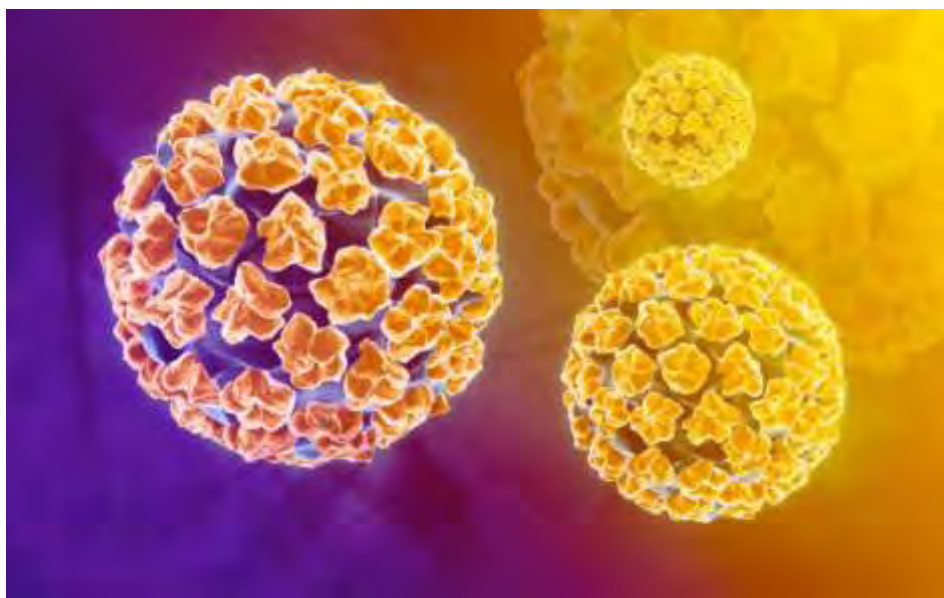




## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



#### Πτυχιακή Εργασία

**Κινητική εμφάνισης των προϊόντων της ισοθερμικής  
αντίδρασης πολλαπλασιασμού νουκλεικών οξέων (LAMP)  
χρησιμοποιώντας δύο τύπους DNA πολυμερασών την Bst 3.0  
ή την Bst 2.0 παρουσία ή μη Loop εκκινητών**

**Kinetics of isothermal nucleic acids amplification LAMP using  
two types of DNA polymerase, Bst 3.0 or Bst 2.0 in the  
presence or absence of Loop primers**

*Μαυρομούστακου Βαλεντίνα  
Λάρισα 2019*

**Κινητική εμφάνισης των προϊόντων της ισοθερμικής  
αντίδρασης πολλαπλασιασμού νουκλεικών οξέων (LAMP)  
χρησιμοποιώντας δύο τύπους DNA πολυμερασών την Bst 3.0  
ή την Bst 2.0 παρουσία ή μη Loop εκκινητών**

**Kinetics of isothermal nucleic acids amplification LAMP using  
two types of DNA polymerase, Bst 3.0 or Bst 2.0 in the  
presence or absence of Loop primers**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):**

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

### **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:**

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

### **ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:**

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

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θεωρώ χρέος μου και επιθυμώ, προλογίζοντας την παρούσα εργασία, να ευχαριστήσω ανθρώπους, η συμβολή των οποίων ήταν άκρως σημαντική για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου.

Κατά κύριο λόγο, ευχαριστώ τον καθηγητή και επιβλέποντα μου, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την για την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη του, την υπομονή και το ενδιαφέρον του κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Στη συνέχεια θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ ιδιαιτέρως στον Συμβασιούχο Διδάσκοντα Τηλέμαχο Δημητρίου κυρίως για την υπομονή του σε όλη συνεργασία που είχαμε και για την πολύτιμη βοήθεια του κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Καθώς και ένα ευχαριστώ στους υπόλοιπους «συναδέλφους» κατά την περίοδο των πειραμάτων για την άψογη συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της μεταπτυχιακής μου εργασίας, τον κύριο Αμούτζια Γρηγόριο και τον κύριο Μόσιαλο Δημήτριο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός HPV (ιός ανθρώπινων θηλωμάτων) είναι μικρός σε μέγεθος δίκλωνος DNA ιός, ανήκει στην οικογένεια Papillomaviridae και προσβάλλει κυρίως το επιθήλιο του βλεννογόνου και του δέρματος. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 100 διαφορετικά στελέχη του ιού και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: στελέχη χαμηλού κινδύνου, όπου για παράδειγμα ανήκει το στέλεχος που προκαλεί κονδυλώματα, και τα στελέχη υψηλού κινδύνου όπου ανήκει ο HPV 16, που είναι υπεύθυνος για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Κρίνεται αναγκαία όμως και η ύπαρξη μιας μεθόδου που θα επιτρέπει την ανίχνευση των συγκεκριμένων ιών σε σύντομο χρονικό διάστημα, με χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια.

Το ιικό γονιδίωμα των HPV βρίσκεται σε δύο μορφές είτε στην επισωμική, είτε στην ενσωματωμένη μορφή στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Το γονιδίωμα χωρίζεται σε τρεις περιοχές α) την άνω ρυθμιστική περιοχή, β) την πρώιμη περιοχή και γ) την όψιμη περιοχή.

Η μόλυνση από τον HPV προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μικροτραυματισμού που θα επιτρέψει την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Ο κύκλος ζωής του αποτελείται από τρία στάδια 1) την αντιγραφή, 2) την μεταγραφή και τέλος 3) την σύνθεση και την απελευθέρωση του.

Στην παρούσα εργασία εξετάσθηκε η τεχνική Real Time LAMP για τη γρήγορη και ειδική ανίχνευση των ιών HPV16 από διάφορα κλινικά δείγματα. Η real time LAMP αποτελεί παραλλαγή της απλής LAMP κατά την οποία χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, για την λήψη των αποτελεσμάτων λεπτό προς λεπτό σε πραγματικό χρόνο. Είναι αξιόπιστη, απλή και γρήγορη μέθοδος. Στην παρούσα τεχνική έγινε χρήση έξι εκκινητών που στοχεύουν σε οκτώ διακριτές περιοχές του γονιδίου E6 των ιών HPV 16.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαίωσαν ότι η Real Time LAMP 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.

## ***ABSTRACT***

HPV viruses are double stranded small DNA viruses that belong to Papillomaviridae family and mostly affects the epithelium of the mucosa and skin. Until today more than 100 different strains have been identified and are classified in two categories: the low risk types, an example is the type that causes common warts and the high-risk type that are responsible for cervical cancer. It is of great importance to develop an assay in order to detect specific type of virus with low cost, in short time and with high precision.

The viral genome of HPV can be found either in episomal or integrated form in the host of cell genome. The genome is divided in three regions a) the upper regulatory region, b) the early region and the late region.

HPV infection requires a microtrusion to allow the virus to enter at the basal layer. The life cycle of the virus is divided in three stages 1) genome replication, 2) transcription and 3) synthesis and release of the newly synthesized viral particles.

In this study Real Time LAMP technique was tested for the rapid and specific detection of HPV16 virus from various clinical samples. Real Time LAMP is a variation of the simple LAMP method that uses a fluorescent dye to visualize results minute per minute in a real time mode. It's reliable, simple and quick method. In this study, six primers that target eight distinct regions of the E6 gene of HPV 16 were used.

The upcoming results confirmed that Real Time LAMP is a highly specialized and sensitive technique, with low cost and allows for the visualization of results in a very short time. Thus, it can be a very important diagnostic technique for the early and accurate diagnosis of HPV 16 viruses.

## Περιεχόμενα

<b>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</b>	2
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	3
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>Περιεχόμενα</b>	6
<b>1.Εισαγωγή</b>	8
1.1 Βιολογία των ιών HPV	8
1.2 Προ συμπτωματικός έλεγχος για HPV	10
1.3 Εμβόλια	10
1.4 Ταξινόμηση των Papilloma ιών	11
1.5 Το γονιδίωμα του HPV	13
1.6 Δομή του καψίδιου	14
1.7 Μορφές του ιικού γονιδιώματος	15
1.8 Κύκλος ζωής	16
1.8.1 Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή	16
1.8.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος	17
1.8.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος	18
1.8.4 Σύνθεση και Απελευθέρωση	19
<b>2.Σκοπός</b>	20
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b>	21
3.1 Κλινικά Δείγματα	21
3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep	21
3.3 PCR στα κλινικά δείγματα	22
3.4 Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	23
3.4.1 Δομή των εκκινητών και μηχανισμός της αντίδρασης	24
3.4.2 Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP	25
3.4.3 Real time LAMP	26
3.4.4 Χρωστική EvaGreen	27
3.5 Έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου	27
3.5.1 Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR	27
3.5.2 Διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις πλασμιδίων	29

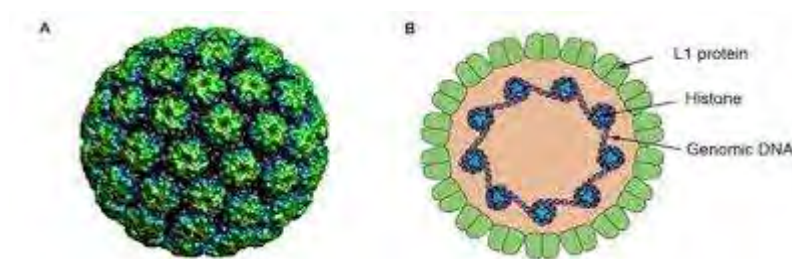
3.5.3	Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων .....	30
3.5.4	Real Time LAMP και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης στις αραιώσεις των πλασμιδίων .....	30
4.	Αποτελέσματα .....	33
4.1	PCR στα E6 και L1 γονίδια .....	33
4.2	Real Time PCR στις αραιώσεις πλασμιδίων .....	34
4.3	Αποτελέσματα Real – Time LAMP .....	36
4.3.1	Αποτελέσματα Real-Time LAMP σε πλασμιδιακές αραιώσεις.....	36
4.3.2	Αποτελέσματα Real-Time LAMP σε κλινικά δείγματα.....	38
5.	Συζήτηση .....	40
6.	Βιβλιογραφία.....	44
6.1	Βιβλιογραφία εικόνων .....	47



## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Βιολογία των ιών HPV

Ο HPV ιός όπως είναι γνωστός ή αλλιώς ο ιός ανθρώπινων θηλωμάτων είναι μικρός σε μέγεθος 22-52 nm με το καψίδιο εικοσαεδρικής δομής να έχει διάμετρο 50-60 nm και χωρίς να έχει επιπλέον εξωτερικό περίβλημα. Το μέγεθος του γονιδιώματος του HPV είναι 8000 ζεύγη βάσεων. [17]



Εικόνα 1.1.1 Το καψίδιο του HPV. Α) τρισδιάστατη μορφή του ιού HPV όπως έχει ανασυσταθεί από τον υπολογιστή, από εικόνες που λήφθηκαν με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία και από κρυσταλλωμένη πρωτεΐνη L1. Πηγή: [i] Β) Διαγραμματικά το καψίδιο του ιού όπου υπάρχει το κύριο καψίδιο η L1 πρωτεΐνη, το ιικό γονιδίωμα και οι κυταρικές ιστόνες. Πηγή: [ii].

