,75μl ddH₂O.

Η PCR για το γονίδιο E6 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Eppendorf) στις ακόλουθες συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 min, για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 50 °C για 30 sec, επέκταση στους 72 °C για 1 min. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl, 45μl από το μείγμα της αντίδρασης και 5μl από το δείγμα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε: 1mM dNTPs, 2mM MgCl₂, Dream Taq Buffer 1X (Thermo Scientific™), 25pmol από τον εκκινητή HPV16DF3, 25Pmol από τον εκκινητή HPV16DB3, DreamTaq 1,5U (Thermo Scientific™) και 33,7μl ddH₂O.

Η ταυτοποίηση των θετικών και αρνητικών για HPV-16 δειγμάτων έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.4 Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Η LAMP αποτελεί μια ιδιαίτερα γρήγορη, απλή και ειδική μέθοδο ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος. Η απλότητα και η εξειδίκευση της μεθόδου οφείλεται κυρίως στο ότι είναι ισόθερμη τεχνική καθώς και στη χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι περιοχές του γονιδίου-στόχου. Διαθέτει επίσης υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται 10^9 φορές σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας την πολυμεράση Bst, η οποία έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Για το λόγο αυτό δεν απαιτείται η ύπαρξη της θερμοκρασίας αποδιάταξης του δίκλωνου DNA κατά την αντίδραση, καθώς εκμεταλλεύεται την ενεργότητα εκτόπισης κλώνου του ενζύμου [29].

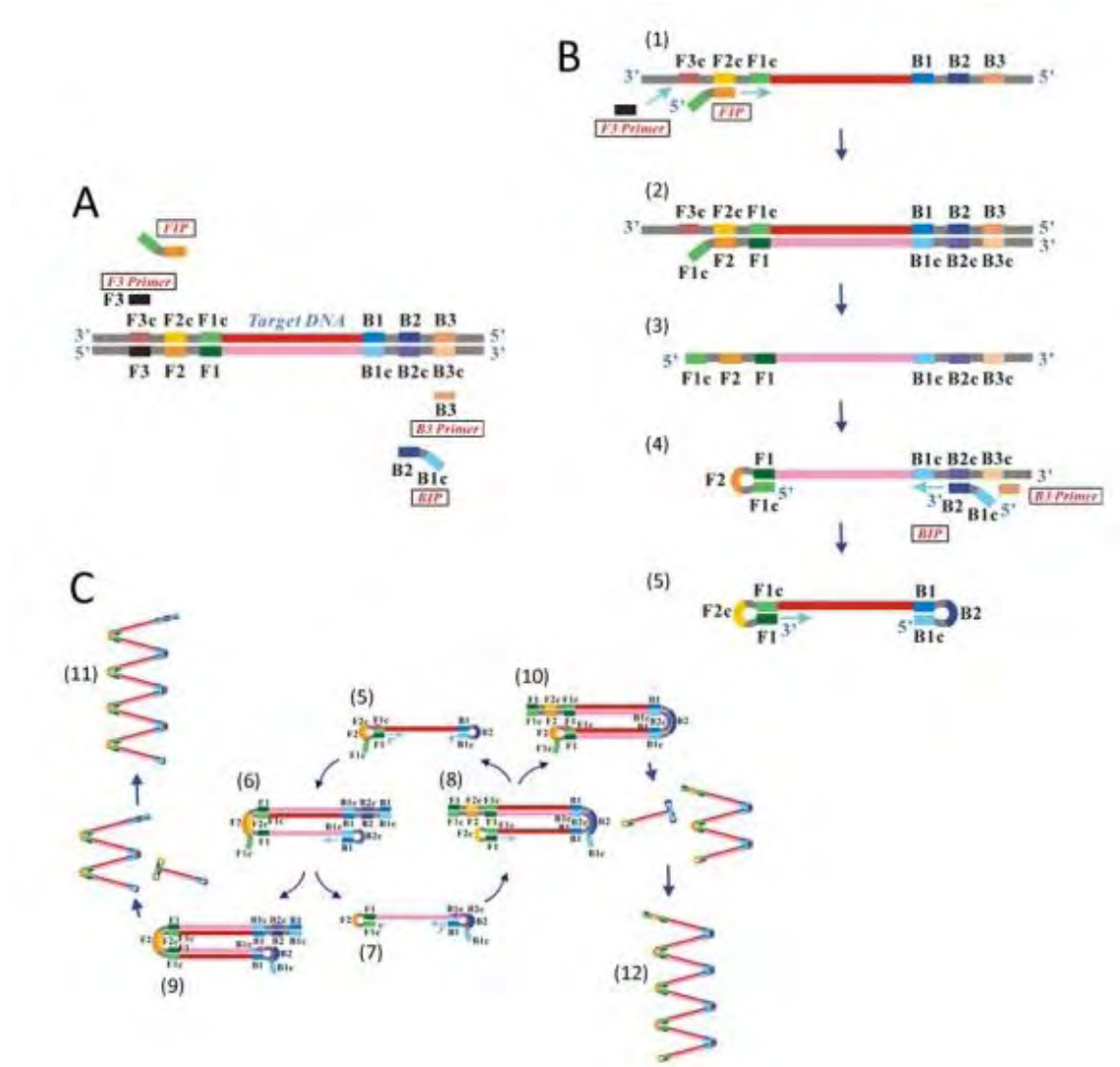
Εκκινητής	Αλληλουχία
DHPV16F3	5'- ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC -3'
DHPV16B3	5'- ACA GCA TAT GGA TTC CCA TCT C -3'
DHPV16FIP	5'- TGT TTG CAG CTC TGT GCA TAA GTT TCA GGA CCC ACA GGA -3'
DHPV16BIP	5'- AGA ATG TGT GTA CTG CAA GCA AAT CCC GAA AAG CAA AGT CAT -3'