Έως σήμερα έγινε καταγραφή για περισσότερα από 100 διαφορετικά στελέχη όπου το ένα τρίτο περίπου από αυτά βρέθηκαν στο επιθήλιο ή στο δέρμα της πρωκτογεννητικής περιοχής σε άνδρες και γυναίκες, ενώ τα υπόλοιπα κυρίως προσβάλλουν το δέρμα σε άλλες περιοχές του σώματος, τα επιθήλια στη στοματική κοιλότητα και το ανώτερο αναπνευστικό, και σπάνια άλλους ιστούς. Καλοήθεις αλλοιώσεις όπως είναι γνωστά τα κονδυλώματα προκαλούνται από τα στελέχη 6, 11, 42, 43, 44 και είναι η πιο συνηθισμένη κλινική εκδήλωση της λοίμωξης από τον ιό στην πρωκτογεννητική περιοχή. Ανήκουν όμως στην κατηγορία του χαμηλού κινδύνου γιατί δεν εμφανίζουν νεοπλασματικές αλλοιώσεις μόνο σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις. Του υψηλού κινδύνου θεωρούνται όλα τα στελέχη που προκαλούν

προ καρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις όπως είναι για παράδειγμα τα στελέχη 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 66. [26]

Ένα πολύ υψηλό ποσοστό γύρω στο 70% για τον καρκίνο της μήτρας, καρκίνο του πρωκτού, υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (CIN 2/3), αδеноκαρκινώματος in situ (AIS), ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του αιδοίου (VIN 2/3) και του κόλπου (VaIN 2/3) υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του πρωκτού είναι υπεύθυνοι οι ιοί HPV 16 και HPV 18. Ενώ είναι υπεύθυνοι και για ένα μικρό ποσοστό κοντά στο 30% για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN 1). Οι HPV 6 και 11 είναι υπεύθυνοι για το περίπου 90% των ακροχορδόνων των γεννητικών οργάνων και το 10% της χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (CIN 1) . Οι βλάβες CIN 3 και AIS αναγνωρίζονται ως πρόδρομα στάδια του διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Πάνω από 85% των συνολικών θανάτων από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας συμβαίνει στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς εκεί είναι περιορισμένη η χρήση προγραμμάτων ανίχνευσης των ιών HPVs και δυσχερής η πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας. [18]

Η εθνική και ευρωπαϊκή επιτήρηση στα δηλωμένα νοσήματα δεν έχουν συμπεριλάβει τις λοιμώξεις από τους ιούς του HPV αλλά από την πλευρά της δημοσίας υγείας όπου υπάρχει ένα ενδιαφέρον γύρω από το όλο θέμα, πραγματοποιούνται διάφορα προγράμματα ελέγχου για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας όπως και διάφορα προγράμματα εμβολιασμού. Γίνεται συχνή και συστηματική συλλογή δεδομένων για τα κύρια αίτια, τη νοσηρότητα, τη θνησιμότητα από τον καρκίνο αλλά και την παρακολούθηση της διαχρονικής εξέλιξης του καρκίνου στη χώρα μας από το ΚΕΕΛΠΝΟ μέσω του Εθνικού Αρχείου Νεοπλασιών. Παράλληλα, στο πλαίσιο των προγραμμάτων αγωγής υγείας γίνεται ενημέρωση για τον HIV και τα άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, καθώς και εκστρατεία ενημέρωσης για την αναγκαιότητα του προ συμπτωματικού ελέγχου για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. [2]

## **1.2 Προ συμπτωματικός έλεγχος για HPV**

Το τεστ Παπανικολάου γίνεται για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μείωσε σε σημαντικό βαθμό τον επιπολασμό για την νόσο και έχει σώσει πολλές γυναίκες με τον συστηματικό έλεγχο όπου πρέπει να γίνεται μια φορά τον χρόνο. Παρόλα αυτά η πλειοψηφία των γυναικών που πάσχουν από καρκίνο της μήτρας όπου είναι στο 60% δεν συμμετέχουν σε πληθυσμιακούς ελέγχους (screening). [6]

Οι μισές περιπτώσεις του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εντοπίζεται σε γυναίκες που δε συμμετείχαν σε κάποιο πρόγραμμα πληθυσμιακού ελέγχου για περισσότερα από 5 χρόνια. Ενώ με τον κυτταρολογικό πληθυσμιακό έλεγχο κοινώς το τεστ Παπανικολάου σε γυναίκες από την ηλικία των 21 μέχρι και την ηλικία των 65 κάθε τρία χρόνια μειώνει σημαντικά τόσο τον επιπολασμό όσο και την θνησιμότητα από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. [22]

## **1.3 Εμβόλια**

Για την πρόληψη του ιού υπάρχουν 2 εμβόλια το διδύναμο για τα στελέχη 16 και 18 και το τετραδύναμο για τα στελέχη 6 και 11, όπου είναι ανοσοενοχισμένα ανσυνδυασμένα εμβόλια που παρασκευάζονται από υψηλής καθαρότητας σωματίδια προσομοιάζονται του ιού (Viral, Like-Particles-VLPs) της μείζονος καψιδικής πρωτεΐνης L1 συγκεκριμένων τύπων HPV.

Τα VLPs δεν περιέχουν DNA του ιού, δεν να μολύνουν τα κύτταρα και δεν μπορούν να αναπαραχθούν ή να προκαλέσουν οποιαδήποτε νόσο. Στη χώρα μας διατίθενται και τα δύο είδη εμβολίου με δοσολογικό σχήμα 3 δόσεων. Για το διδύναμο οι δόσεις είναι 0-1-6 μήνες, ενώ για το τετραδύναμο είναι 0-2-6 μήνες. Η διάρκεια της προστασίας δεν είναι σίγουρο ακόμα για το πόσο διαρκεί αλλά παρακολουθείται με μελέτες, όμως έχει διαπιστωθεί υψηλός τίτλος αντισωμάτων και ακόμα 9 χρόνια μετά τον εμβολιασμό. Ιδιαίτερα θα πρέπει να τονιστεί ότι ο εμβολιασμός δεν υποκαθιστά τον τακτικό προληπτικό έλεγχο του καρκίνου του

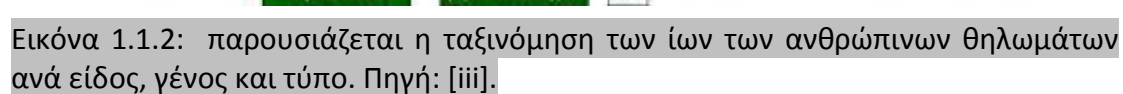
τραχήλου της μήτρας με το τεστ Παπανικολάου. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα του Ευρωπαϊκού Φορέα Φαρμάκων (European Medicines Agency-EMA) και του WHO -Global Advisory Committee for Vaccine Safety (GACVS), τα εμβόλια εκπληρώνουν τα κριτήρια της ασφάλειας, ενώ η παρακολούθηση και αξιολόγηση των δεδομένων ασφάλειας είναι συνεχής. [10]

Συνολικά το εμβόλιο για τον ιό HPV έχει λάβει άδεια σε περισσότερες από 100 χώρες παγκοσμίως. Ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση με συντριπτική πλειοψηφία 23 από τα 28 από τα κράτη μέλη έχουν υιοθετήσει τον εμβολιασμό έναντι των HPVs σύμφωνα με έρευνα που έγινε από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου. [19]

#### **1.4 Ταξινόμηση των *Papilloma* ιών**

Αρχικά οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) κατηγοριοποιήθηκαν μαζί με τους polyomaviruses (πολυώμα ιούς) σε μία οικογένεια, αυτή των Papovaviridae. Η κατηγοριοποίηση αυτή έγινε γιατί υπήρχε η ομοιότητα στο καψίδιο των παραπάνω ιών, στο ότι δεν υπήρχε περίβλημα, επίσης στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA. Πλέον όμως η ταξινόμηση αυτή δεν ισχύει και οι ιοί των θηλωμάτων-papillomaviruses αποτελούν μια ξεχωριστή ταξινομική οικογένεια ιών των Papillomaviridae η οποία δεν έχει καμιά σχέση με τους polyomaviruses. Εδώ και σχεδόν 20 χρόνια έγινε αυτός ο διαχωρισμός έγινε βάση της διαφοράς της οργάνωσης, του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των papillomaviruses και των μελών της οικογένειας Papovaviridae [7].

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους, ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus είναι τα γένη που έχουμε. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1. Το γονίδιο αυτό είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο των ιών, καθώς ανάμεσα και στα πιο «απομακρυσμένα» γονιδιώματα παρουσιάζει τουλάχιστον 40% ομολογία. Έτσι τα γονίδια όπου η ομολογία τους είναι μέχρι και 60% ανήκουν



## 1.5 Το γονιδίωμα του HPV

Το γονιδίωμα του HPV παρουσιάζει τρεις περιοχές:

1. Την ρυθμιστική περιοχή : όπου δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες αλλά παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού.
2. Πρώιμη περιοχή : όπου περιέχει τα λειτουργικά γονίδια (αναφέρονται ως open reading frames—ORFs) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Έχουν προσδιοριστεί οκτώ ORFs που κωδικοποιούν αντίστοιχες πρωτεΐνες:

E1: έναρξη διπλασιασμού ιϊκού DNA

E2: ρύθμιση της μεταγραφής και αντιγραφείς του DNA

E3: δεν γνωρίζουμε ακόμα την λειτουργία της αλλά το πιο πιθανό να δημιουργεί την ογκογένεση

E4: κάνει διάσπαση των κυτταροκερατινών των μολυσμένων κυττάρων και απελευθερώνει τα ιικά σωματίδια

E5: έχει αρνητική ρύθμιση στις ανοσολογικές απαντήσεις του ξενιστή και ενεργοποιεί τους υποδοχείς EGF και PG

E6: κάνει αποδόμηση του p53 όπου είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη

E7: γίνεται σύνδεση με την pRb ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη

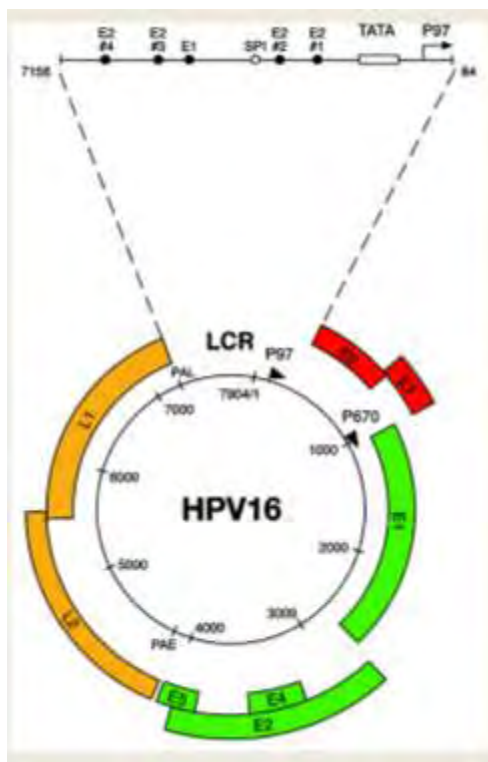
3. Την όψιμη περιοχή L (LATE): της οποίας τα ORFs κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες της κάψας του ιού. Έχουν προσδιοριστεί δύο ORFs:

L1: όπου κωδικοποιεί την κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου

L2: όπου κωδικοποιεί την δευτερεύουσα πρωτεΐνη του καψιδίου.

Για είναι μολυσματικός ο ιός πρέπει να περιβάλλεται από την κάψα, ενώ χωρίς αυτήν παύει να είναι και η παραγωγή των πρωτεϊνών στα κύτταρα των ανώτερων

στοιβάδων του επιθηλίου έχει το κυριότερο ρόλο για την μετάδοση του σε άλλα κύτταρα. Όταν γίνεται αδρανοποίηση των E6 και E7 όπου είναι οι σημαντικότεροι ογκοκατασταλτικοί μηχανισμοί γίνεται συσσώρευση, με το χρόνο τυχαίων μεταλλάξεων, οι οποίες προκαλούν πολλαπλασιασμό και «αθανатоποίηση» του κυττάρου. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο για την καρκινογένεση είναι με την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο DNA του ξενιστή. [1]



Εικόνα 1.1.3 : Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος του HPV-16 πηγή : [iv].

## 1.6 Δομή του καψίδιου

Τα καψίδια των papilloma ιών είναι μικρά σε μέγεθος, η διάμετρος τους δεν ξεπερνά τα 60 nm και δεν έχουν καθόλου εξωτερικό περίβλημα. Επίσης αποτελούνται και από δίκλωνο DNA με μέγεθος 7900 bp. Για τον σχηματισμό κύριο ρόλο έχουν οι 2 πρωτεΐνες όπου παράγονται από L1 και L2 γονίδια.

Για να σχηματιστεί εξωτερικά το καψίδιο υπεύθυνη είναι η L1 πρωτεΐνη όπου στο εσωτερικό του σκελετού της βρίσκεται τοποθετημένη και η L2 όμως δεν γνωρίζουμε ακριβώς την χρησιμότητα της. Παρόλα αυτά το μόνο που γνωρίζουμε

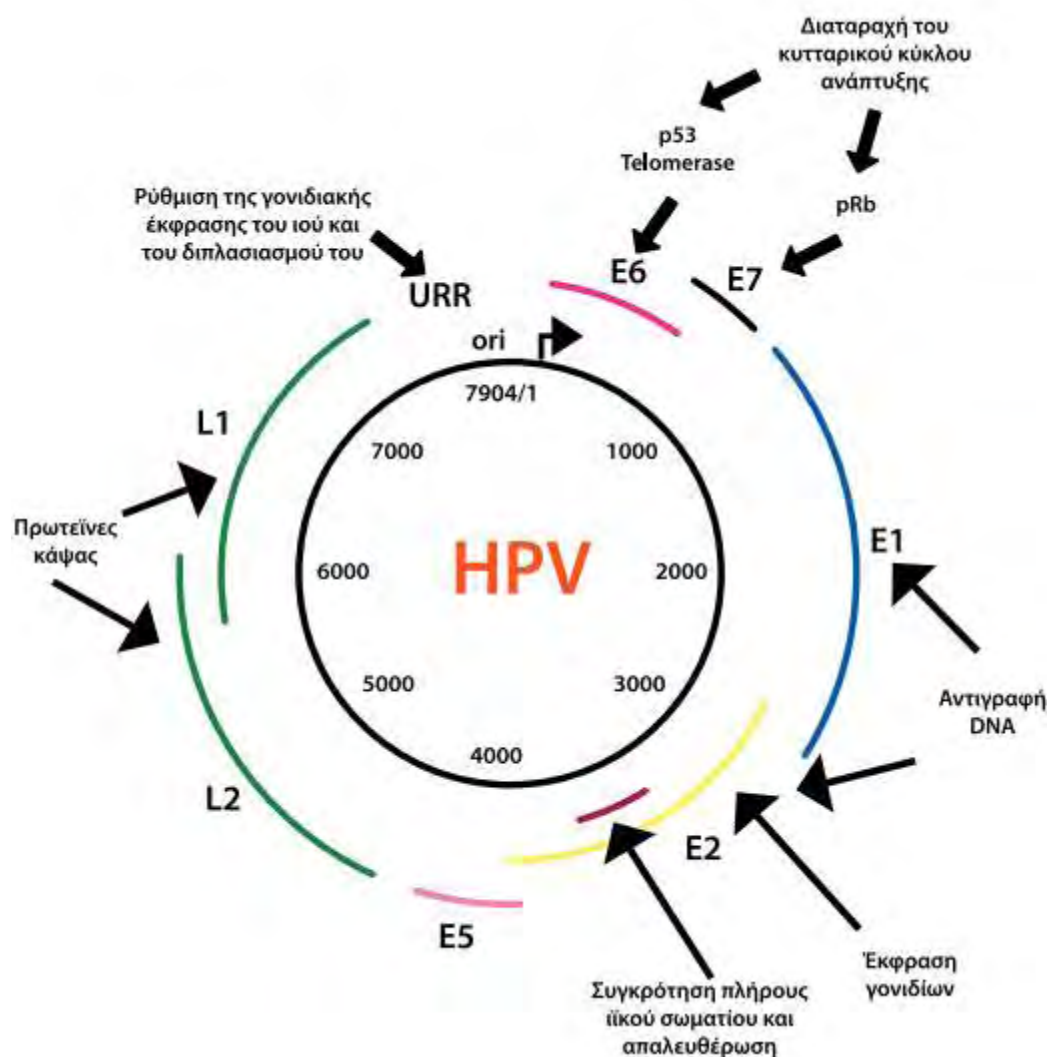
είναι ότι μαζί με την E2 είναι υπεύθυνες για το πακετάρισμα του ιικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιικά καψίδια. [6]

### **1.7 Μορφές του ιικού γονιδιώματος**

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να βρίσκεται σε 2 μορφές επισωμική μορφή και ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή, όμως παράλληλα μπορεί να υπάρχουν ταυτόχρονα και οι 2 μορφές. Διάφορες έρευνες που έγιναν έδειξαν ότι το 90% των μολύνσεων από HPV υψηλού κινδύνου, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς, ενώ στο υπόλοιπο 10% , η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η ενσωμάτωση του HPV-16 στο γένωμα του ξενιστή θεωρείται ως ένα βήμα που σχετίζεται με την εξέλιξη προς νεοπλασία, περίπου στο 70% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο DNA του κυττάρου-ξενιστή. [30]

Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539 όπου εντοπίζεται συνήθως στο 3' άκρο. Έτσι το αποτέλεσμα είναι να διατηρείται ακέραια η ρυθμιστική περιοχή (LCR) και τα ογκογονίδια E6 και E7 κατά την ενσωμάτωση και συμβαίνει σταθεροποίηση έκφρασης στα ογκογονίδια E6 και E7. Με την απορρύθμιση σταδιακά προκαλείται ένας ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων που θα οδηγήσει σε ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και καρκίνο. [21, 31]





Εικόνα 1.1.4: σχηματικά το γονιδίωμα των ανθρώπινων θηλωμάτων και ο κύκλος ζωής των . Πηγή: [v].