3.4.1 Δομή των εκκινητών και μηχανισμός της αντίδρασης

- Ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής (FIP) αποτελείται από την περιοχή F2 στο 3' άκρο του και από την F1c στο 5' άκρο του'.
- Ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής (BIP) αποτελείται από την περιοχή B2 στο 3' άκρο του και από την B1c στο 5' άκρο του.
- Οι εξωτερικοί εκκινητές F3, B3 είναι συμπληρωματικοί με τις περιοχές F3c, B3c αντίστοιχα.

Αρχικά ο FIP προσδένεται στην περιοχή F2c του γονιδίου στόχου και μέσω της πολυμεράσης πραγματοποιείται η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Ο F3 προσδένεται στη συνέχεια στην περιοχή F3c, εξωτερικά από τον FIP και χρησιμοποιώντας την ενεργότητα εκτόπισης κλώνου η DNA πολυμεράση ξεκινά και πάλι τη σύνθεση του νέου κλώνου εκτοπίζοντας παράλληλα το τμήμα που είχε παραχθεί προηγουμένως. Το τμήμα που εκτοπίστηκε παραμένει μονόκλωνο και σχηματίζει στο άκρο του μια δομή στελέχους-θηλιάς καθώς οι περιοχές F1 και F1c είναι συμπληρωματικές. Στο τμήμα αυτό τώρα προσδένεται ο BIP, πραγματοποιείται σύνθεση του DNA, και στη συνέχεια προσδένεται εξωτερικά του

BIP, ο B3 με αποτέλεσμα την εκτόπιση και πάλι του τμήματος που είχε συντεθεί προηγουμένως και την παραγωγή ενός δίκλωνου DNA. Το τμήμα που εκτοπίστηκε τις δύο φορές περιέχει πλέον στα άκρα του συμπληρωματικές αλληλουχίες και σχηματίζει δομές στελέχους θηλιάς, αποτελώντας την βασική δομή που ενισχύεται σε μια LAMP αντίδραση. Μετά τη δημιουργία της βασικής θηλιάς προκύπτουν πολλές και διαφορετικές δομές από την ενίσχυση της πρώτης και χρησιμοποιούνται μόνο οι εσωτερικοί εκκινητές [30].



Εικόνα 3.4.1.1: Ο μηχανισμός της αντίδρασης LAMP. Α) Ο υβριδισμός των τεσσάρων εκκινητών στο γονίδιο-στόχο, Β) Η δημιουργία της βασικής δομής θηλιάς, C) Οι διαφορετικές δομές που παράγονται κατά την ενίσχυση της βασικής δομής θηλιάς.
Πηγή: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

3.4.2 Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP

Στη συγκεκριμένη εργασία ενισχύθηκε τμήμα του E6 γονιδίου του HPV16 και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι DHPV16F3, DHPV16B3, DHPV16FIP,

DHPV16BIP. Για τον σχεδιασμό τους έγινε χρήση του προγράμματος Primer Explorer V5. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Εκκινητής	Αλληλουχία
DHPV16F3	5'- ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC -3'
DHPV16B3	5'- ACA GCA TAT GGA TTC CCA TCT C -3'
DHPV16FIP	5'- TGT TTG CAG CTC TGT GCA TAA GTT TCA GGA CCC ACA GGA -3'
DHPV16BIP	5'- AGA ATG TGT GTA CTG CAA GCA AAT CCC GAA AAG CAA AGT CAT -3'

3.4.3 Colorimetric LAMP

Η colorimetric LAMP αποτελεί παραλλαγή της απλής LAMP, κατά την οποία η οπτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε πολύ σύντομο χρόνο, με την αλλαγή χρώματος στα μικροσωληνάρια σε περίπτωση που τα δείγματα είναι θετικά. Παραλείπεται έτσι, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της LAMP εξοικονομώντας χρόνο και κόστος. Η διαφορά 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 πυροφοσφορικών ιόντων, ως παραπροϊόντα της αντίδρασης της DNA πολυμεράσης με τα DNTPs [31]. Έτσι, όταν ένα δείγμα είναι θετικό γίνεται κίτρινο, ενώ όταν είναι αρνητικό, παραμένει ροζ.
<https://www.neb.com/products/m1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Legal%20Information>

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), 0,2pmol από τον εκκινητή DHPV16F3, 0,2pmol από τον εκκινητή DHPV16B3, 0,8pmol από τον εκκινητή DHPV16FIP, 0,8pmol από τον εκκινητή DHPV16BIP και 7,7μl ddH₂O. Το WarmStart Color Mix 1X περιέχει: το buffer της αντίδρασης χαμηλής περιεκτικότητας σε Tris μαζί με όλους τους απαραίτητους συμπαραγόντες, την DNA πολυμεράση Bst 2.0, 8mM MgSO₄ και τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης (Phenol red).

Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Primus 25/96) στους 65 °C για 60 λεπτά. Ορισμένα κλινικά δείγματα που δεν έδωσαν καθαρό κίτρινο χρώμα επωάστηκαν στους 65 °C για επιπλέον 20 λεπτά.

3.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και της colorimetric LAMP

Προκειμένου να γίνει οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα

αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο με σκοπό τη δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA. 10 μl από κάθε προϊόν της αντίδρασης PCR αναμίχθηκαν με 1,5-2 μl χρωστικής ουσίας και «φορτώθηκαν» σε ειδικές θέσεις, «πηγαδάκια» στο πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 120V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων ως φωτεινές μπάντες στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne), ενώ το μέγεθος των τμημάτων που ενισχύθηκαν εξακριβώθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen UK).

Προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της colorimetric LAMP, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X και πραγματοποιήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με την παραπάνω.

3.6 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης

Το επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση ενός προϊόντος της PCR, προκειμένου να ακολουθήσει η μοριακή κλωνοποίηση. Επιλέχθηκε το προϊόν που εμφάνιζε έντονη «μπάντα» στο πήκτωμα αγαρόζης και αυτό προέρχονταν από το δείγμα LG 212-15. Η απομόνωση του προϊόντος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Ακολούθησε και πάλι ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μέρους του προϊόντος που ανακτήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί αν έγινε σωστά ο καθαρισμός.

3.7 Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR

Για την επιτυχή κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR πραγματοποιήθηκαν τα εξής στάδια: α) αντίδραση τοποϊσομεράσης, β) μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, γ) Colony PCR, δ) δημιουργία υγρών καλλιεργειών, ε) απομόνωση πλασμιδιακού DNA και στ) πέψη με EcoRI.

α) Αντίδραση τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning): Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος στον φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή το πλασμίδιο. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl φορέα, 1μl Salt solution, 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Αρχικά, μεταφέρονται 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια προστίθεται ολόκληρη η ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και γίνεται ήπια ανάδευση. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η προσθήκη 800μl LB Broth και η επώαση στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 min στις 8000 rpm, αφαιρούνται 700μl από το υπερκείμενο και επαναδιαλύονται τα 300μl που έχουν μείνει. Έπειτα, επιστρώνουμε 100μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Αφού προστεθούν 12μl X-Gal ακολουθεί ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37 °C.

γ) Colony PCR: Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως ένα επιπλέον βήμα για την επαλήθευση της ένθεσης στον φορέα. Συγκεκριμένα, επιλέγουμε 2 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και δημιουργούμε εναιώρημα σε 15 μl ddH₂O για την κάθε αποικία. Έπειτα μεταφέρουμε 3 μl του εναιωρήματος σε PCR tubes και πραγματοποιείται λύση των βακτηρίων με θέρμανση στους 95 °C για 10 min, τοποθέτηση στον πάγο για μερικά δευτερόλεπτα, ώστε να σταματήσει η αντίδραση και spin down. Στη συνέχεια προστίθενται 22μl από το MasterMix και πραγματοποιείται PCR. Το MasterMix περιέχει το ζεύγος εκκινήτων (HPV16 DF3-HPV16 DB3) σε συγκέντρωση 25pmol, 1 mM dNTPs, 1,25U θερμοανθεκτικής DreamTaq και DreamTaq Buffer 1X μέσα στο οποίο περιέχονται 2mM MgCl₂.

Η Colony PCR πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή (Eppendorf) στις ακόλουθες συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3 min, για 25 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec, υβριδοποίηση στους 55 °C για 30 sec, επέκταση στους 72 °C για 1 min. Τέλος, ακολούθησε μια τελική επέκταση στους 72 °C για 1 min.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης 2% .

δ) Δημιουργία υγρών καλλιεργειών: Μετά την ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C, συλλέχθηκαν 2 λευκές αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό και τοποθέτηση των καλλιεργειών στους 4 °C.

ε) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA: Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany)

στ) Πέψη με EcoRI: Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA. Οι θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος, αναμένεται να δούμε μία ειδική ζώνη στο μέγεθος του ενθέματος και άλλη μία μεγαλύτερη που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και το μείγμα αυτής αποτελείται από 2μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 0,8μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI και 15,2μl ddH₂O. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3-5μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση.

3.8 Διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις πλασμιδίων

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία ήταν η δημιουργία διαδοχικών υποδεκαπλάσιων αραιώσεων πλασμιδίων για κατασκευή αργότερα πρότυπης καμπύλης μέσω Real time PCR. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 500μl και ξεκίνησαν από το 10^{-2} , ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης. Έτσι, από το αρχικό διάλυμα του πλασμιδίου ελήφθησαν 5μl και τοποθετήθηκαν σε 495μl ddH₂O και έγινε ισχυρή ανάδευση. Από την αραιώση αυτή, ελήφθησαν στη συνέχεια 50μl και τοποθετήθηκαν σε 450μl ddH₂O. Η αραιώση αυτή ήταν η 10^{-3} . Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 8 φορές, έως ότου πραγματοποιηθεί και η αραιώση 10^{-11} .