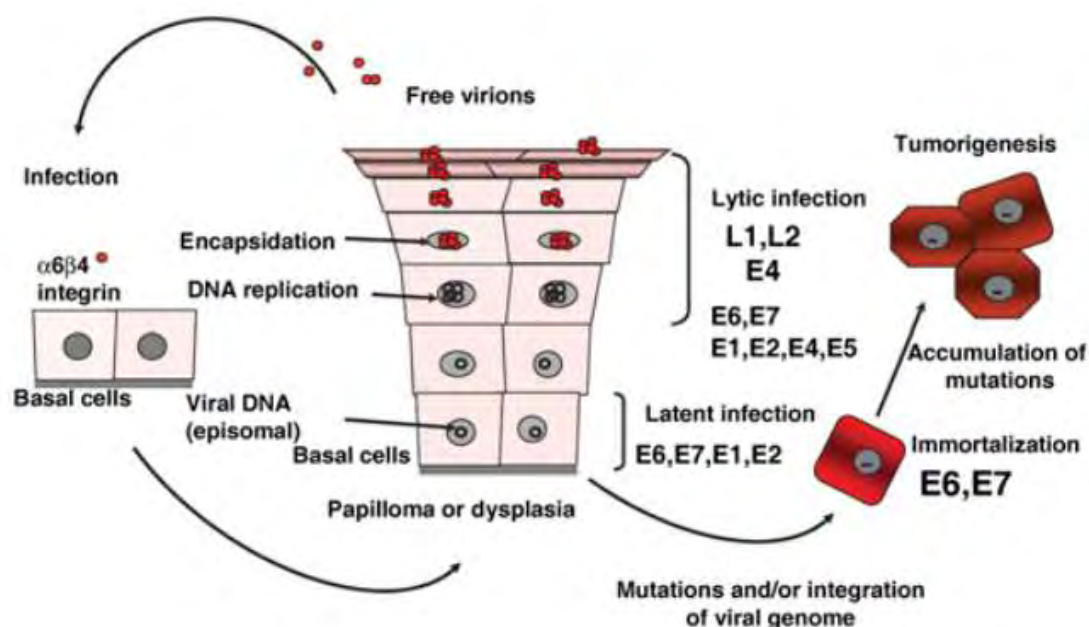
## 1.8 Κύκλος ζωής

### 1.8.1 Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή

Οι Papilloma ιοί του ανθρώπου στοχεύουν τα κύτταρα του πολύστιβου επιθηλίου του δέρματος και φαίνεται ότι απαιτείται η παρουσία ενός μικροτραυματισμού που θα επιτρέψει την είσοδο του ιού στα κύτταρα της βασικής

στιβάδας του επιθηλίου. Μελέτες έδειξαν ότι ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω σύνδεσής του με την θεική ηπαρίνη (HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών στην κυτταρική μεμβράνη. Για την είσοδο στο κύτταρο χρειάζεται και η παρουσία ενός ακόμα υποδοχέα όπως η α6-ιντεγκρίνη και η λαμίνη-5. [11]

Όταν γίνει η πρόσδεση στον υποδοχέα ο ιός εισέρχεται μέσα στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση. Αργότερα όλα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2. [8]



Εικόνα 1.1.5: Ο HPV προσβάλλει ειδικά τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Επισημαίνονται οι ιικές πρωτεΐνες που παράγονται κατά την πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή. Πηγή: [vi].

## 1.8.2 Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος

Σαν πρώτο στάδιο είναι η φάση της εγκαθίδρυσης όπου και εγκαθιδρύεται ο ιός στο κύτταρο. Σε ένα φυσιολογικό επιθήλιο έχουμε τα κύτταρα στο κατώτερο στρώμα να είναι μιτωτικά ενεργά. Από εκεί εισέρχεται ο ιός και παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος και δημιουργούνται από 50 μέχρι 400 αντίγραφα. [21]

Το επόμενο στάδιο είναι η φάση του πολλαπλασιασμού όπου συμβαίνει με την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S. Στην φάση αυτή το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο.

Και το τελευταίο στάδιο είναι η φάση της αντιγραφής όπου πραγματοποιείται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν. Χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία εκατοντάδων έως και χιλιάδων αντιγράφων του γονιδιώματος, με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων. [14]

### 1.8.3 Μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος

Γενικά η μεταγραφή των HPV είναι σχετικά πολύπλοκη και ο μηχανισμός τους δεν είναι πλήρως κατανοητός. Όλοι η Papilloma ιοί διαθέτουν 2 βασικούς εκκινητές τον πρώιμο και τον όψιμο.

Η μεταγραφική τους δραστηριότητα ελέγχεται κυρίως από την ρυθμιστική περιοχή LCR, διότι εκεί εντοπίζεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6, και E7 από την πρώιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος, αυτά βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή τον p97. Ο p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και ενεργοποιεί όλα τα πρώιμα γονίδια. [15]

Ο p670 είναι ο όψιμος υποκινητής, εντοπίζεται στο E7 και είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των όψιμων γονιδίων και για την παραγωγή των L1 και L2 πρωτεϊνών οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου. [13]

#### 1.8.4 Σύνθεση και Απελευθέρωση

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής ολοκληρώνεται με την συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων, όπου γίνεται στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα. [16]

Στην διαδικασία αυτή γίνεται και η παραγωγή των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2 οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου. Η E2 πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων ενώ η E4 πρωτεΐνη όταν αυξάνεται είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση του ιού, γιατί αλλάζει η σταθερότητα της πλασματικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων. [11]

## 2.Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού HPV 16 σε κλινικά δείγματα, χρησιμοποιώντας δύο τύπους DNA πολυμερασών την Bst 3.0 ή την Bst 2.0 παρουσία ή μη Loop εκκινητών, μέσω χρήσης της ισοθερμικής τεχνικής Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP).

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Κλινικά Δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 15 κλινικά δείγματα για τον HPV 16 προερχόμενα από διαφορετικά νοσοκομεία της Ελλάδας. Τα δείγματα ήταν σε υλικό ThinPrep και είχαν διατηρηθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνολικά τα 15 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

A/A	Δείγμα	Αριθμός Αντιγράφων
1	9972-14	2,41
2	10000-14	13,7
3	9983-14	40,47
4	HG158-15	55
5	10030-14	73,1
6	10658-14	103,8
7	LG212-15	110
8	s1426-14	166,8
9	10732-14	179
10	10029-14	219,6
11	9969-14	221,1
12	10720-14	356
13	s2186-14	419,1
14	ATT-14	458,6
15	ATT-8	458,6

Πίνακας 3.1.1: Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και στη δεύτερη στήλη ο αριθμός των αντιγράφων.

#### 3.2 Εκχύλιση DNA από υλικό ThinPrep

Για να απομονώσουμε το DNA των παραπάνω κλινικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas. [3]

Σε Eppendorf's των 2ml προσθέτουμε 100μl δείγματος, 300μl Lysis Buffer που περιέχει την GuSCN και 10μl γλυκογόνου όπου έχει ψυχθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά

πραγματοποιήθηκε Vortex και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία +4°C για 20 λεπτά ούτως ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο γλυκογόνου-νουκλεϊκού οξέος. Εγινε προσθήκη 400 μl παγωμένης ισοπρανόλης (-20°C), Vortex και εκ νέου επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία +4 °C. Όταν περάσουν τα 20 λεπτά διεξάγεται φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, προστίθενται 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%, ακολουθεί ξανά vortex και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 10min. Η ευεργετικότητα 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.

Στο τελικό στάδιο της εκχύλισης γίνεται πολύ προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου ούτως ώστε να μείνει όσο το δυνατό μικρότερη ποσότητα αιθανόλης στο Eppendorf. Γίνεται προσθήκη 100μl ddH<sub>2</sub>O. Το δείγμα αναδεύεται πολύ καλά 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.

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 MgCl<sub>2</sub>, Dream Taq Buffer 1X (Thermo Scientific™), 25pmol από

τον εκκινητή HPV16L1F, 25Pmol από τον εκκινητή HPV16L1R, DreamTaq 1,25U (Thermo Scientific™) και 35,75μl ddH<sub>2</sub>O.

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 MgCl<sub>2</sub>, Dream Taq Buffer 1X (Thermo Scientific™), 25pmol από τον εκκινητή HPV16DF3, 25pmol από τον εκκινητή HPV16DB3, DreamTaq 1,5U (Thermo Scientific™) και 33,7μl ddH<sub>2</sub>O.

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

Πίνακας 3.3.1: Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR, στη δεύτερη στήλη αναγράφεται η αλληλουχία τους και στην τρίτη στήλη είναι το μήκος του προϊόντος της PCR.

### 3.4 Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Η μέθοδος LAMP είναι μια ταχεία ισοθερμική αντίδραση και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο. Χρησιμοποιούνται 4 ή 6 εκκινητές που αναγνωρίζουν 6 ή 8 αντίστοιχα, ανεξάρτητες αλληλουχίες σε επιλεγμένο νουκλεϊκό στόχο του παθογόνου για την ενίσχυση του. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας την ειδική πολυμεράση Bst, η οποία έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Έτσι δεν χρειάζεται να υπάρχει η αύξηση της



θερμοκρασίας για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA κατά την αντίδραση καθώς εκμεταλλεύεται την ενεργότητα εκτόπισης κλώνου του ενζύμου. [23]