3.9 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός της δημιουργίας των διαδοχικών υποδεκαπλάσιων αραιώσεων των πλασμιδίων ήταν η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό των αντιγράφων. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR-Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl, εκ των οποίων τα 17μl ανήκαν στο μείγμα της αντίδρασης και τα 3μl στο πλασμιδιακό DNA. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε τα εξής: 5pmol από κάθε εκκινητή (HPV16 DF3- HPV16 DB3), 2X MasterMix και 6,8μl H₂O (Nuclease Free).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ειδικό μηχάνημα MxPro 3005P, στις ακόλουθες συνθήκες: Αρχικά, στους 50 °C για 2 min και στη συνέχεια στους 95 °C για άλλα 2 min, για 40 κύκλους πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη στους 95 °C για 15 sec, υβριδοποίηση στους 60 °C για 1 min. Τέλος, ακολούθησε Melt Curve Analysis μεταξύ των 55 °C- 95°C.

4. Αποτελέσματα

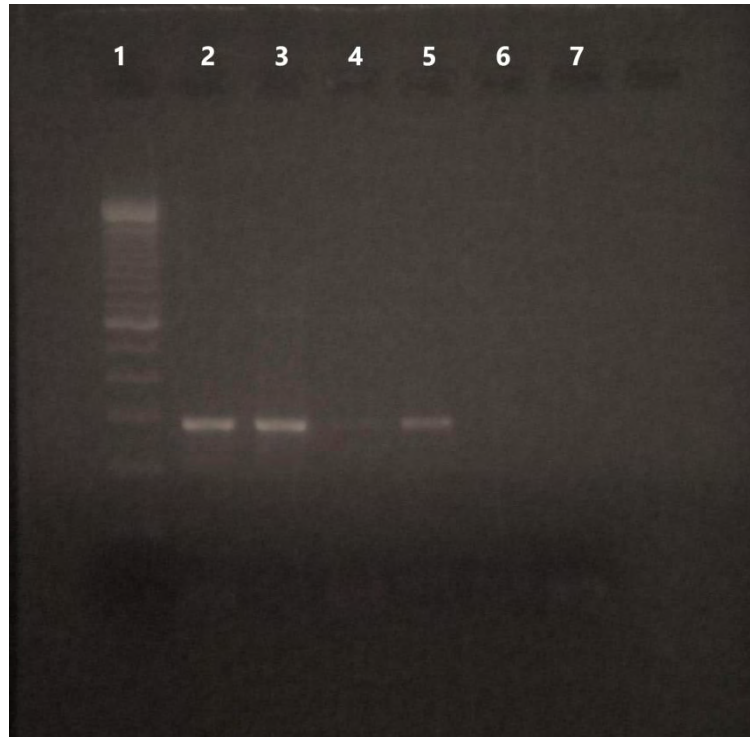
4.1 PCR στα E6 και L1 γονίδια

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο E6 σε πέντε κλινικά δείγματα. Όπως φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 186bp.



Εικόνα 4.1.1: Ηλεκτροφόρηση μετά από PCR για το E6 σε κλινικά δείγματα. Στήλες 2-6: Θετικά κλινικά δείγματα, στήλη 7: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley,UK)

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο L1 σε πέντε κλινικά δείγματα. Όπως φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 291bp.



Εικόνα 4.1.2: Ηλεκτροφόρηση μετά από PCR για το L1 σε κλινικά δείγματα. Στήλες 2-5: Θετικά κλινικά δείγματα, στήλη 6: Αρνητικό κλινικό δείγμα, στήλη 7: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley,UK)

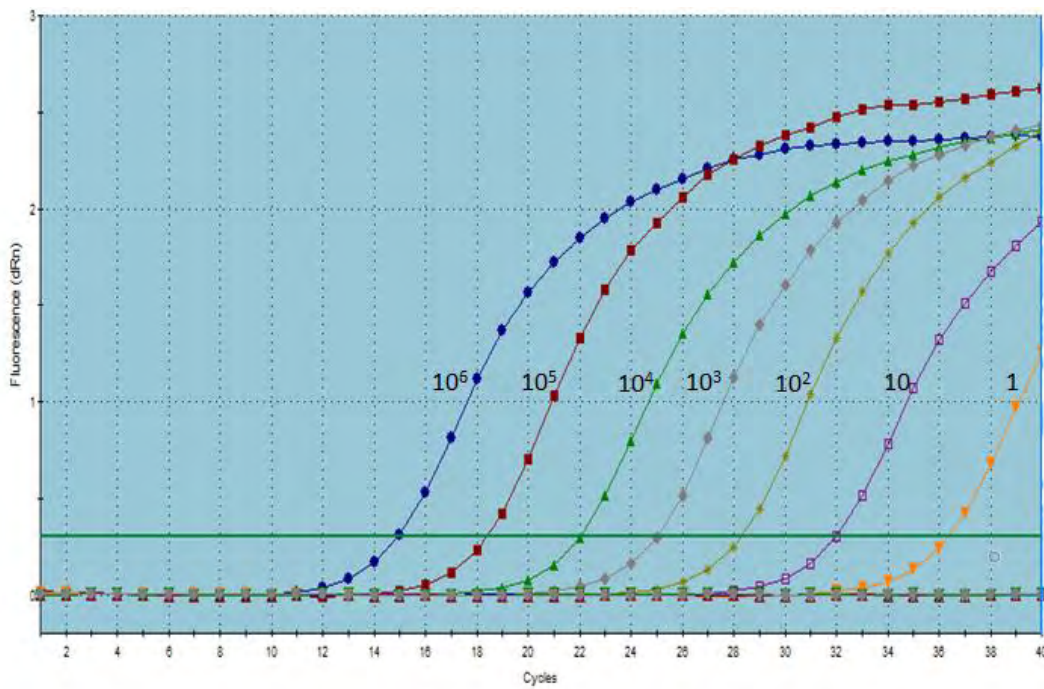
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της PCR για τα γονίδια E6 και L1 στα 40 κλινικά δείγματα που μελετήθηκαν.

ΔΕΙΓΜΑ	PCR στο γονίδιο E6	PCR στο γονίδιο L1
ATT5	θετικό	θετικό
ATT10	θετικό	θετικό
Δ61	θετικό	θετικό
Δ16	θετικό	θετικό
LG 1759 14	θετικό	θετικό
LG 212 15	θετικό	θετικό
HG 153 15	θετικό	θετικό
HG 2420 14	θετικό	θετικό
10732 14	θετικό	θετικό
LG 2095 14	θετικό	θετικό

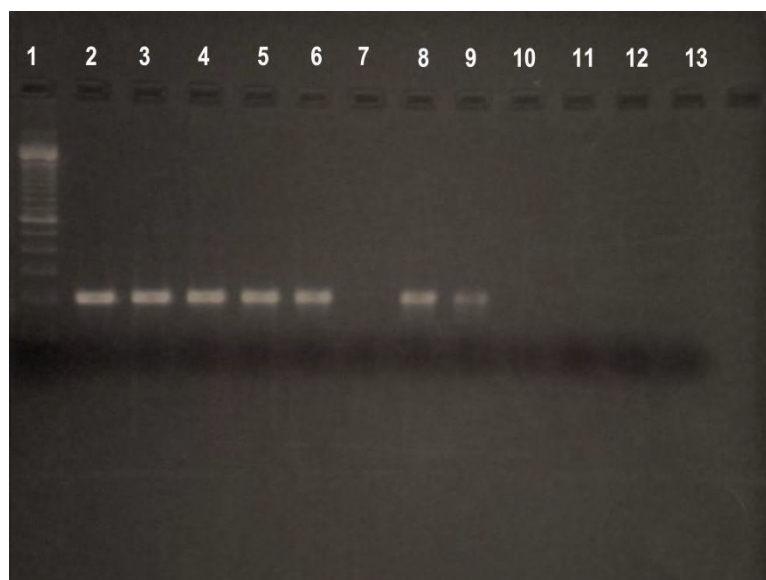
LG 105 15	θετικό	θετικό
HG 626 14	θετικό	θετικό
HG 158 15	θετικό	θετικό
HG 532 15	θετικό	θετικό
10657 14	θετικό	θετικό
10715 14	θετικό	θετικό
10720 14	θετικό	θετικό
9969 14	θετικό	θετικό
10658 14	θετικό	θετικό
9983 14	θετικό	θετικό
WNL 1955 14	αρνητικό	αρνητικό
WNL 1959 14	αρνητικό	αρνητικό
WNL 1026 14	αρνητικό	αρνητικό
WNL 911 14	αρνητικό	αρνητικό
9971 14	αρνητικό	αρνητικό
9980 14	αρνητικό	αρνητικό
9982 14	αρνητικό	αρνητικό
9988 14	αρνητικό	αρνητικό
9989 14	αρνητικό	αρνητικό
s189 17	αρνητικό	αρνητικό
s191 17	αρνητικό	αρνητικό
s207 17	αρνητικό	αρνητικό
9997 14	αρνητικό	αρνητικό
10005 14	αρνητικό	αρνητικό
10006 14	αρνητικό	αρνητικό
10015 14	αρνητικό	αρνητικό
10016 14	αρνητικό	αρνητικό
10017 14	αρνητικό	αρνητικό
10028 14	αρνητικό	αρνητικό
10033 14	αρνητικό	αρνητικό
10037 14	αρνητικό	αρνητικό

4.2 Real Time PCR στις αραιώσεις πλασμιδίων

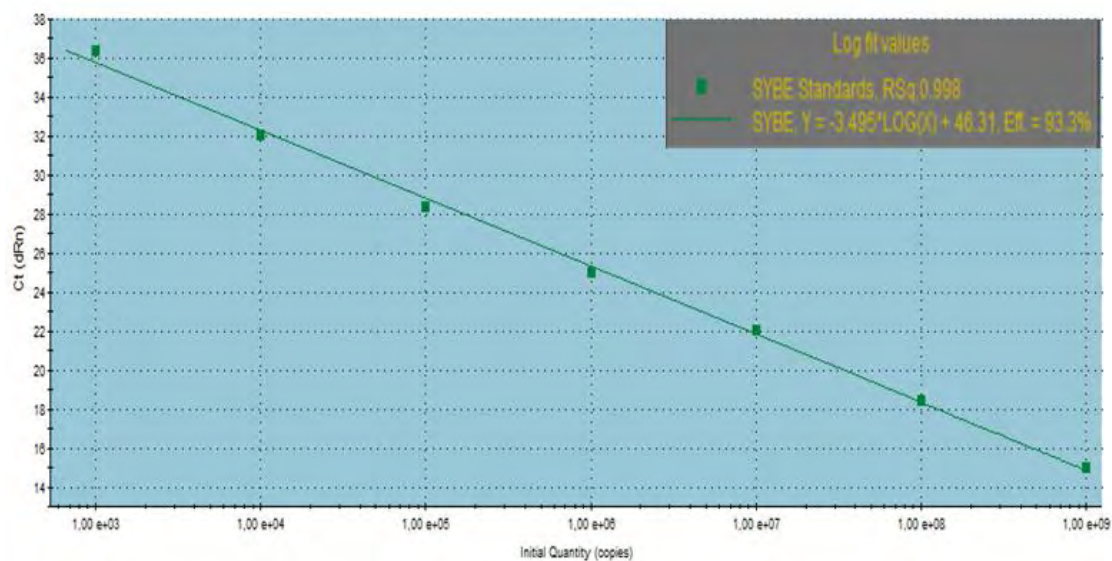
Όπως προαναφέρθηκε η Real Time PCR πραγματοποιήθηκε προκειμένου να βρεθεί η αραιώση των πλασμιδίων που αντιστοιχεί στο ένα αντίγραφο και να σχεδιαστεί στη συνέχεια η πρότυπη καμπύλη. Με βάση το amplification plot προέκυψε ότι η αραιώση 10^{-9} αποτελεί το ένα αντίγραφο, η 10^{-8} τα 10 αντίγραφα, κ.ο.κ