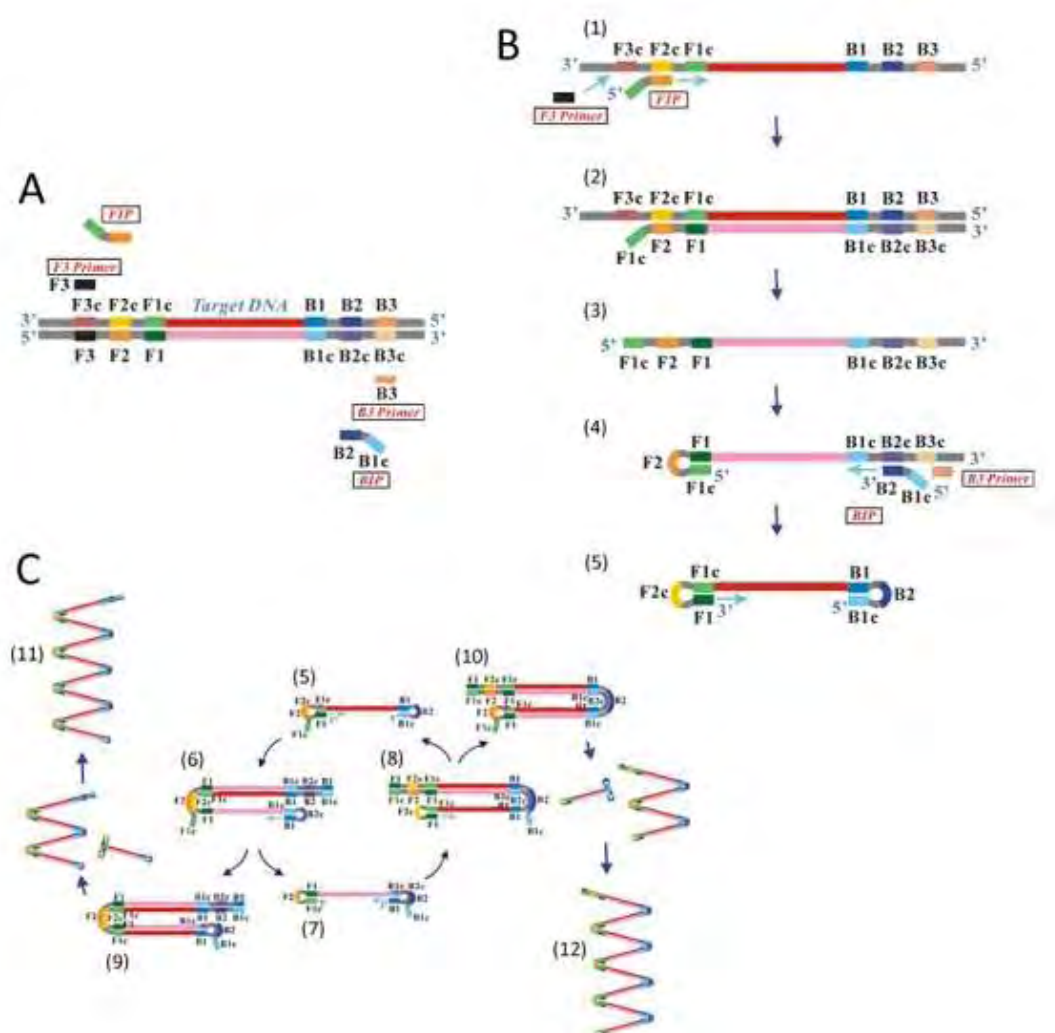
### 3.4.1 Δομή των εκκινητών και μηχανισμός της αντίδρασης

- 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 γίνεται η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Στην συνέχεια ο F3 προσδένεται στην περιοχή F3c, εξωτερικά από τον FIP και χρησιμοποιώντας την ενεργότητα εκτόπισης κλώνου η DNA πολυμεράση αρχίζει και πάλι να συνθέτει το νέο κλώνο εκτοπίζοντας παράλληλα το τμήμα που είχε ήδη δημιουργηθεί προηγουμένως. Το τμήμα που έχει εκτοπιστεί δεν αλλάζει και παραμένει μονόκλωνο όπου σχηματίζει στο άκρο του μια δομή στελέχους-θηλιάς καθώς οι περιοχές F1 και F1c είναι συμπληρωματικές. Στο υπάρχον τώρα τμήμα προσδένεται ο BIP, γίνεται η σύνθεση του DNA, και στη συνέχεια προσδένεται εξωτερικά του BIP, ο B3 με αποτέλεσμα να εκτοπίζει και πάλι το τμήμα που είχε δημιουργηθεί πιο πριν και την παραγωγή ενός δίκλωνου DNA. Το τμήμα που εκτοπίστηκε τις δύο φορές έχει πλέον στα άκρα του συμπληρωματικές αλληλουχίες και σχηματίζει δομές στελέχους θηλιάς, όπου αποτελεί πλέον την βασική δομή που ενισχύεται σε μια LAMP αντίδραση. Μετά τη δημιουργία της θηλιάς προκύπτουν πολλές και διαφορετικές δομές από την ενίσχυση της και πλέον χρησιμοποιούνται μόνο οι εσωτερικοί εκκινητές. [24]

Οι εκκινητές βρόχου Loop F και Loop B περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ των περιοχών B1 και B2 όπως αντίστοιχα F1 και F2, στο 5' άκρο

και παρέχουν αυξημένο αριθμό σημείων εκκίνησης για να γίνει η σύνθεση του DNA.



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: [vii].

### 3.4.2 Σχεδιασμός εκκινητών της LAMP

Για το συγκεκριμένο πείραμα έγινε ενίσχυση στο τμήμα του E6 του γονιδίου του HPV16 και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι DHPV16F3, DHPV16B3, DHPV16FIP, DHPV16BIP, DHPV16LF και DHPV16LB. Για τον σχεδιασμό τους

χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer Explorer V5. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών.

Εκκινητής	Αλληλουχία
<b>DHPV16F3</b>	5' – ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC –3'
<b>DHPV16B3</b>	5' – ACA GCA TAT GGA TTC CCA TCT C –3'
<b>DHPV16FIP</b>	5' – TGT TTG CAG CTC TGT GCA TAA GTT TCA GGA CCC ACA GGA –3'
<b>DHPV16BIP</b>	5' – AGA ATG TGT GTA CTG CAA GCA AAT CCC GAA AAG CAA AGT CAT –3'
<b>DHPV16LF</b>	5' – CTG TGG TAA CTT TCT GGG TCG –3'
<b>DHPV16LB</b>	5' – CAG TTA CTG CGA CGT GAG GT –3'

Πίνακας 3.4.1: Στην πρώτη στήλη το όνομα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την LAMP και στην δεύτερη στήλη η αλληλουχία τους.

### 3.4.3 Real time LAMP

Η real time LAMP αποτελεί παραλλαγή της απλής LAMP κατά την οποία χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων λεπτό προς λεπτό σε πραγματικό χρόνο (REAL TIME LAMP). Είναι αξιόπιστη, απλή και γρήγορη μέθοδος. [27]

Κάθε αντίδραση real time LAMP πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 15μl, 13μl από το μείγμα της αντίδρασης και 2μl από το δείγμα DNA. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε: DHPV16F3 και DHPV16B3 0,2μM ,DHPV16FIP και DHPV16BIP 1,6μM ,DHPV16LF και DHPV16LB 0,4μM ,MgSO<sub>4</sub>, 10x Amp Buffer II, dNTPs και fluorescent Dye EvaGreen.

Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα Real Time LAMP (Mx Stratagen 3005) σε σταθερή θερμοκρασία στους 65°C για 18 λεπτά για την λήψη φθορισμού και τέλος το dissociation curve (καμπύλη τήξης) στους 55°C – 95°C.

### 3.4.4 Χρωστική EvaGreen

Η Eva Green είναι μια φθορίζουσα χρωστική και όταν γίνεται σύνδεση με το dsDNA απορροφά στα 500 nm και εκπέμπει στα 530nm Το φάσμα διέγερσης και εκπομπής της είναι πολύ κοντά σε εκείνα των χρωστικών FAM και SYBR Green, έτσι είναι συμβατή με οποιοδήποτε όργανο απορροφά και εκπέμπει στα ανωτέρω μήκη. Είναι εξαιρετικά σταθερή τόσο θερμικά όσο και υδρολυτικά κατά τη διάρκεια το χειρισμού της. [20]

Οι μοναδικές ιδιότητες της χρωστικής EvaGreen την κατέστησαν ιδιαίτερα χρήσιμη σε ποσοτικές εφαρμογές της PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Σε σύγκριση με την ευρέως χρησιμοποιούμενη SYBR® Green I, η χρωστική EvaGreen® είναι λιγότερο ανασταλτική έναντι της PCR και της LAMP και έτσι είναι λιγότερο πιθανό να προκαλέσει μια μη ειδική ενίσχυση. [29]

## 3.5 Έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου

### 3.5.1 Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου κατασκευάστηκαν πλασμίδια που περιείχαν τμήμα του γονιδίου E6 του HPV-16. Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 3.3 με τους εκκινητές DHPV16F3 / DHPV16B3. Το προϊόν μήκους 186bp καθαρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

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 καλλιιεργειών, 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

πολυσύνδετη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl φορέα, 1μl Salt solution, 1μl ddH<sub>2</sub>O 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 επώαση στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση 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 ddH<sub>2</sub>O 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 MgCl<sub>2</sub>.

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 αγαρόζης 2% .

δ) Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών: 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 καλλιιεργειών 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 ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3-5μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση.

### 3.5.2 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 ddH<sub>2</sub>O και έγινε ισχυρή ανάδευση. Από την αραιώση αυτή, ελήφθησαν στη συνέχεια 50μl και τοποθετήθηκαν σε 450μl ddH<sub>2</sub>O. Η αραιώση αυτή ήταν η  $10^{-3}$ . Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 8 φορές, έως ότου πραγματοποιηθεί και η αραιώση  $10^{-11}$ .

### 3.5.3 Real Time PCR στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Όπως έχει αναφερθεί ο 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 Eva 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 (DHPV16F3- DHPV16B3), 2X MasterMix και 6,8μl H<sub>2</sub>O (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 Melting Curve Analysis μεταξύ των 55 °C- 95°C.

### 3.5.4 Real Time LAMP και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης στις αραιώσεις των πλασμιδίων

Πραγματοποιήθηκαν μια σειρά αντιδράσεων Real-Time LAMP στις πλασμιδιακές αραιώσεις με σκοπό την εύρεση των ιδανικών συνθηκών εκτέλεσης των αντιδράσεων.

Αρχικά δοκιμάστηκαν δυο διαφορετικές πολυμεράσες ειδικές για τη LAMP, η Bst 2.0 και Bst 3.0. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες των εκκινητών F3/B3, LoopF/LoopR και FIP/BIP, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



		FIP/BIP			
		1,2 pmol/μl	1,6 pmol/μl	2,0 pmol/μl	2,4 pmol/μl
LoopF / LoopR	0,2 pmol/μl	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3
		0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3
	0,4 pmol/μl	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3
		0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3
	0,8 pmol/μl	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3
		0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3
	1,2 pmol/μl	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3	0,2 pmol/μl F3/B3
		0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3	0,4 pmol/μl F3/B3

Πίνακας 3.5.4.1: Στην πρώτη κάθετη στήλη παρουσιάζεται η συγκέντρωση εκκινητών Loop F και Loop R στη δεύτερη στήλη οριζόντια εκείνη των εκκινητών FIP και BIP και F3 και B3.