Εικόνα 4.2.1: Amplification plot. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων. Οι αριθμοί στις καμπύλες αντιστοιχούν στα αντίγραφα των πλασμιδίων.



Εικόνα 4.2.2: Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων με ηλεκτροφόρηση. Στήλες 2-6: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 αντίγραφα αντίστοιχα, στήλες 8-12: 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 αντίγραφα, αντίστοιχα, στήλες 7 και 13: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley,UK)



Εικόνα 4.2.3: Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) που προέκυψε μετά την Real Time PCR στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων από 1 έως 10^6 αντίγραφα.

4.3 Έλεγχος ευαισθησίας της colorimetric LAMP

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων από το 1 έως τα 10^5 αντίγραφα. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, η ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στα 10 αντίγραφα, καθώς αποτελεί την χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος.

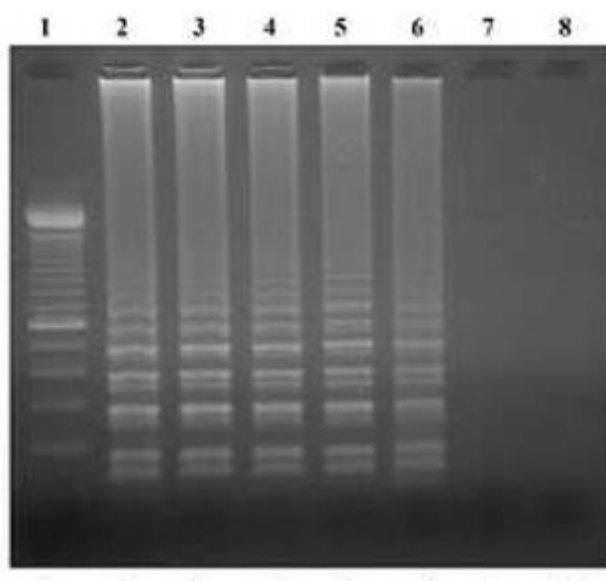


Εικόνα 4.3.1: Έλεγχος ευαισθησίας της colorimetric LAMP χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις πλασμιδίων από 1 έως 10^5 αντίγραφα. Tubes από 1 έως 7: 100.000, 10.000, 1000, 100, 10, 1 αντίγραφα και ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας.

4.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colorimetric LAMP

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της colorimetric LAMP αλλά και για περαιτέρω έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε

ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπου επιβεβαιώθηκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στα 10 αντίγραφα.



Εικόνα 4.4.1: Επιβεβαίωση του ελέγχου ευαισθησίας της colorimetric LAMP με ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις πλασμιδίων από 1 έως 10^5 αντίγραφα. Στήλες 2 έως 7: 100.000, 10.000, 1000, 100, 10, 1 αντίγραφα και ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)

4.5 Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα

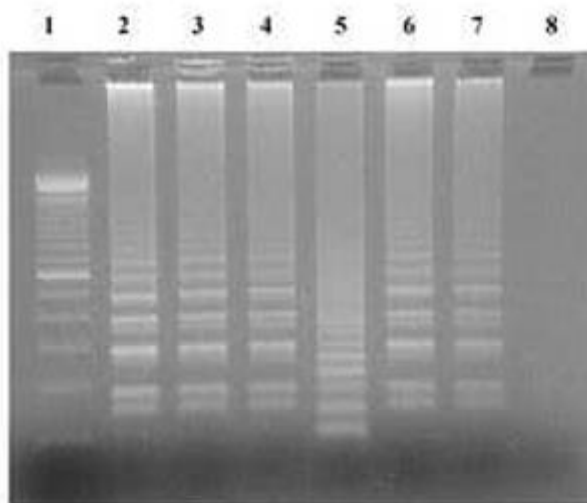
Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην ανίχνευση HPV16 με colorimetric LAMP σε θετικά κλινικά δείγματα. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα στα θετικά δείγματα για τον HPV16 υπήρξε αλλαγή χρώματος από ροζ σε κίτρινο, ενώ ο αρνητικός μάρτυρας παρέμεινε ροζ.



Εικόνα 4.5.1: Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα. Tubes 1-6: Θετικά δείγματα στα οποία παρατηρείται αλλαγή χρώματος από ροζ σε κίτρινο, tube 7: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων προχωρήσαμε σε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colorimetric LAMP και όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα

διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πλήρης αντιστοιχία μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.