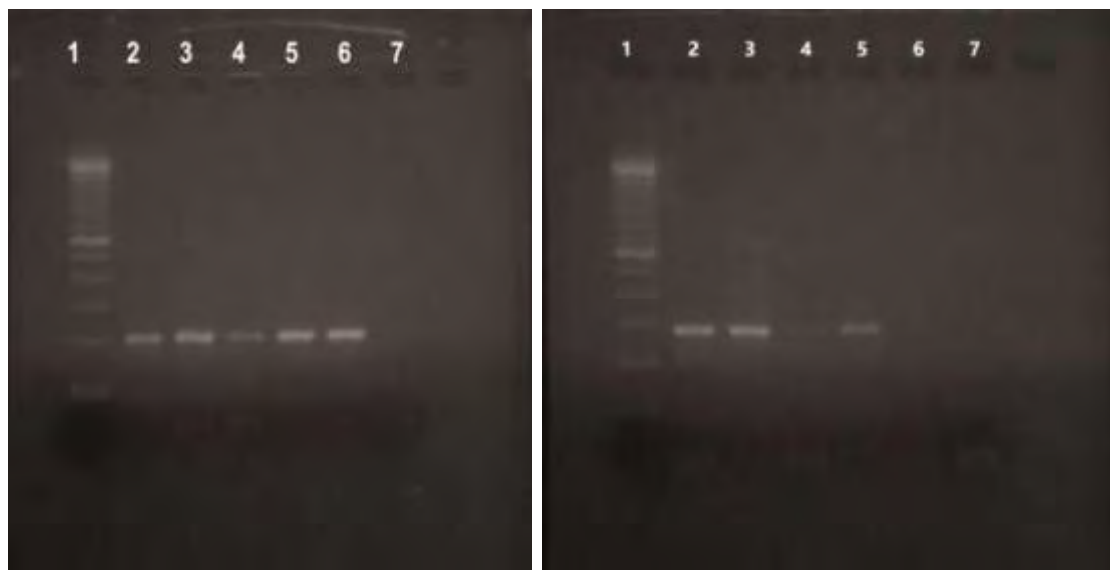
Τέλος, δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες 60°, 65° και 70°C και διαφορετικοί χρόνοι επώασης των αντιδράσεων.

Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν αυτές που η Real-Time LAMP εμφάνιζε τη μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία, παράλληλα με τη μεγαλύτερη δυνατή εξειδίκευση.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 PCR στα E6 και L1 γονίδια

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο E6 και L1 σε πέντε κλινικά δείγματα. Όπως φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 186bp για την E6 περιοχή και 291bp για την L1.



Εικόνα 4.1.1: **Αριστερά:** Ηλεκτροφόρηση μετά από PCR για το γονίδιο E6 σε κλινικά δείγματα. Στήλες 2-6: Θετικά κλινικά δείγματα, στήλη 7: ddH<sub>2</sub>O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp. **Δεξιά:** Ηλεκτροφόρηση μετά από PCR για το γονίδιο L1 σε κλινικά δείγματα. Στήλες 2-5: Θετικά κλινικά δείγματα, στήλη 6: Αρνητικό κλινικό δείγμα, στήλη 7: ddH<sub>2</sub>O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp.

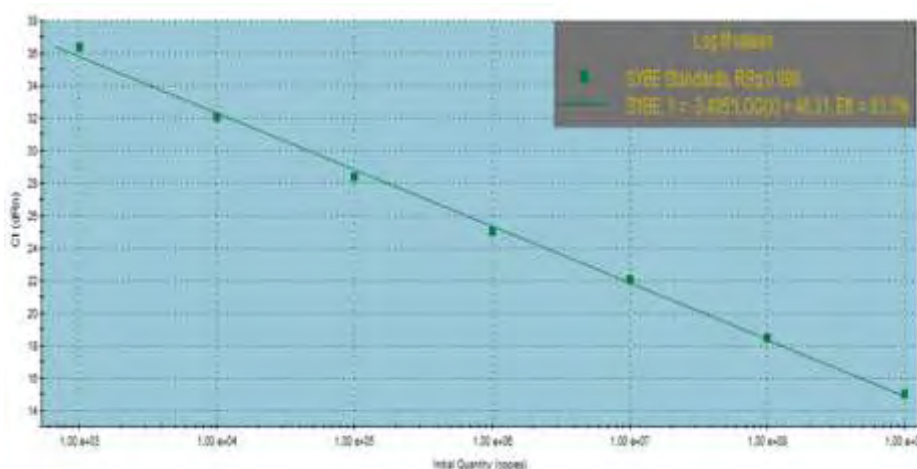
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της PCR για τα γονίδια E6 και L1 στα 15 κλινικά δείγματα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4.1.1: Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο κωδικός των δειγμάτων και στις δύο άλλες στήλες τα αποτελέσματα της PCR για τα γονίδια E6 και L1 αντίστοιχα.

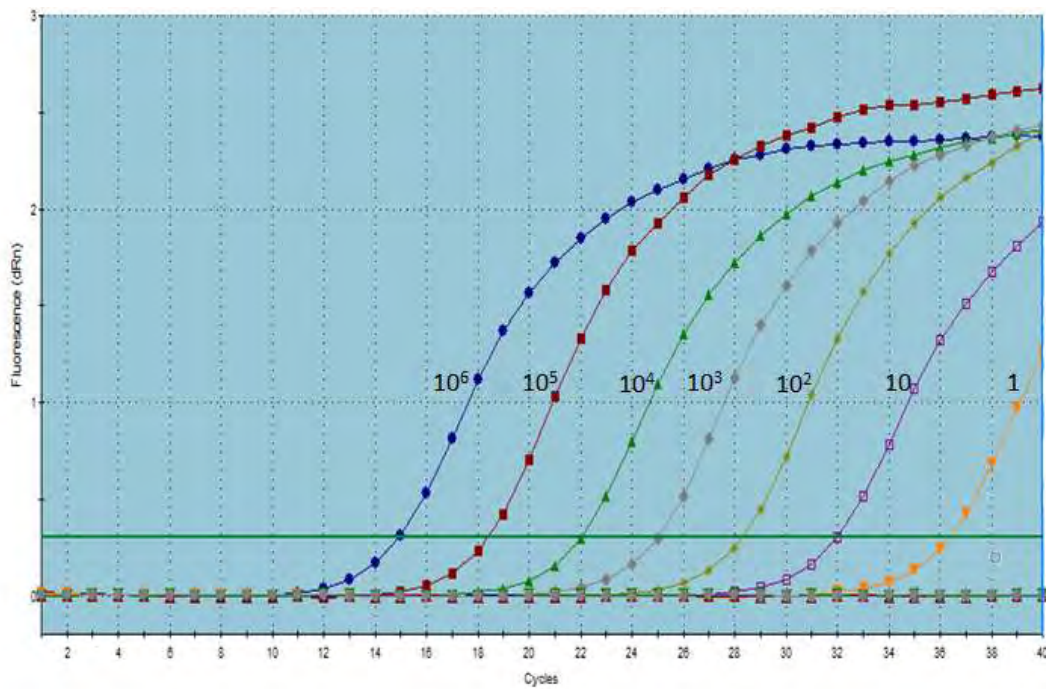
A/A	ΔΕΙΓΜΑ	PCR στο γονίδιο E6	PCR στο γονίδιο L1
1	9972-14	Θετικό	Θετικό
2	10000-14	Θετικό	Θετικό
3	9983-14	Θετικό	Θετικό
4	HG158-15	Θετικό	Θετικό
5	10030-14	Θετικό	Θετικό
6	10658-14	Θετικό	Θετικό
7	LG212-15	Θετικό	Θετικό
8	s1426-14	Θετικό	Θετικό
9	10732-14	Θετικό	Θετικό
10	10029-14	Θετικό	Θετικό
11	9969-14	Θετικό	Θετικό
12	10720-14	Θετικό	Θετικό
13	s2186-14	Θετικό	Θετικό
14	ATT-14	Θετικό	Θετικό
15	ATT-8	Θετικό	Θετικό

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



Εικόνα 4.2.2: Amplification plot. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων. Οι αριθμοί στις καμπύλες αντιστοιχούν στα αντίγραφα των πλασμιδίων.



Εικόνα 4.2.3: 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: ddH<sub>2</sub>O ως αρνητικός μάρτυρας, στήλη 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (Invitrogen, Life Technologies, Paisley,UK)

### 4.3 Αποτελέσματα Real – Time LAMP

Όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε αρχικά μια σειρά αντιδράσεων Real-Time LAMP για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν εμφανίζονται παρακάτω και αντιστοιχούν στις συνθήκες όπου εντοπίζεται η μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία και εξειδίκευση.

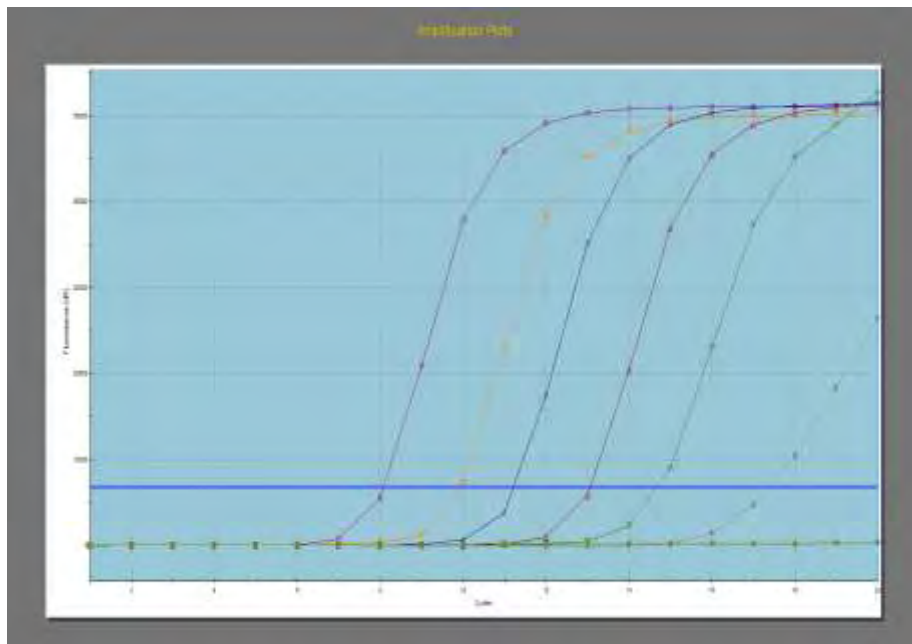
Mix	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
FIP	50 pmol/μl	1,6 pmol/μl
BIP	50 pmol/μl	1,6 pmol/μl
Loop F	50 pmol/μl	0,4 pmol/μl
Loop R	50 pmol/μl	0,4 pmol/μl
F3	50 pmol/μl	0,2 pmol/μl
B3	50 pmol/μl	0,2 pmol/μl
MgSO <sub>4</sub>	100mM	6mM (8mM τελική)
10X Amp Buffer II	10X	1X
DNTPs	40mM	5,6mM
Fluorescent Dye	50X	1X
Bst 3.0 DNA pol	8 U/μl	0,32 U/μl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 15 μl	
13 μl / tube		
DNA		2 μl

#### Mx 3005

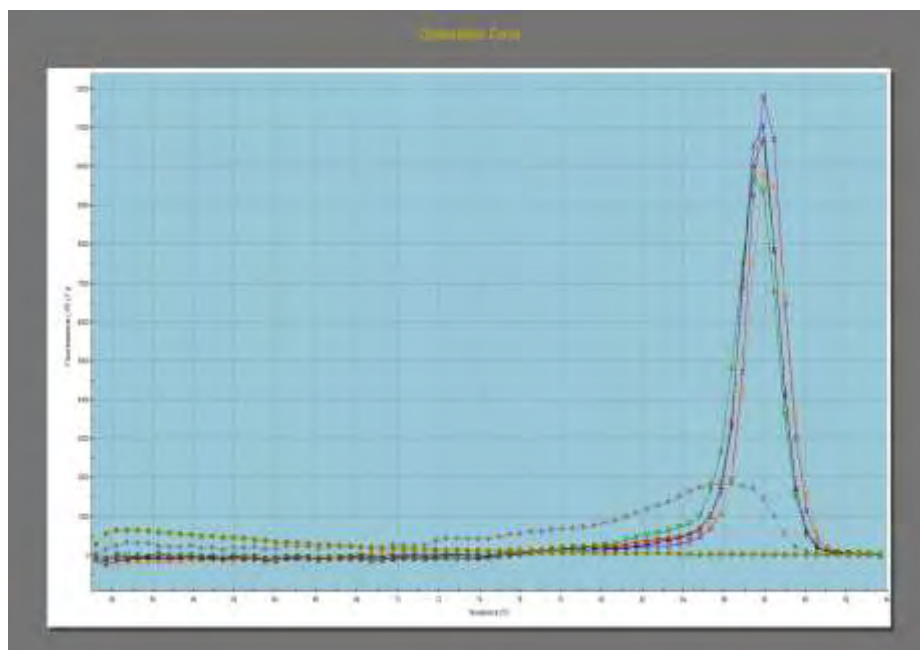
1. Incubation : **65° C → 18 min**
2. Incubation : **80° C → 5 min**
3. Dissociation : **55° C - 95° C**

#### 4.3.1 Αποτελέσματα Real-Time LAMP σε πλασμιδιακές αραιώσεις

Επόμενο βήμα μετά την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών, ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές αραιώσεις με σκοπό τον εντοπισμό του ελάχιστου αριθμού πλασμιδιακών αντιγράφων που μπορούν να ανιχνευθούν με την παρούσα Real-Time LAMP. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα 4.3.1.1: Amplification plot. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time LAMP στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων. Κατά σειρά εμφάνισης εντοπίζονται τα  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 και 1 αντίγραφο καθώς και το ddH<sub>2</sub>O το οποίο είναι και αρνητικό

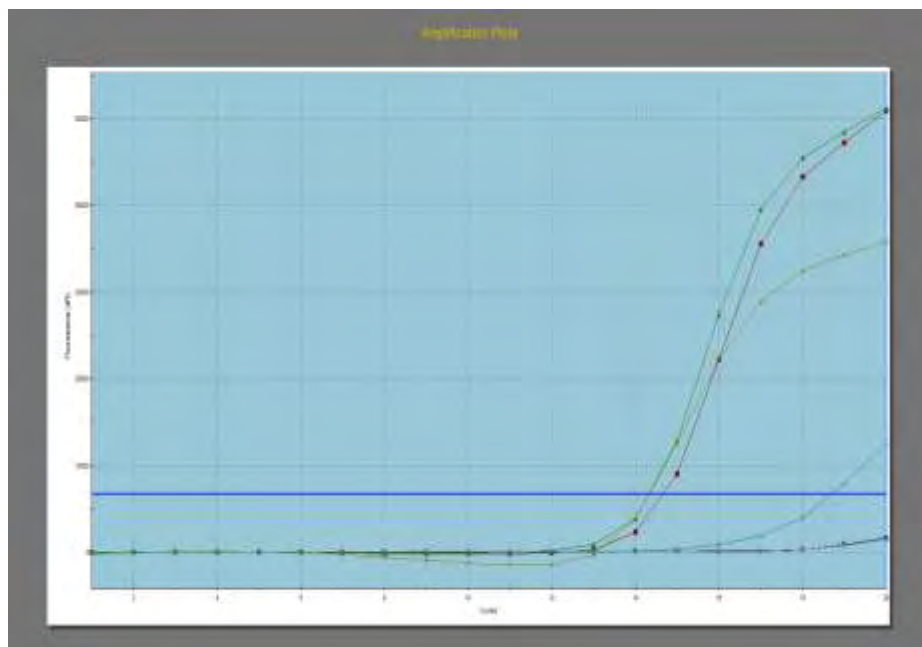


Εικόνα 4.3.1.2: Dissociation Curve. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time LAMP στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων. Μπορούμε να παρατηρήσουμε την ύπαρξη ενός προϊόντος με συγκεκριμένο σημείο τήξης.

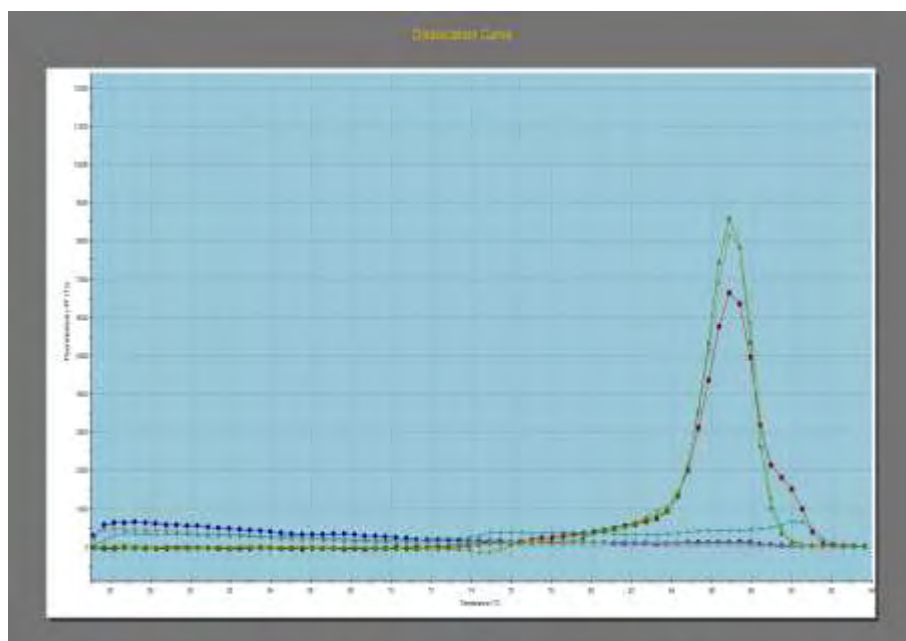
#### 4.3.2 Αποτελέσματα Real-Time LAMP σε κλινικά δείγματα

15 κλινικά δείγματα θετικά για τον HPV16 χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση της ικανότητας της μεθόδου να ανιχνεύει τον ιό. Όλα τα δείγματα ήταν θετικά μετά την επώαση για 18 λεπτά στους 65°C.

Ενδεικτικά στις παρακάτω εικόνες εμφανίζονται τα αποτελέσματα σε 4 από τα 15 κλινικά δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του ιού HPV-16 μέσω Real-Time LAMP.



Εικόνα 4.3.2.1: Amplification plot. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real Time LAMP σε 4 κλινικά δείγματα.



Εικόνα 4.3.2.2: Dissociation Curve. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real-Time LAMP σε 4 κλινικά δείγματα. Μπορούμε να παρατηρήσουμε την ύπαρξη ενός προϊόντος με συγκεκριμένο σημείο τήξης.



## 5.Συζήτηση

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV ανήκει στην οικογένεια Papillomaviridae, είναι σχετικά μικρός σε μέγεθος προσβάλλει συνήθως το δέρμα σε πολλές περιοχές του σώματος, τα επιθήλια στη στοματική κοιλότητα και το ανώτερο αναπνευστικό, και σπάνια άλλους ιστούς. Η συνηθέστερη κλινική εκδήλωση της λοίμωξης από τους HPV ιούς εντοπίζεται στην πρωκτογεννητική περιοχή. Ο HPV 16 θεωρείται υπεύθυνος για την εκδήλωση προ καρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων και για αυτό ανήκει στην κατηγορία των ιών HPV υψηλού κινδύνου. [12, 15]

Παρόλα αυτά οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ιών HPV όπως οι τεχνικές : Hybrid capture 2 (HC2), Cervista, και Amplicor για τον συστηματικό έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, είναι χρονοβόρες και υψηλού κόστους. [4, 25, 28]

Η πιο κατάλληλη μέθοδος είναι η ισοθερμική αντίδραση LAMP όπου είναι μια σχετικά καινούργια τεχνική σε μόνο ένα βήμα. Με την μέθοδο αυτή γίνεται ενίσχυση μικρών γονιδιακών περιοχών υπό ισοθερμικές διαδικασίες και το εύρος της θερμοκρασίας συνήθως να κυμαίνεται μεταξύ 60 και 65 βαθμών κελσίου. Τα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πιο πάνω μεθόδους είναι ότι είναι απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους και ο στόχος ενισχύεται  $10^9$  φορές μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση τεσσάρων ή έξι εκκινητών που αναγνωρίζουν 6 ή 8 αντίστοιχα, ανεξάρτητες αλληλουχίες σε επιλεγμένο νουκλεϊκό στόχο του παθογόνου και τον πολλαπλασιάζουν  $10^9$  φορές [18, 23, 25].