Εικόνα 4.5.2: Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της colorimetric LAMP με ηλεκτροφόρηση. Στήλες 2-7: Θετικά κλινικά δείγματα, στήλη 8: ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)

4.6 Έλεγχος εξειδίκευσης της colorimetric LAMP

Για τον έλεγχο της εξειδίκευσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα αρνητικά για τον HPV16, αλλά θετικά για HPV18, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τον HPV16 (DHPV16FIP, DHPV16BIP, DHPV16B3, DHPV16F3). Επιπλέον, με τη χρήση των ίδιων εκκινητών, πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP σε HPV18 E6 πλασμίδια και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση.

5. Συζήτηση

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPVs) ανήκουν στην οικογένεια των Papillomaviridae και προσβάλλουν κυρίως το επιθήλιο του βλεννογόνου και του δέρματος. Μεταξύ των ασθενειών που μπορούν να προκαλέσουν συμπεριλαμβάνονται τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, που αποτελούν το πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο. Οι HPVs υψηλού κινδύνου μπορούν επίσης να προκαλέσουν δυσπλασίες και ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, μέχρι και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αντίθετα, οι HPVs χαμηλού κινδύνου τις περισσότερες φορές προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις ή καλοήθεις αλλοιώσεις [3].

Οι HPVs διαθέτουν δίκλωνο κυκλικό DNA, 8.000 βάσεων. Ένα χαρακτηριστικό του γονιδιώματος των HPVs είναι ότι περιέχει 8 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs), που εντοπίζονται στον έναν μόνο κλώνο του DNA, και από τον οποίο μεταγράφονται όλα τα γονίδια των ιών. Τα ORFs διακρίνονται σε πρώιμα (Early, E) και όψιμα (Late, L), ανάλογα με την τοποθέτηση τους στο γονιδίωμα. Η πρώιμη περιοχή περιέχει 6 ORFs και κωδικοποιεί για τις ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6, E7, οι οποίες μεταξύ άλλων είναι υπεύθυνες για την έναρξη της αντιγραφής του ιού, ενώ η όψιμη περιοχή περιέχει 2 ORFs και κωδικοποιεί για τις L1 και L2 πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση των ιικών καψιδίων [1].

Για την μόλυνση από τον HPV απαιτείται η ύπαρξη ενός μικροτραυματισμού που θα επιτρέψει την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Η επαναλαμβανόμενη μόλυνση με HPV είναι συνδεδεμένη με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και κονδυλωμάτων, του πιο κοινού σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στον κόσμο. Είναι χαρακτηριστικό ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 80% των γυναικών έχει μολυνθεί από τον HPV τουλάχιστον μία φορά μέχρι την ηλικία των 50 χρόνων [27]. Αλλαγές στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας που μπορούν να εντοπιστούν με τεστ Παπανικολάου μπορούν να υποδηλώσουν μόλυνση από HPV [27]. Ωστόσο, λόγω της σοβαρότητας των ασθενειών που μπορούν να προκληθούν από τους HPVs κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μοριακών τεχνικών που επιτρέπουν την έγκαιρη ανίχνευση των ιών σε σύντομο χρόνο, με χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια.

Οι κλασικές μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ιών, όπως η PCR ή η Real Time PCR, αν και διαθέτουν υψηλή ακρίβεια παρουσιάζουν μειονεκτήματα καθώς απαιτούν υψηλό κόστος και πολύ χρόνο. Έτσι, είναι αναγκαίο να καθιερωθεί η χρήση νέων μοριακών τεχνικών με κύρια χαρακτηριστικά την αυξημένη ειδικότητα, την ταχύτητα, την ευκολία διεξαγωγής

τους και το χαμηλό κόστος. Μία τέτοια τεχνική αποτελεί η LAMP, μία σχετικά νέα τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, που πραγματοποιείται σε ένα μόνο βήμα. Αποτελεί ισόθερμη τεχνική και το εύρος της θερμοκρασίας κυμαίνεται από 60°C έως 65°C. Το γεγονός αυτό προσδίδει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτείται χρήση θερμοκυκλοποιητή για τη διεξαγωγή της, καθώς η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επωαστήρα ή υδατόλουτρο. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου, ενώ γίνεται χρήση της Bst πολυμεράσης, ενός ενζύμου με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται 10^9 φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Ένα ακόμη πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μπορεί εκτός από ηλεκτροφόρηση, να πραγματοποιηθεί και με άλλες, μη συμβατικές μεθόδους όπως με χρωστικές φθορισμού ή ακόμα και με γυμνό μάτι [29]. Μία παραλλαγή της κλασικής μεθόδου, αποτελεί η colorimetric LAMP, στην οποία η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται σε πολύ σύντομο χρόνο, με την αλλαγή χρώματος στα μικροσωληνάρια σε περίπτωση που τα δείγματα είναι θετικά. Η διαφορά 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 [31]. Έτσι, όταν ένα δείγμα είναι θετικό γίνεται κίτρινο, ενώ όταν είναι αρνητικό, παραμένει ροζ.

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού HPV16 σε δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων μέσω χρήσης μίας νέας ισοθερμικής τεχνικής Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Σχεδιάστηκαν έτσι τέσσερις εκκινητές, δύο εσωτερικοί και δύο εξωτερικοί, οι οποίοι προσδένονται στο γονίδιο E6 του ιού HPV16, καθώς και δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου L1 μέσω PCR. Για τον σχεδιασμό τους έγινε χρήση του προγράμματος Primer Explorer V5.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR σε 40 κλινικά δείγματα για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και L1, προκειμένου να διαπιστωθεί ποια δείγματα ήταν θετικά για τον HPV16 και έγινε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Από τα 40 κλινικά δείγματα, τα 20 ήταν θετικά και τα 20 αρνητικά. Επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση του προϊόντος της PCR για το γονίδιο E6, προκειμένου να ακολουθήσει η μοριακή κλωνοποίηση και η δημιουργία σειριακών αραιώσεων πλασμιδίων για τη διεξαγωγή Real Time PCR, με σκοπό να προσδιοριστεί το 1 αντίγραφο για μετέπειτα έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου που αναπτύξαμε. Από τη Real Time PCR προέκυψε ότι η αραιώση των πλασμιδίων που αντιστοιχεί στο ένα αντίγραφο ήταν η 10^{-9} .

Όπως προαναφέρθηκε για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP στις αραιώσεις των πλασμιδίων από το 1 έως τα 10^5 αντίγραφα. Η ευαισθησία της μεθόδου φάνηκε να ανέρχεται στα 10 αντίγραφα, καθώς αποτέλεσε την χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος. Η ευαισθησία της μεθόδου επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην ανίχνευση του HPV16 με colorimetric LAMP σε θετικά κλινικά δείγματα. Στα θετικά δείγματα για τον HPV16 υπήρξε αλλαγή χρώματος από ροζ σε κίτρινο, ενώ η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε και πάλι με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πλήρης αντιστοιχία μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.

Τέλος, για τον έλεγχο της εξειδίκευσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα αρνητικά για τον HPV16, αλλά θετικά για HPV18, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τον HPV16 (DHPV16FIP, DHPV16BIP, DHPV16B3, DHPV16F3). Επιπλέον, με τη χρήση των ίδιων εκκινητών, πραγματοποιήθηκε colorimetric LAMP σε HPV18 E6 πλασμίδια και τα αποτελέσματα ήταν και πάλι αρνητικά, κάτι που επιβεβαιώθηκε και μέσω ηλεκτροφόρησης.

Συνοψίζοντας, η colorimetric LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, αποτελεί μία τεχνική υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας, με χαμηλό κόστος που επιτρέπει την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε πολύ σύντομο χρόνο για την ανίχνευση των HPV16 ιών. Έτσι, μπορεί να αποτελέσει μία πολύ σημαντική τεχνική για τον διαγνωστικό έλεγχο αυτής της ομάδας ιών.

6. Βιβλιογραφία

1. Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology, 5th Edition Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*. Jun 20;324(1):17-27
3. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR and Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. Nov 20;30 Suppl 5:F55-70
4. Sapp M and Bienkowska-Haba M. (2009) Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS*. Dec; 276(24): 7206–7216.
5. Conway M.J, Meyers C. (2009) Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res*. Apr;88(4):307-17
6. Bergvall M, Melendy T , Archambault J. (2013) The E1 proteins. *Virology*. Oct; 445(12) :35–56
7. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. Jun;24(3):275-90
8. McBride AA. (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. Oct;445(1-2):57-79
9. Doorbar J. (2013) The E4 protein: structure, function and patterns of expression. *Virology*. Oct; 445(1-2) :80-98
10. Yajid, A. I., Zakariah, M. A., Zin, A. A. M., & Othman, N. H. (2017). Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(2), 315–319.
11. Wang, Q., Kennedy, A., Das, P., McIntosh, P. B., Howell, S. A., Isaacson, E. R., ... Doorbar, J. (2009). Phosphorylation of the Human Papillomavirus Type 16 E1^{E4} Protein at T57 by ERK Triggers a Structural Change That Enhances Keratin Binding and Protein Stability. *Journal of Virology*, 83(8), 3668–3683.
12. Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*, 10, 140.
13. Yugawa T, Kiyono T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*. Mar;19(2):97-113.
14. Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(0), 138–168.
15. He, W., Staples, D., Smith, C., & Fisher, C. (2003). Direct Activation of Cyclin-Dependent Kinase 2 by Human Papillomavirus E7. *Journal of Virology*, 77(19), 10566–10574.

16. BenyueZhang, R. Nicholas Laribee, Michael J. Klemsz, Ann Roman. (2014). Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology*, Nov 10; 329(1):189-98.
17. Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, 445(0), 169–174.
18. Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(0), 175–186.
19. Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U., & Duerksen-Hughes, P. J. (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virology*, 6(1), 45–57.
20. Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR, Coleman N. (2007). An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *Pathology*, Sep;213(1):27-34.
21. McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006211.
22. Holmes, A., Lameiras, S., Jeannot, E., Marie, Y., Castera, L., Sastre-Garau, X., & Nicolas, A. (2016). Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *NPJ Genomic Medicine*, 1, 16004–.
23. Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O., & Bogers, J.-P. J. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal*, 7:11
24. McBride, A. A. (2008). Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Advances in Virus Research*, 72, 155–205.
25. Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., & Raj, K. (2006). Different Modes of Human Papillomavirus DNA Replication during Maintenance. *Journal of Virology*, 80(9), 4431–4439.
26. Graham, S. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5(10), 1493–1506.
27. Braaten, K. P., & Laufer, M. R. (2008). Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 1(1), 2–10.
28. Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
29. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.

30. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* ;53(1):1-5
31. Zhang X., Lowe SB., Gooding JJ. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Biosens Bioelectron*, Nov 15;61:491-9.