Η real time LAMP αποτελεί παραλλαγή της απλής LAMP κατά την οποία χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων λεπτό προς λεπτό σε πραγματικό χρόνο (REAL TIME LAMP). Είναι αξιόπιστη, απλή και γρήγορη μέθοδος [27].

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η βελτιστοποίηση της τεχνικής Real Time LAMP και στη συνέχεια η εφαρμογή της για την ανίχνευση του ιού HPV 16 σε 15 κλινικά δείγματα.

Σχεδιάστηκαν 6 εκκινητές για το συγκεκριμένο πείραμα για ενίσχυση του τμήματος του E6 του γονιδίου του HPV16 και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι DHPV16F3, DHPV16B3, DHPV16FIP, DHPV16BIP, DHPV16LF και DHPV16LB. Ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής (FIP), ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής (BIP) και οι εξωτερικοί εκκινητές F3, B3. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε μέσω του προγράμματος Primer Explorer V5.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR για 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.

Μετά ακολούθησε real time PCR, για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου σε πλασμίδια που περιείχαν τμήμα του γονιδίου E6 του HPV-16.

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.

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.

Ο 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 EvaGreen, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA.

Τέλος, για τον έλεγχο της εξειδίκευσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων Real-Time LAMP στις πλασμιδιακές αραιώσεις με σκοπό την εύρεση των ιδανικών συνθηκών εκτέλεσης των αντιδράσεων και πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες των εκκινητών F3/B3, LoopF/LoopR και FIP/BIP.

Αρχικά δοκιμάσθηκε η DNA πολυμεράση Bst 2.0 παρουσία ή μη loop εκκινητών με διάρκεια της αντίδρασης τα 25 λεπτά. Παρουσία loop εκκινητών ανιχνεύονται τα 100 και 10 αντίγραφα στα 23 λεπτά ενώ το 1 αντίγραφο δεν ανιχνεύεται καθόλου. Απουσία loop εκκινητών δεν ανιχνεύονται ούτε τα 100 ούτε τα 10 και ούτε βέβαια και το 1 αντίγραφο.

Με την DNA πολυμεράση Bst 3.0 παρουσία loop εκκινητών με διάρκεια της αντίδρασης τα 25 λεπτά, τα 100 αντίγραφα ανιχνεύονται στα 15 λεπτά, τα 10 αντίγραφα στα 21 λεπτά ενώ το 1 αντίγραφο δεν ανιχνεύεται. Απουσία loop εκκινητών δεν ανιχνεύονται ούτε τα 100 ούτε τα 10 ούτε το 1 αντίγραφο.

Κατά συνέπεια όλα τα περαιτέρω πειράματα έγιναν μόνο με την Bst 3.0 DNA πολυμεράση σε συγκέντρωση 8 U/μl, με σταθερό το  $MgSO_4$  στα 8mM, στους 65°C και με διάρκεια της αντίδρασης τα 25 λεπτά και ακολουθήθηκαν οι λόγοι των συγκεντρώσεων των εκκινητών όπως αυτοί περιγράφονται στον Πίνακα 3.5.41 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκαν να είναι οι εξής:

FIP/BIP 1,6 pmol/μl

Loop F/Loop R 0,2 ή 0,4 pmol/μl και

F3/B3 0,2 pmol/μl

Με βάσει της ανωτέρω βέλτιστες συνθήκες τα 10 αντίγραφα ανιχνεύονται στα 11 λεπτά και το 1 αντίγραφο στα 12 λεπτά.

Τέλος εφαρμόζοντας τις ανωτέρω συνθήκες και στα 15 κλινικά δείγματα τα οποία είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε Real Time PCR με τους εκκινητές F3/B3 (τα αντίγραφα των οποίων αναφέρονται στον Πίνακα 3.1.1) έδωσαν σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα στην Real Time LAMP αλλά σε πολύ πιο σύντομο χρόνο από ότι η Real Time PCR.

Συνοψίζοντας, η Real-Time LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, αποτελεί μία τεχνική υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας, με χαμηλό κόστος που

επιτρέπει την λήψη των αποτελεσμάτων σε πολύ σύντομο χρόνο για την ανίχνευση των HPV16 ιών. Έτσι, μπορεί να αποτελέσει μία σημαντική τεχνική για τον διαγνωστικό έλεγχο αυτής της ομάδας ιών.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS, 2005 Int J Cancer 113(2):276-283. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I.
2. Bosch FX, de Sanjose S, 2003 WHO 31:3–13. The Immunological Basis for Immunization Series Module 19: Human papillomavirus infection.
3. Casas I., Powell L., Klapper P.E, Cleator G.M, 1995 J. Virol. Meth. 53:25-36. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay.
4. Castle, Stoler P.E, WrightJr, Sharma, Wright T.L., Behrens C.M, 2011 Lancet On col. 12,880–890. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV): a sub analysis of the ATHENA study.
5. Charles E, Wood, Zigui Chen, Mark Cline J., Brigitte E. Miller, Robert D. 2007 Burk J Virol. 81(12):6339-45. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques.
6. Conway M.J, Meyers C, 2009 J Dent Res. Apr;88(4):307-17. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses.
7. Danos O, Katinka M, Yaniv M, 1982 EMBO 231- 236. Human papillomavirus la complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae.
8. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT, 2004 Proc Natl AcadSci USA 14252-7. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression.
9. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU Zur Hauzen H., 2004 Virology 324:17-27. Classification of papillomaviruses.
10. Donegan K, Beau-Lejdstrom R, King B, Seabroke S, Thomson A, Bryan P, Vaccine 2013 Oct 9;31(43):4961-7. Bivalent human papillomavirus vaccine and the risk of fatigue syndromes in girls in the UK.

11. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA, 2012 Vaccine 5: F55- 70. The biology and life - cycle of human papillomaviruses.
12. Gradíssimo,A, Burk, 2017 Expert.Rev.Mol.Diagn.17,379–391. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention.
13. Graham S, 2010 Future Microbiology 5(10) 1493–1506. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies.
14. Hoffmann, Hirt, Bechtold, Beard, Raj, 2006 Journal of Virology 80(9) 4431–4439. Different Modes of Human Papillomavirus DNA Replication during Maintenance.
15. Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G, Stoler M., zur Hausen H., 1996 Biophys F55–F78. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers, Biochim.
16. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H, 2012 Front Microbiol 3:152. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation.
17. Knipe D. M., Howley P. M, 2007 Fields Virology 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
18. Livingstone, Rohatensky, Mintchev M, Nakoneshny P., Demetrick, van Marle, Dort, 2016 J.Clin.Virol.75,37–41. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection and sub typing of human papillomaviruses (HPV) in oropharynxgeal squamous cell carcinoma (OPSCC).
19. Lu B, Kumar A, Castellsague X, Giuliano Ar, BMC Infect Dis 2011 Jan 12;11:13. Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis.
20. Mao F, Leung WY, Xin X., 2007 BMC Biotechnol Nov 9;7:76. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications.
21. McBride, 2008 Advances in Virus Research, 72, 155–205. Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. Advances in Virus Research.
22. Moyer VA, 2012 Ann Int Med 156 880–891. Screening for cervical cancer: U.S. Preventive services task force recommendation statement.

23. Notomi, Okayama, H., Masubuchi, Yonekawa, T., Watanabe, Amino, Hase, 2000 Nucleic Acids Research 28(12) e63. Loop-mediated isothermal amplification of DNA.
24. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H, 2015 Journal of Microbiology ;53(1):1-5. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and prospects.
25. Schiffman M, Wentzensen, 2016 J.Low.Genit.Tract.Dis.20,1–7. A suggested approach to simplify and improve cervical screening in the United States.
26. Broker T.R, Stanley M.A, 2012 Vaccine 30 F55–F70. The biology and life cycle of human papillomaviruses.
27. Tomlinson, J, 2012 Methods in Molecular Biology Phytoplasma 291–300. In-Field Diagnostics Using Loop-Mediated Isothermal Amplification.
28. Tsakogiannis D, Gartzonika, Levidiotou-Stefanou, Markoulatos P., 2017 Expert. Rev.Mol.Med.19, e1. Molecular approaches for HPV genotype in gand HPV-DNA physical status.
29. Wang W, Chen K, Xu C, 2006 Anal Biochem Sep15;356(2):303-5. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument.
30. Williams, Filippova, Soto, Duerksen-Hughes, 2011 Future Virol 1;6 (1) 45–57. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress.
31. Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR, Coleman N, 2007 J.Pathol 213 (1): 27-34. 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.

## 6.1 Βιβλιογραφία εικόνων

- i. [http://viperd.b.scripps.edu/info\\_page.php?VDB=110t](http://viperd.b.scripps.edu/info_page.php?VDB=110t), accessed May 24<sup>th</sup> 2013.
- ii. <http://viralzone.expasy.org/>
- iii. <http://cvc.dfci.harvard.edu/hpv/HTML/classification.html>
- iv. [http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista\\_medica/rt/pri-nterFriendly/184/1661](http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/rt/pri-nterFriendly/184/1661)
- v. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>
- vi. <https://www.genetargetsolutions.com.au/product/evagreen-dye-20x-water-2/>